

ORIGINAL ARTICLE

Assessment of Actinobacteria Role in Activity of Deep-water Endemic Amphipod Species Belonging to the Genus *Ommatogammarus*

Protasov E.S.^{1,§}, Axenov-Gribanov D.V.^{1,2,§,*},
Voytsekhovskaya I.V.¹, Timofeyev M.A.¹

¹ Research institute of Biology at Irkutsk State University. 664003 Irkutsk, 3 Lenin str., Russia

² ANO Baikal Research Centre. 664003 Irkutsk, 21 Lenin str., Russia

§ These authors contributed equally to this work

*Tel.: +7(3952) 24 30 77 (+116)

*E-Mail: denis.axengri@gmail.com

Received October 13, 2016

The aim of present study was to reveal the associations between the actinobacteria strains and Lake Baikal deep-water endemic amphipods. During the study forty-two actinobacteria strains were isolated from the amphipods belonging to the genus *Ommatogammarus* (*O. albinus* and *O. flavus*) which were caught from the depth 80 – 200 m. The analysis of part of the gene 16S rRNA revealed that obtained strains belonging to the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, and *Pseudonocardia*. The results of the investigation display that actinobacteria that produce antimicrobial compounds inhabit the organism of amphipods from the *Ommatogammarus* genus. It is assumed that actinobacteria might effect the metabolism of deep-water amphipod-scavengers. Besides, actinobacteria obtained from Lake Baikal endemic amphipods have potential pharmaceutical applications as the source of antibiotics. They also enlarge our understanding of relationships between microorganisms and endemic amphipods.

Key words: amphipods, actinobacteria, Lake Baikal, *Ommatogammarus* sp., endemics

Термин «симбиоз» с момента своего возникновения в 1879 году изменил свое значение, однако не утратил актуальности. Основоположник термина немецкий ботаник Антуан де Бари в своей работе «Die Erscheinung der Symbiose» описывал симбиоз, как сожительство видов в течение длительного времени, противопоставляя «симбиоз» понятиям «паразитизм» и «комменсализм» (Bonfante and Genre, 2010). Однако позже под симбиозом стали понимать любые виды сожительства. Таким образом, «симбиоз» стал более общим термином, включающим в себя разные по характеру взаимоотношения организмов друг с другом.

Одни из наиболее хорошо изученных симбиозов между беспозвоночными и микроорганизмами являются ассоциации губок и бактерий (Taylor *et al.*, 2007). Несмотря на то, что большинство исследований проведено на морских губках, некоторые из них также затрагивают тему пресноводных беспозвоночных и уникальных экосистем, как новых источников полезных штаммов актинобактерий и антибиотиков (Costa *et al.*, 2013; Duncan *et al.*, 2015; Ахенов-Gribanov *et al.*, 2015).

Одной из экосистем, уникальной по своим характеристикам - древней и мало изученной в аспекте актинобактериального разнообразия, является озеро Байкал и его обитатели. Озеро Байкал, объект мирового наследия ЮНЕСКО, расположено в Восточной Сибири. Это одно из самых древних озер планеты (около 25-30 млн. лет) и крупнейшее озеро по объему пресной воды. Озеро населено более чем 2500 видами животных при уровне эндемизма — 80% (Timoshkin *et al.*, 2001). Вся водная толща озера насыщена кислородом и характеризуется узким диапазоном температурных флуктуаций.

Данные факторы создают особые условия для каждого организма, обитающего в озере. В таких постоянных условиях беспозвоночные эволюционировали в течение последних миллионов лет. Одной из таких групп являются амфиподы (*Amphipoda*, *Crustacea*).

Амфиподы – неотъемлемая часть экосистемы озера Байкал. Байкальские амфиподы составляют 45,3% от мировой пресноводной фауны амфипод и представлены 276 видами и 78 подвидами со 100% эндемичностью (Takhteev *et al.*, 2015). Они населяют все экологические ниши озера от зоны литорали до абиссали. Особый интерес при этом представляют глубоководные амфиподы, которые, являясь падальщиками, играют важную роль в системе самоочистки озера.

