

=====

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

=====

IRSTI: 34.27.23, 34.35.25

S.V. BAZHENOV^{1*}, V.O. MATVEEVA¹, P.A. VIUSHINSKIY², A.A. KUDRYAVTSEVA¹,
B.S. ZHOSHIBEKOVA¹, M.S. ALEXYUK³, A.P. BOGOYAVLENSKIY³, I.V. MANUKHOV¹

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

²All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin
and Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

³Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: bazhenov1994@gmail.com

LUMINESCENT MICROBIOTA OF THE ARAL SEA

doi:10.53729/MV-AS.2024.01.09

Abstract

The Aral Sea is a unique body of water and is an unstable ecological zone. The soils of the Aral Sea are an example of arid salt accumulation, where a specific type of solonchaks with a unique microflora are formed. The study of the microflora of waters and bottom sediments of the Aral Sea is currently receiving much attention, but there are no reports of the existence of luminescent microflora in this water area.

Luminescent bacteria mainly inhabit the waters of seas and oceans, but not salt lakes and fresh water bodies. Here, for the first time, we report the discovery of luminescent microflora in the Aral Sea, which is a body of water with a complex hydrochemical nature separated from the ocean, which is characterized by strong fluctuations in temperature and salinity. The presence of at least two species of luminescent bacteria belonging to the genus *Vibrio* inhabiting the waters of the North Aral Sea has been shown. Considering the significant changes in temperature and salinity of the Aral water, apparently, these species can occupy different ecological niches that arise with changing seasons, water flow, etc. Isolated strains of luminescent bacteria can in the future be used for bioluminescent analysis of integral toxicity. It is assumed that the microflora, which is accustomed to the current environmental conditions, may be more sensitive to changes in the particular biotope.

Keywords: bioluminescent bacteria, diversity, Aral Sea, *Vibrionaceae*.

Almost all luminous marine bacteria belong to the family *Vibrionaceae* (genera: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aliivibrio*) [1]. The large number of species within this taxon determines the diversity of ecological niches occupied by these bacteria [2]. It is known that *lux*-operons, which determine the ability of bacteria to bioluminescence, are often spread between species via horizontal gene transfer [3]. There is still debate about the role of *lux*-operons in the evolutionary process of habitat development by luminescent bacteria [4]. There are reports on the protective functions of luciferases against reactive oxygen species and UV radiation [5]. Symbiotic and commensal relationships based on luminescence are better studied [6, 7]. Anyway, the prevalence of luminescent microflora in marine biotopes is very high in contrast to terrestrial conditions, where only a few representatives of the genus *Photorhabdus* are found [8]. In addition, there is no report on colonization of freshwater bodies by luminescent microflora in the literature. Moreover, there are no reports on the detection of such bacteria in small saline water bodies completely closed from the world ocean (such as the Dead Sea and many smaller saline lakes) too. Only the Caspian Sea, as reported by Iranian scientists [9], has representatives of the genus *Vibrio* capable of bioluminescence. Luminescent bacteria are often used for bioluminescent analysis of integral and specific toxicity [10, 11]. It is assumed that the

microflora, which is adapted to the current environmental conditions, may be more sensitive to changes in the particular biotope, which determines the relevance of the search for endemic luminescent strains.

In this paper, we report for the first time the detection of luminescent bacteria in the Aral Sea.

Materials and methods of research

Sample collection

The collection of microflora samples was carried out similarly to previously performed work [12]. A sterile cotton swab was dipped into water or another source of bacteria and then swiped over the surface of the agarized medium in a Petri dish, and then the Petri dish was incubated until individual colonies appeared. To obtain individual colonies, streak plate method was used with several sterile cotton swabs. When taking a sample of the intestinal microflora of fish, the contents of the midgut were used to obtain the greatest diversity of bacterial species represented and to reduce cross-contamination between caught fish [13]. To do this, the fish was opened, the intestines were cut in the middle part and a small amount of the contents was squeezed out onto a cotton swab.

Cultivation of bacteria

Bacteria were grown on the surface of SWT [14] agarized medium (5 g/L tryptone, 2.5 g/L yeast extract, 3 g/L glycerol, 15 g/L bactoagar and variable amount of sea salt). Media with 15, 35 and 70 g/L sea salt content were used to cover the greatest diversity of bacterial species, because The Aral Sea is characterized by large differences in salinity from place to place [15].

Determination of the genus

To determine the genus of bacteria, 16S rRNA sequences were analyzed. For this purpose, total DNA from pure culture was isolated using a set of reagents "Проба-Экспресс" (Syntol, Russia). The 16S rRNA gene fragment was amplified using primers CGTGCCAGCAGCCGCGGCGGTAATAATA and GTGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG, purified by electroelution and sequenced according to the Sanger method in "Evrogen" (Moscow, Russia). The phylogenetic tree was constructed using the MEGA-X program [16] and 16S rRNA reference sequences from the ncbi.nih.gov database.

Results and discussion

In 2023, an expedition was carried out to the southern shore of the North Aral Sea with the aim of collecting microflora samples and searching for luminescent bacteria. Microflora samples were taken from water, bottom sediments and intestinal contents of fish caught in the North Aral Sea. Since water salinity varies significantly in the North Aral Sea, bacteria from each source were inoculated into several Petri dishes with a rich nutrient medium with different contents of sea salt, namely 10, 35 and 70 g/L. Concentration 10 g/L corresponds to the average salinity of the Small Aral Sea [15], 35 g/L allows isolating strains that are more halophilic/halotolerant. 70 g/L was used when sowing samples from water and bottom sediments of more saline regions of the water area and salt marshes. The following is a list of sample collection sites:

- Seawater near shore taken from the North Aral Sea near Bogen village, Aral District, Kyzylorda Region.
- Coastal soil and organic emissions from the shore of the North Aral Sea near Bogen village, Aral District, Kyzylorda Region.
- Intestinal contents of commercial fish (16 pieces, including roach, Volga zander, carp, ziege, and asp), caught not more than 2 hours before seeding in the North Aral Sea and purchased from local fishermen.
- Water from small lakes and channels near the dam between the North and South Aral Seas.