Целью настоящего исследования являлось выявление ассоциаций между культивируемыми штаммами актинобактерий и глубоководными эндемичными амфиподами озера Байкал.

MATERIALS AND METHODS

Для настоящего исследования два вида амфипод рода *Ommatogammarus* - *O. albinus* и *O. flavus* - были выловлены с различных глубин в южной части озера Байкал возле поселка Большие Коты (51.9053° N, 105.0753° E). Представители вида *O. albinus* были выловлены с глубин 80 и 200 м, а вида *O. flavus* - с глубин 80, 100 и 200 м. Каждый образец включал от 3 до 5 амфипод. С каждой глубины отобрано по 5 образцов. Амфиподы были пойманы с применением глубоководных ловушек. Поднятые образцы амфипод были отмыты в воде, спирте и зафиксированы (гомогенизированы в 20% растворе глицерина), в соответствии с Ахенов-Gribanov *et al.* (2015).

Культивируемые штаммы актинобактерий выделены на твердых питательных средах. Шесть питательных сред (MS, ISP, крахмало-аммиачный агар, среда Гаузе №1, среда Ваксмана, среда Чапека), содержащих в своем составе антибиотики циклогексимид (50 мг/мл) и фосфомицин (100 мг/мл), были использованы для выделения чистых культур актинобактерий (Kieser et al., 2000). Аликвоты образцов были предварительно прогреты в течение 5 минут при температуре 50 °С для активации прорастания спор и подавления роста вегетативных клеток других бактерий. Культуры актинобактерий отобраны по морфологическим признакам и получены посредством инкубации микробиологических посевов гомогенатов амфипод в течение 30 дней при температуре 28 °С.

Идентификацию штаммов проводили посредством амплификации и секвенирования гена 16S рРНК с праймерами: 8F (AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG), 1510R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T), ACT235F (CGC GGC STA TCA GCT TGT TG) и ACT878R (CCG TAC TCC CCA GGC GGG G). Полученные нуклеотидные последовательности были собраны и депонированы в GenBank (NCBI).

Для изучения продукции биологически активных метаболитов и их экстракции, выделенные из амфипод штаммы культивировали на трех жидких питательных средах, в т.ч. NL-19, SG, ISP2. Штаммы культивировали при температуре 28 °С в течение 4 дней на шейкере при 180 rpm. Культуральная жидкость и биомасса были разделены центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин. Вторичные метаболиты экстрагированы этилацетатом из культуральной жидкости. Для биомассы использовали смесь ацетона и метанола в

соотношении 1:1. Полученные экстракты были сконцентрированы с помощью роторного испарителя IKA RV-8 (IKA, Germany) при 40 °С, а сухой остаток был растворен в 500 мкл метанола (Sigma, St. Louis, USA) (Sarker et al., 2000). Полученные экстракты были использованы для антибиотических диффузионных тестов против *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas putida* KT2440 и *Saccharomyces cerevisiae* BY4742.

RESULTS

В ходе исследования выделено 42 штамма актинобактерий. Из амфипод вида *O. albinus* выделено 13 штаммов актинобактерий. Из них 11 штаммов выделены из амфипод, собранных с глубины 80 м, и по одному штамму выделено из рачков, поднятых с глубин 100 и 200 м.

Из *O. flavus*, выловленных с разных глубин, выделено 29 штаммов. Из них 24 штамма было выделено из амфипод с глубины 200 м, а с глубин 80 и 100 м было выделено четыре и один штамм, соответственно.