Samples were also collected near Bogen village, Aral District, from the water of a salt

marsh, characterized as a red semi-liquid mass with an orange-black sediment (Fig. 1A).

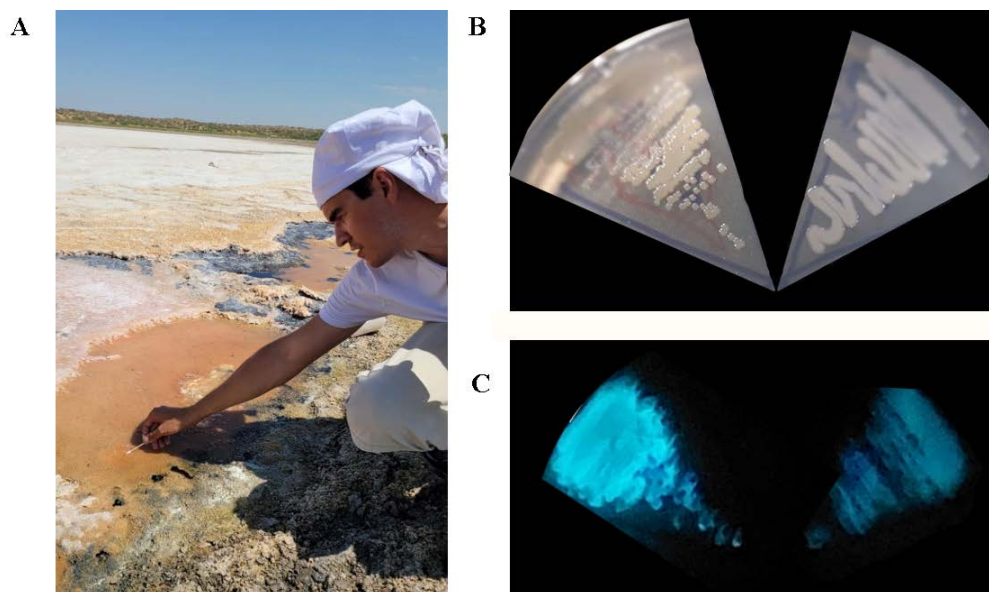


Figure 1 – Photo of collecting samples for bacterial sowing from a salt marsh near Bogen village (A). Colonies of luminescent bacteria from the North Aral Sea in the light (B) and in the dark (C).

Sieving of collected samples onto the surface of the nutrient medium in Petri dishes was carried out in the field at the place of sample collection. Petri dishes with sowed samples were incubated at room temperature (20-28°C) for ~30 hours, then during transportation to the laboratory (within 3-4 days) the temperature was not fixed and ranged from 4°C (refrigerator) to 25°C (room temperature with air conditioning). The bioluminescence ability of the obtained colonies was checked visually in a dark room (Fig. 1B) and using a luminometer.

As a result, luminescent colonies were detected only in samples collected from the water area of North Aral. Luminescent bacteria were detected both in water and organic emissions on the shore of the North Aral and in the intestines of 15 out of 16 fish caught in the reservoir 1-2 hours before sampling. It is noteworthy that luminescent bacteria were detected in the intestines of freshwater fish species such as the carp, roach, and Volga zander, which, however, are able to feed in semi-saline waters close to river mouths (Volga, Ural, and Amu Darya). At the next stage, the luminescent colonies were subcultured, and the isolated strains were cultivated on an agar medium with a salt concentration of 35 g/L at a temperature of 30°C. Two morphological types of colonies were found within the isolated strains (Fig. 1C). Representatives of each morphological type were selected for taxonomic identification. To determine the taxonomic affiliation of the isolated strains, sequencing of the 16S rRNA gene was performed (nucleotide sequences of strains RK2 and RK27 are deposited in the NCBI database under numbers PP440233 and PP440234, respectively) and phylogenetic analysis of the sequences obtained was carried out. Figure 2 shows the phylogenetic tree for the two isolated strains and the closest type strains of luminescent bacteria *Vibrionaceae*.

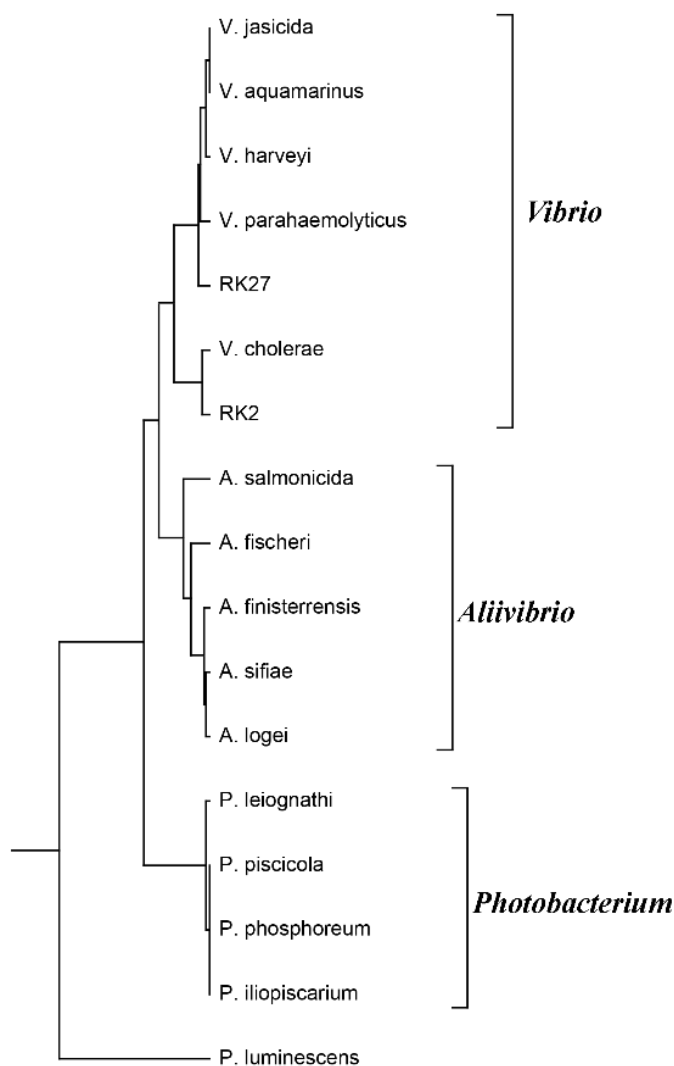


Figure 2 - Phylogenetic tree based on 450 bp 16S rRNA sequences of type luminescent bacterial strains of the family *Vibrionaceae*. *Photorhabdus luminescens* used to root the tree.

As shown in Figure 2, analysis of the 16S ribosomal RNA gene sequence allowed the genus of the isolated clones to be identified as *Vibrio*.

Metagenomic study of water from the water area of the North Aral Sea [17] showed the presence of a significant number of vibrios as part of the microbiota. However, the search for genes encoding luciferases in the metagenomic data did not yield positive results. This is surprising, because luminescent bacteria, as our results showed, are very common (>90% of fish are carriers of luminescent microflora) and their titer in sea water is large enough to obtain multiple luminescent colonies when adding a small amount of sea water to the nutrient medium in Petri dishes. Since all known marine luminescent bacteria belong to the family *Vibrionaceae* [2], it is not surprising that our work revealed that the luminescent microbiota of the Aral Sea belongs to the genus *Vibrio*. The fact populating of originally freshwater fish species by luminescent microbiota looks intriguing. Since the analysis was performed on a rather short section of the genome, and the genus *Vibrio* currently contains more than 150 species, precise species identification requires additional research. It will also be important to study the genetics of isolated strains in more detail to assess the speed of the molecular clock in a single body of water such as the Aral Sea in comparison to the Caspian Sea and the global ocean. Previously, seasonal fluctuations in the colonization of the intestines of fish from the Okhotsk and Bering Seas with luminescent psychrophilic bacteria *Aliivibrio logei* and *Photobacterium phosphoreum* were shown [14]. In this regard, it is of interest to further study the ecological niches occupied by

these types of bacteria, because in the samples we collected, strains of two morphological types were found with different frequencies: strains similar to RK2 were noticeably more common.

Conclusion

This work presents new data on the spontaneous luminescence of a number of microbial cultures from the Aral Sea, which is a water body with a complex hydrochemical nature due to strong fluctuations in habitat conditions. The presence of at least two species of luminescent bacteria belonging to the *Vibrio* genus, living in the waters of the North Aral Sea and inhabiting the intestines of freshwater fish, was shown. Unusual behavior of marine microflora in interaction with representatives of freshwater fish can serve as a pioneer study of new ecological niches of luminescent microorganisms.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the fishermen of the village of Amanotkel in the Aral region and their foreman Asylbek for collecting samples and helping in the process of primary sowing of microflora, as well as guides Aibek Karsybaev and Zhomart

Funding

This work was financially supported by Russian Science Foundation [22-14-00124].

References:

- 1 Urbanczyk H., Ast J.C., Higgins M.J., Carson J., Dunlap P.V. 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*, 2007, 57:2823-2829 (doi: 10.1099/ij.s.0.65081-0)
- 2 Soto W. Emerging Research Topics in the *Vibrionaceae* and the Squid-Vibrio Symbiosis. *Microorganisms*, 2022, 10(10):1946. doi: 10.3390/microorganisms10101946.
- 3 Urbanczyk H., Ast J.C., Kaeding A.J., Oliver J.D. and Dunlap P.V. Phylogenetic Analysis of the Incidence of lux Gene Horizontal Transfer in Vibrionaceae. *Journal of Bacteriology*, 2008. 190(10): 3494–3504 (doi: 10.1128/JB.00101-08)
- 4 Zavilgelsky G.B., Shakulov R.S. Mechanisms and Origin of Bacterial Bioluminescence. *Molecular Biology*, 2018, 52(6):935-947 (doi: 10.1134/S0026898418060186)
- 5 Melkina O.E., Kotova V.Yu., Konopleva M.N., Manukhov I.V., Pustovoit K.S.6 Zavilgelsky, G.B. Photoreactivation of UV-exposed *Escherichia coli* K12 AB1886 *uvrA6* via luminescence of *Photobacterium leiognathi* luciferase. *Molecular Biology* 2015: 49(6): 928-932.
- 6 Nyholm S.V., Stewart J.J., Ruby E.G., McFall-Ngai M.J. Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environ. Microbiol.* 2009, 11(2):483-93 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01788.x.)
- 7 Soto W., Nishiguchi M.K. Microbial experimental evolution as a novel research approach in the vibrionaceae and squid-Vibrio symbiosis. *Front. Microbiol.*, 2014, 5:593 (doi.org/10.3389/fmicb.2014.00593)
- 8 Dunlap P. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 2014, 144:37-64 (doi: 10.1007/978-3-662-43385-0_2)
- 9 Yazdi M.M.N., Mashreghi M., Bahreini M., Oroojalian F., Pordeli P. Biochemical characteristics of luminescent *Vibrios* isolated from the Caspian Sea and the Persian Gulf. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44: S318 (doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.08.1015)
- 10 Zarubina A.P., Lukashov E.P., Deev L.I., Parkhomenko I.M., Rubin A.B., Shoyinbekova S.A., Zylkybaev O.T., Kurmankulov N.B. Biotesting of biological effects of single-walled carbon nanotubes using test systems of luminescent bacteria. *Vestnik KazNU. Series biological*, 2012, 54(4):262-267. [Зарубина А.П., Лукашев Е.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Рубин А.Б., Шойынбекова С.А., Жылқыбаев О.Т., Құрманқұлов Н.Б. Люминисцентті бактериялардың тест-жүйелерін пайдаланып бір қабатты көміртекті нанотүтікшелердің биологиялық эффекттерін биотестілеу. *Вестник КазНУ. Серия биологическая*, 2012, 54(4):262-267.
- 11 Bazhenov S.V., Novoyatlova U.S., Scheglova E.S., Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Kessenikh A.G., Kononchuk O.V., Gnuchikh E.Y., Liu Y., Al Ebrahim R., et al. Bacterial lux-biosensors:

Constructing, applications, and prospects. *Biosens. Bioelectron.* X 2023, 13:100323, (doi:10.1016/j.biosx.2023.100323)

12 Khrulnova S.A., Baranova A., Bazhenov S.V., Goryanin I.I., Konopleva M.N., Maryshev I.V., Zavgalsky G.B. Lux-operon of the marine psychrophilic bacterium *Aliivibrio logei*: A comparative analysis of the LuxR1/LuxR2 regulatory activity in *Escherichia coli* cells. *Microbiology (United Kingdom)* 2016, 162(4):717-724. (doi: 10.1099/mic.0.000253)

13 Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology* 2018, 9:343795. (doi: 10.3389/FMICB.2018.00873)

14 Bazhenov, S. V.; Khrulnova, S.A.; Konopleva, M.N.; Manukhov, I. V Seasonal changes in luminescent intestinal microflora of the fish inhabiting the Bering and Okhotsk seas. *FEMS Microbiol. Lett.* 2019, 366, (doi.org/10.1093/femsle/fnz040)

15 Aladin N.V., Plotnikov I.S., Micklin P, and Ballatore T. Aral Sea: Water level, salinity and long-term changes in biological communities of an endangered ecosystem-past, present and future. *Natural Resources and Environmental Issues* 2009, 15:36

16 Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018, 35:1547–1549 (doi: 10.1093/molbev/msy096)

17 Alexyuk M., Bogoyavlenskiy A., Alexyuk P., Moldakhanov Y., Berezin V., Digel I. Epipelagic microbiome of the Small Aral Sea: Metagenomic structure and ecological diversity. *MicrobiologyOpen*, 2021, 10: e1142 (doi.org/10.1002/mbo3.1142)

С.В. БАЖЕНОВ^{1*}, В.О. МАТВЕЕВА¹, П.А. ВЬЮШИНСКИЙ², А.А. КУДРЯВЦЕВА¹,
Б.С. ЖОШИБЕКОВА¹, М.С. АЛЕКСЮК³, А.П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ³, И.В. МАНУХОВ¹

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии
имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко, Москва, Россия

³Научно – производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан
*e-mail: bazhenov1994@gmail.com

ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩАЯ МИКРОФЛОРА АРАЛА

Аннотация

Аральское море - уникальный водоем, является нестабильной экологической зоной. Почвы Аральского моря являются образцом аридного соленакопления, где формируется специфический тип солончаков с уникальной микрофлорой. Изучению микрофлоры вод и донных отложений Аральского моря в настоящее время уделяется большое внимание, однако сообщений о существовании люминесцирующей микрофлоры в этой акватории не имеется.

Люминесцирующие бактерии в основном населяют акватории морей и океанов, но не соленых озёр и пресных водоемов. Здесь впервые сообщается об обнаружении люминесцирующей микрофлоры в Аральском море, которое является отдаленным от океана водоемом со сложной гидрохимической природой, характеризующейся сильными колебаниями температуры и солености. Показано наличие как минимум двух принадлежащих к роду *Vibrio* видов люминесцирующих бактерий, населяющих акваторию малого Арала. Учитывая существенные перепады температуры и солености воды Арала, по-видимому, данные виды могут занимать различные экологические ниши, возникающие при смене сезонов, обводненности и др. Изолированные штаммы люминесцентных бактерий в перспективе могут быть использованы для биолюминесцентного анализа интегральной токсичности. Предполагается, что микрофлора, привычная к сложившимся условиям окружающей среды, может оказаться более чувствительна к изменениям конкретного биотопа.

Ключевые слова: биолюминесцентные бактерии, разнообразие, Аральское море, *Vibrionaceae*.

FTAMP: 34.27.23, 34.35.25

С.В. БАЖЕНОВ^{1*}, В.О. МАТВЕЕВА¹, П.А. ВЬЮШИНСКИЙ², А.А. КУДРЯВЦЕВА¹,
Б.С. ЖОШИБЕКОВА¹, М.С. АЛЕКСЮК³, А.П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ³, И.В. МАНУХОВ¹

¹Мәскеу физика-техникалық институты, Долгопрудный, Ресей

²К.И. Скрябин және Я.Р. Коваленко атындағы бүкілресейлік эксперименттік ветеринария
ғылыми-зерттеу институты, Мәскеу, Ресей

³Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан
*e-mail: bazhenov1994@gmail.com

АРАЛ ТЕҢІЗІНІҢ ЛЮМИНЕСЦЕНТТІ МИКРОФЛОРАСЫ

doi:10.53729/MV-AS.2024.01.09

Түйін

Арал теңізі-бірегей су айдыны, тұрақсыз экологиялық аймақ. Арал теңізінің топырағы құрғақ тұзды жинақтаудың мысалы болып табылады, онда бірегей микрофлорасы бар сортандардың белгілі бір түрі қалыптасады. Арал теңізінің сулары мен түбі шөгінділерінің микрофлорасын зерттеуге қазіргі уақытта көп көңіл бөлінуде, бірақ бұл акваторияда люминесцентті микрофлораның бар екендігі туралы мәліметтер жоқ.