Филогенетический анализ участка гена 16S рРНК выявил что 40 из 42 актинобактериальных штаммов принадлежат к роду *Streptomyces*. Два штамма принадлежат к родам *Micromonospora* и *Pseudonocardia*, соответственно (Таблица 1). Оба этих штамма были выделены из *O. albinus* с глубины 80 м. Полученные данные указывают на разнообразие актинобактерий, ассоциированных с глубоководными амфиподами рода *Ommatogammarus*.

Из 42 штаммов, выделенных из байкальских эндемичных глубоководных амфипод, только четыре штамма (*Streptomyces* sp. IB2015P61-1, *Streptomyces* sp. IB2015P113-15, *Streptomyces* sp. IB2015P114-1, *Streptomyces* sp. IB2015P122-1) не проявили антимикробной активности

против хотя бы одной тест-культуры. так и грибов. Число активных выделенных
Остальные выделенные штаммы штаммов представлено в таблице 2.
актинобактерий подавляли рост как бактерий,

Table 1. Штаммы актинобактерий, выделенные из глубоководных амфипод рода *Ommatogammarus*

№	Штамм	Источник выделения	Глубина, м	ID GenBank
1	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P60-1	<i>O. ablinus</i>	80	KX539267
2	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P60-1HS	<i>O. ablinus</i>	80	KX539268
3	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P60-2	<i>O. ablinus</i>	80	KX539269
4	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P60-2HS	<i>O. ablinus</i>	80	KX539270
5	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P60-3	<i>O. ablinus</i>	80	KX539271
6	<i>Micromonospora</i> sp. IB 2015P61-1	<i>O. ablinus</i>	80	KX539272
7	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P61-3	<i>O. ablinus</i>	80	KX539273
8	<i>Pseudonocardia</i> sp. IB 2015P62-1HS	<i>O. ablinus</i>	80	KX531081
9	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P63-1HS	<i>O. ablinus</i>	80	KX531082
10	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P64-1	<i>O. ablinus</i>	80	KX531083
11	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P64-2	<i>O. ablinus</i>	80	KX531084
12	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P65-1	<i>O. flavus</i>	80	KX531085
13	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P66-2	<i>O. flavus</i>	80	KX531086
14	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P67-2	<i>O. flavus</i>	80	KX531087
15	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P69-1	<i>O. flavus</i>	80	KX531088
16	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P102-1	<i>O. flavus</i>	100	KX531089
17	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P104-1	<i>O. albinus</i>	100	KX531090
18	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-1	<i>O. flavus</i>	200	KX539274
19	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-2	<i>O. flavus</i>	200	KX539275
20	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-3	<i>O. flavus</i>	200	KX539276
21	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-4	<i>O. flavus</i>	200	KX539277
22	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-5	<i>O. flavus</i>	200	KX539278
23	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-6	<i>O. flavus</i>	200	KX539279
24	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-7	<i>O. flavus</i>	200	KX539280
25	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-8	<i>O. flavus</i>	200	KX539281
26	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-9	<i>O. flavus</i>	200	KX539282
27	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-10	<i>O. flavus</i>	200	KX539283
28	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-11	<i>O. flavus</i>	200	KX539284
29	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-12	<i>O. flavus</i>	200	KX539285
30	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-13	<i>O. flavus</i>	200	KX539286
31	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-14	<i>O. flavus</i>	200	KX539287
32	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-15	<i>O. flavus</i>	200	KX539288
33	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P113-16	<i>O. flavus</i>	200	KX539289
34	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P114-1	<i>O. flavus</i>	200	KX539290
35	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P114-2	<i>O. flavus</i>	200	KX539291
36	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P117-1	<i>O. flavus</i>	200	KX539292
37	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P118-1	<i>O. flavus</i>	200	KX539293
38	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P119-1	<i>O. flavus</i>	200	KX539294
39	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P119-2	<i>O. flavus</i>	200	KX539295
40	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P119-3	<i>O. flavus</i>	200	KX539296
41	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P119-5	<i>O. flavus</i>	200	KX539297
42	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2015P122-1	<i>O. ablinus</i>	200	KX539298