Люминесцентті бактериялар тұзды көлдер мен тұщы су қоймаларында емес, негізінен теңіздер мен мұхиттарда тіршілік етеді. Бұл мақалада алғаш рет температура мен тұздылықтың қатты ауытқуымен сипатталатын, күрделі гидрохимиялық табиғаты бар, мұхиттан бөлінген су қоймасы болып табылатын Арал теңізінде люминесцентті микрофлораның табылуы туралы хабарлаймыз. Мұнда, Кіші Аралдың акваториясын мекендейтін люминесцентті бактериялардың *Vibrio* тұқымдасына жататын кем дегенде екі түрінің болуы көрсетілген. Аралдың суының температурасы мен тұздылығының айтарлықтай өзгеруін ескере отырып, бұл түрлер жыл мезгілдеріне, су тасқынына және т.б. өзгерістер кезінде пайда болатын әртүрлі экологиялық нишаларға байланысты болуы мүмкін. Болашақта люминесцентті бактериялардың оқшауланған штамдары интегралды уыттылықтың биолюминесценттік талдауы үшін пайдаланылуы мүмкін. Қоршаған ортаның қазіргі жағдайларына үйренген микрофлора белгілі бір биотоптағы өзгерістерге сезімтал болуы мүмкін деп болжанады.

Кілтті сөздер: биолюминесцентті бактериялар, әртүрлілік, Арал теңізі, *Vibrionaceae*.

Барлық жарық шығарғыш бактериялар *Vibrionaceae* тұқымдасына жатады (тұқымдастар: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aliivibrio*) [1]. Вибриондар алып жатқан экологиялық нишалардың әртүрлілігі осы таксонның құрамындағы көптеген түрлерді анықтайды [2]. Биолюминесценция бактерияларының қабілетін анықтайтын *lux*-оперондары көбінесе көлденең тұраралық тасымалдау арқылы таралатыны белгілі [3]. Люминесцентті бактериялардың таралу аймағын дамытудың эволюциялық процесінде *lux*-оперондарының рөлі туралы әлі де пікірталас тудыруда [4]. Люциферазалардың оттегі мен УК-сәулеленудің белсенді түрлерінен қорғаныс функциялары туралы мәліметтер бар [5]. Люминесценцияға негізделген симбиотикалық және комменциалды қатынастар көбірек зерттелген болып саналады [6, 7]. Қалай болғанда да, теңіз биотоптарында люминесцентті микрофлораның таралуы жердегі жағдайларға қарағанда өте жоғары, мұнда *Photorhabdus* тұқымдасының бірнеше өкілдері ғана байқалады [8].

Әдебиеттерде тұщы су объектілерінің люминесцентті микрофлораның колонизациясы туралы мәліметтер жоқ. Оның үстіне, мұндай бактериялардың дүниежүзілік мұхиттардан толығымен жабылған шағын тұзды су қоймаларында (мысалы, Өлі теңіз және көптеген ұсақ тұзды көлдер) табылғаны туралы мәліметтер жоқ. Тек Каспий теңізінде, иран ғалымдары [9] хабарлағандай, биолюминесценцияға қабілетті *Vibrio* тұқымдасының өкілдері бар. Люминесцентті бактериялар интегралды және спецификалық уыттылықтың биолюминесценциялық талдауы үшін жиі қолданылады [10,

11]. Қазіргі орта жағдайларына бейімделген микрофлора белгілі бір биотоптың өзгеруіне сезімтал болуы мүмкін, бұл эндемиялық люминесцентті штаммдарды іздеудің өзектілігін анықтайды.

Бұл жұмыста біз алғаш рет Арал теңізінде люминесцентті микрофлораның табылғаны туралы хабарлаймыз.

Материалдар мен әдістер

Үлгілерді жинау

Микрофлора үлгілерін жинау бұрын орындалған жұмыстарға ұқсас жүргізілді [12]. Стерильді мақта тампонын суға немесе бактериялардың басқа көзіне батырып, сосын оны Петри табақшасында агарлы ортаның бетіне жүргізеді. Ұсынылған бактериялық түрлердің алуан түрлілігін алу үшін және ауланған балықтар арасындағы өзара ластануды азайту үшін балықтардың ішек микрофлорасының үлгісін алу кезінде ортаңғы ішектің бөлігі пайдаланылды [13]. Ол үшін балық ішін ашып, ішектерің ортаңғы бөлігін кесіп, мақта тампонына аз мөлшерде сығындысы алынды. Петри табақшасы жеке колониялар пайда болғанға дейін инкубацияланады. Жеке колонияларды алу үшін бірнеше стерильді мақта тампондары бар жоғалатын жолақ әдісі қолданылды.

Бактерияларды өсіру

Бактериялар SWT агар [14] ортасының (5 г/л триптон, 2,5 г/л ашытқы сығындысы, 3 г/л глицерин, 15 г/л бактоагары және теңіз тұзының өзгермелі мөлшері) бетінде, 30°C температурада өсірілді. Бұл жұмыста құрамында 15, 35 және 70 г/л теңіз тұзы бар орталар пайдаланылды, себебі бактериялық түрлердің алуан түрлілігін қамту үшін жасалынады, өйткені Арал теңізі ауданнан ауданға тұздылықтың үлкен өзгеруімен сипатталады [15].

Туыстықтық анықтамасы

Бактериялардың туыстық байланысын анықтау үшін 16S рРНҚ тізбегіне талдау жүргізілді. Ол үшін таза дақылдан жалпы ДНҚ "Проба-Экспресс" реактивтер жиынтығымен (Синтол, Ресей) бөлініп алынды, 16S рРНҚ генінің фрагменті CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA және GTGTGTACAAGGCCCGGGAACG праймерлерінің көмегімен күшейтілді, электроэлюциямен тазартылды және "Еврогенге" (Мәскеу, Ресей) Сэнгер әдісімен секвенирленді. Филогенетикалық ағаш *ncbi.nih.gov* дерекқорындағы MEGA-X бағдарламасы [16] және 16S рРНҚ анықтамалық тізбегі арқылы құрастырылды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

2023 жылы микрофлора үлгілерін жинау және люминесцентті бактерияларды іздеу мақсатында Кіші Арал теңізінің оңтүстік жағалауына экспедиция жүргізілді. Микрофлора үлгілері Кіші Арал теңізінен ауланған балықтардың суынан, түбіндегі шөгінділерден және ішек құрамындағы заттардан алынды. Өйткені Кіші Арал теңізінде судың тұздылығы айтарлықтай өзгертіндіктен, сондықтан әр көзден бактерияларын әр түрлі теңіз тұзы бар атап айтқанда 10, 35 және 70 г/л бай қоректік ортасы бар бірнеше Петри табақшаларына егілді. 10 г/л Кіші Арал теңізіндегі орташа тұз концентрациясына сәйкес келеді, 35 г/л аса галофильді/галотолерантты штаммдарды оқшаулауға мүмкіндік береді. 70 г/л акватория және сортаңдардың неғұрлым тұзды жерлерінің су және түбі шөгінділерінен үлгілерді егу кезінде пайдаланылды. Төменде үлгілерді жинау орындарының тізімі берілген:

Қызылорда облысы, Арал ауданы, Бөген ауылының маңындағы Кіші Арал теңізінен алынған теңіз суы.

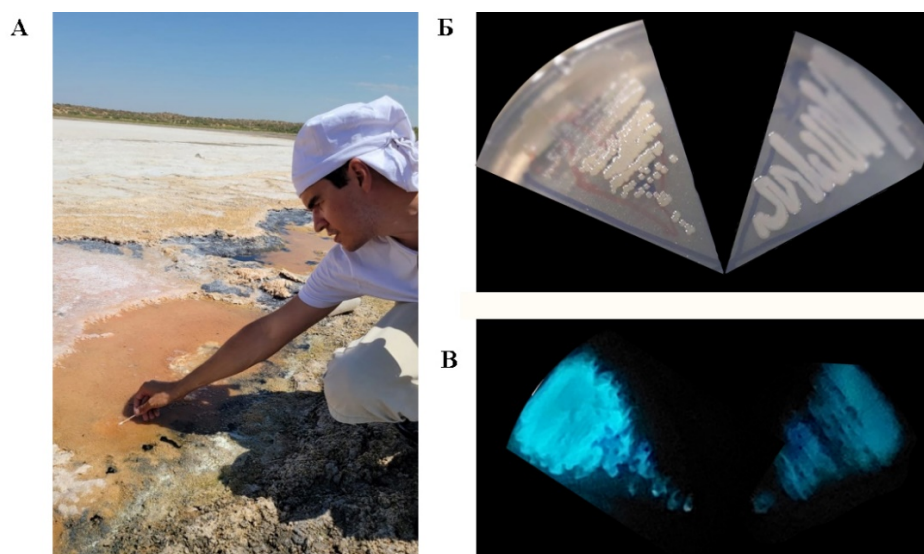
- Қызылорда облысы, Арал ауданы, Бөген ауылының маңындағы Кіші Арал теңізінің жағасынан жағалық топырақ және органикалық шығарындылар.

- Кіші Арал теңізінде егуден 2 сағат бұрын ауланған және жергілікті балықшылардан сатып алынған кәсіпшілік балықтардың (16 дана, оның ішінде қарақұйрық, берш, сазан, қылышбалық, ақсыла) ішектерінің құрамы.

- Кіші және Үлкен Арал теңіздері арасындағы бөгет маңындағы шағын көлдер мен

каналдардың суы.

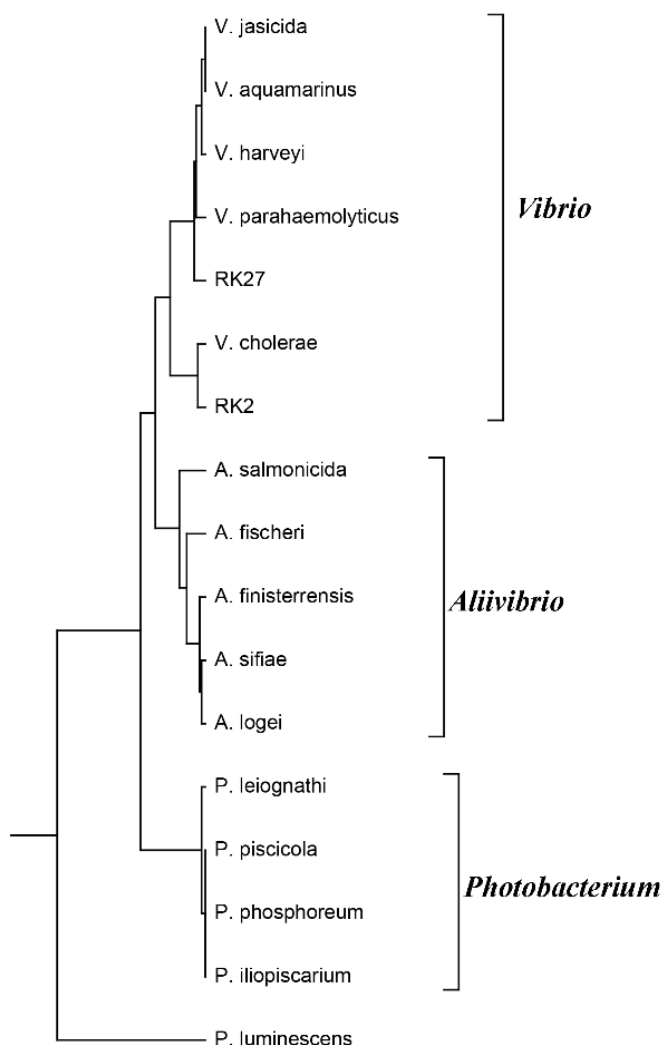
Сондай-ақ, Арал ауданы Бөген ауылының маңында сарғыш-қара шөгіндісі бар қызыл жартылай сұйық масса ретінде сипатталатын тұзды батпақты судан үлгілер жиналды (сурет 1 А).



Сурет 1 - Бөген (А) маңындағы тұзды батпақтан бактерияларды себу үшін үлгілерді жинау фотосуреті. Жарықта (Б) және қараңғыда (В) кіші Аралдың люминесцентті бактерияларының колониялары.

Іріктелген үлгілерді Петри табақшаларындағы коректік ортаның бетіне себу, үлгілерді жинау орнында жүргізілді. Шашыраңқы үлгілері бар Петри табақтары бөлме температурасында 20-28°C ~30 сағат бойы инкубацияланды, содан кейін зертханаға тасымалдау процесінде (3-4 күн ішінде) температура бекітілмеді және 4°C (Тоңазытқыш) 25°C (кондиционері бар бөлме температурасы) аралығында болды. Алынған колониялардың биолюминесценция қабілеті қараңғы бөлмеде визуалды түрде (сурет 1 В) және люминометрдің көмегімен тексерілді.

Нәтижесінде люминесцентті колониялар тек Кіші Аралдың акваториясынан жиналған үлгілерден табылды. Люминесцентті бактериялар суда да, кіші Аралдың теңіз жолағындағы органикалық шығарындыларда да, сынамалар алынғанға дейін 1-2 сағат бұрын тоғанда ауланған 16 балықтың 15-нің ішектерінде де табылды. Люминесцентті бактериялар тұщы су балықтарының мысалы, ақсыла, қарақұйрық, берш түрлерінің ішектерінен табылған, алайда, өзендердің сағаларына жақын жартылай тұзды суларда (Еділ, Орал, Амудария) масса жинауға қабілетті екендігі назар аудартады (сурет 1Б). Таксономиялық сәйкестілікті анықтау үшін әр морфологиялық типтің өкілдері таңдалды. Оқшауланған штаммдардың таксономиялық байланысын анықтау үшін рибосомалық РНҚ-ның 16S гені секвенирленді (RC2 және RK27 штаммдарының нуклеотидтер тізбегі сәйкесінше PP440233 және PP440234 нөмірлерімен NCBI дерекқорында сақталған) және алынған тізбектерге филогенетикалық талдау жасалды. 2-суретте екі оқшауланған штаммға арналған филогенетикалық ағаштар және *Vibrionaceae* люминисцентті бактериялардың ең жақын типтік штамдары көрсетілген.



Сурет 2 - 450 п.н. тізбектеріне негізделген филогенетикалық ағаш.
Сыртқы топ ретінде *Vibrionaceae*, *Photobacterium luminescens* тұқымдасының бактерияларының
типтік люминесцентті штаммдарының 16S рРНҚ алынды

2-суреттен көріп отырғанымыздай, рибосомалық РНҚ-ның 16S гендік тізбегін талдау окшауланған клондардың туыстық байланысын *Vibrio* ретінде анықтауға мүмкіндік берді.

Кіші Арал теңізі суларының метагеномикалық зерттеуі кезінде [17] микробиотада вибриондардың айтарлықтай мөлшерінің болуын көрсетті. Метагеномдық деректерде люциферазаларды кодтайтын гендерді іздеу оң нәтиже бермегенін атап өткен жөн. Бұл таңқаларлық, өйткені біздің нәтижелеріміз көрсеткендей флуоресцентті бактериялар, өте кең таралған (>балықтардың 90% - ы флуоресцентті микрофлораның тасымалдаушылары) және олардың теңіз суындағы титрі жеткілікті үлкен болғандықтан теңіз суынан бактериялық жасушалардың концентрациясына жүгінбей, Петри ыдысындағы қоректік ортаға аз мөлшерде су құйып, бірнеше люминесцентті колонияларды алуға болады. Барлық белгілі теңіз люминесцентті бактериялары *Vibrionaceae* [2] тұқымдасына жататындықтан, біздің жұмысымыздың нәтижесінде Аралдың люминесцентті микрофлорасы *Vibrio* тұқымдасына жататынын анықтағанымыз таңқаларлық емес. Бастапқыда тұщы судағы балық түрлері люминесцентті микрофлораға қоныстанғандығы қызықты көрінеді. Өйткені талдау геномның жеткілікті қысқа учаскесі бойынша жүргізілді, ал *Vibrio* тұқымында қазіргі уақытта RK27 штаммының *V. vulnificus* -қа, ал RK2 штаммының *V. cholerae* -ге жақындығының айқын көрінуіне қарамастан, 150-ден

астам түр бар, нақты түрді анықтау қосымша зерттеулерді қажет етеді. Каспий теңізі мен дүниежүзілік мұхит акваториясымен салыстырғанда Арал теңізі сияқты жеке су айдынындағы молекулалық сағаттардың жылдамдығын бағалау үшін оқшауланған штаммдардың генетикасын егжей-тегжейлі зерттеу де маңызды болады. Бұрын Охотск және Беринг теңіздеріндегі балықтардың ішектерінің люминесцентті психрофилді *Aliivibrio logei* және *Photobacterium phosphoreum* бактерияларының колонизациясының маусымдық ауытқуы көрсетілген [14]. Осыған байланысты біз тапқан бактериялардың түрлері алып жатқан экологиялық тауашаларды одан әрі зерттеу қызығушылық тудырады, өйткені біз әртүрлі жиілікте жинаған үлгілерде екі морфологиялық типтің штамдары болды: RK2-ге ұқсас штамдар айтарлықтай жиі кездесті.

Қорытынды

Жұмыста тіршілік ету ортасының қатты ауытқуына байланысты күрделі гидрохимиялық табиғаты бар су қоймасы болып табылатын Арал теңізінің бірқатар микроорганизмдерінің люминесценциясы туралы жаңа мәліметтер келтірілген. Кіші Аралдың су айдынын мекендейтін және тұщы су балықтарының ішектерін мекендейтін флуоресцентті бактериялардың кем дегенде екі *Vibrio* тұқымдасына жататын түрлерінің болуы көрсетілген. Тұщы су балықтарының өкілдерімен өзара әрекеттесудегі теңіз микрофлорасының ерекше мінез-құлқы, люминесцентті микроорганизмдердің жаңа экологиялық табиғатта мекендейтін орнын зерделеу үшін, алғашқы зерттеулер ретінде қызмет етуі мүмкін.

Алғыс

Авторлар Арал ауданы Аманөткел ауылының балықшыларына және олардың бригадирі Асылбекке үлгілерді жинап, микрофлораны бастапқы егу процесіне көмектескені үшін, сондай-ақ жолсеріктер Айбек Қарсыбаев пен Жомартқа алғыстарын білдіреді

Қаржыландыру

Бұл жұмыс РГНФ қаржылық қолдауымен орындалды, жоба № 22-14-00124.

Әдебиеттер:

- 1 Urbanczyk H., Ast J.C., Higgins M.J., Carson J., Dunlap P.V. 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*, 2007, 57:2823-2829 (doi: 10.1099/ijs.0.65081-0)
- 2 Soto W. Emerging Research Topics in the *Vibrionaceae* and the Squid-Vibrio Symbiosis. *Microorganisms*, 2022, 10(10):1946. doi: 10.3390/microorganisms10101946.
- 3 Urbanczyk H., Ast J.C., Kaeding A.J., Oliver J.D. and Dunlap P.V. Phylogenetic Analysis of the Incidence of lux Gene Horizontal Transfer in Vibrionaceae. *Journal of Bacteriology*, 2008. 190(10): 3494–3504 (doi: 10.1128/JB.00101-08)
- 4 Zavilgelsky G.B., Shakulov R.S. Mechanisms and Origin of Bacterial Bioluminescence. *Molecular Biology*, 2018, 52(6):935-947 (doi: 10.1134/S0026898418060186)
- 5 Melkina O.E., Kotova V.Yu., Konopleva M.N., Manukhov I.V., Pustovoit K.S. 6 Zavilgelsky, G.B. Photoreactivation of UV-exposed *Escherichia coli* K12 AB1886 *uvrA6* via luminescence of *Photobacterium leiognathi* luciferase. *Molecular Biology* 2015: 49(6): 928-932.
- 6 Nyholm S.V., Stewart J.J., Ruby E.G., McFall-Ngai M.J. Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environ. Microbiol.* 2009, 11(2):483-93 (doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01788.x.)
- 7 Soto W., Nishiguchi M.K. Microbial experimental evolution as a novel research approach in the vibrionaceae and squid-Vibrio symbiosis. *Front. Microbiol.*, 2014, 5:593 (doi.org/10.3389/fmicb.2014.00593)
- 8 Dunlap P. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 2014, 144:37-64 (doi: 10.1007/978-3-662-43385-0_2)

- 9 Yazdi M.M.N., Mashreghi M., Bahreini M., Oroojalian F., Pordeli P. Biochemical characteristics of luminescent *Vibrios* isolated from the Caspian Sea and the Persian Gulf. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44: S318 (doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.08.1015)
- 10 Зарубина А.П., Лукашев Е.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Рубин А.Б., Шойынбекова С.А., Жылқыбаев О.Т., Кұрманқұлов Н.Б. Люминисцентті бактериялардың тест-жүйелерін пайдаланып бір қабатты көміртекті нанотүтікшелердің биологиялық эффекттерін биотестілеу. *Вестник КазНУ. Серия биологическая*, 2012, 54(4):262-267
- 11 Bazhenov S.V., Novoyatlova U.S., Scheglova E.S., Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Kessenikh A.G., Kononchuk O.V., Gnuchikh E.Y., Liu Y., Al Ebrahim R., et al. Bacterial lux-biosensors: Constructing, applications, and prospects. *Biosens. Bioelectron.* X 2023, 13:100323, (doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100323)
- 12 Khrulnova S.A., Baranova A., Bazhenov S.V., Goryanin I.I., Konopleva M.N., Maryshev I.V., Zavilgelsky G.B. Lux-operon of the marine psychrophilic bacterium *Aliivibrio logei*: A comparative analysis of the LuxR1/LuxR2 regulatory activity in *Escherichia coli* cells. *Microbiology (United Kingdom)* 2016, 162(4):717-724. (doi: 10.1099/mic.0.000253)
- 13 Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology* 2018, 9:343795. (doi: 10.3389/FMICB.2018.00873)
- 14 Bazhenov, S. V.; Khrulnova, S.A.; Konopleva, M.N.; Manukhov, I. V Seasonal changes in luminescent intestinal microflora of the fish inhabiting the Bering and Okhotsk seas. *FEMS Microbiol. Lett.* 2019, 366, (doi.org/10.1093/femsle/fnz040)
- 15 Aladin N.V., Plotnikov I.S., Micklin P, and Ballatore T. Aral Sea: Water level, salinity and long-term changes in biological communities of an endangered ecosystem-past, present and future. *Natural Resources and Environmental Issues* 2009, 15:36
- 16 Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018, 35:1547–1549 (doi: 10.1093/molbev/msy096)
- 17 Alexyuk M., Bogoyavlenskiy A., Alexyuk P., Moldakhanov Y., Berezin V., Digel I. Epipelagic microbiome of the Small Aral Sea: Metagenomic structure and ecological diversity. *MicrobiologyOpen*, 2021, 10: e1142 (doi.org/10.1002/mbo3.1142)