Table 2. Антибиотическая активность штаммов актинобактерий, выделенных из амфипод рода *Ommatogammarus* в диапазоне глубин 80 – 200 м

Число выделенных штаммов на образец	80 м	100 м	200 м
Число выделенных штаммов	15	2	25
Выделено из <i>O. albinus</i>			
Число активных штаммов, в т.ч.	10	1	0
Активны против бактерий	5	1	0
Активны против грибов	9	1	0
Число неактивных штаммов	1	0	1
Выделено из <i>O. flavus</i>			
Число активных штаммов, в т.ч.	4	1	21
Активны против бактерий	4	1	16
Активны против грибов	4	1	15
Число неактивных штаммов	0	0	3

DISCUSSION

Как показывают результаты настоящего исследования, из представителей глубоководных эндемичных амфипод озера Байкал выделено 42 штамма актинобактерий. Анализ числа штаммов актинобактерий, выделенных из амфипод, принадлежащих к роду *Ommatogammarus*, выловленных в диапазоне глубин 80 – 200 м, показывает, что между числом выделенных культур, глубиной, с которой выловлены амфиподы, и самим источником выделения, каких-либо корреляций не наблюдается. В то же время, обнаружены видоспецифические особенности. Так, число культивируемых штаммов актинобактерий, обнаруженных в *O. albinus* снижается в градиенте глубин от 80 (число штаммов 11) до 200 м (число штаммов 1). В случае *O. flavus*, число штаммов, напротив, возрастало с глубиной. Это может быть связано с экологией изучаемых видов амфипод, в частности, с их высоким уровнем активности и способности амфипод к активным движениям и миграциям

по градиенту глубин (Timoshkin et al., 2001). Упомянутые миграции обусловлены сезонными факторами и/или пищевым поведением.

По результатам полученных материалов обнаружена слабая корреляция между активностью штаммов и глубиной вылова амфипод. Выявлено, что число активных штаммов, выделенных из амфипод, обитающих на глубине 80 м, выше, чем число активных штаммов, выделенных из амфипод, собранных на глубине 200 м. Так, с глубины 80 м проявили антибиотическую активность 93% штаммов, против 88% штаммов, собранных с глубины 200 м.

Данные особенности могут быть обусловлены уменьшением или снижением резистентных способностей бактерий, обитающих в более стабильных условиях озера. Подобное снижение резистентных способностей было обнаружено у некоторых антарктических эукариотических организмов и некоторых термочувствительных гидрозой, которые потеряли способность к синтезу белков

теплового шока (Hofmann, 2005; Terza La *et al.*, 2007) при эволюции в стабильных условиях.

Таким образом, с одной стороны - вопрос о том - является ли снижение стресс-ответа и механизмов защиты против бактериальных патогенов результатом эволюции в условиях высокой стабильности, остаётся открытым и требует дальнейшего исследования. С другой стороны известно, что биоразнообразие организмов прибрежной зоны выше, чем разнообразие видов, обитающих в абиссали. Обитание бактерий в области малых глубин связано с высокой вероятностью встречи актинобактерий с известными патогенами и продуктами человеческой жизнедеятельности. В то же время, обитание бактерий вдали от уреза вода и на больших глубинах может повлечь за собой уменьшение числа патогенов, встречаемых в наземных экосистемах, и снижению числа активных штаммов. Следовательно, выделение штаммов актинобактерий с больших глубин и отдалённых от берега областей должно привести к обнаружению специфической (узко направленной) активности бактерий против патогенов животных и специфическим механизмам действия антибиотиков.

Среди животных, населяющих озеро Байкал, наиболее интенсивно изучено микробное сообщество губок. Ранние исследования губок, принадлежащих к родам *Swartschewskia*, *Baicalospongia*, и *Lubomirskia* с помощью классических методов показали, что актинобактерии из родов *Streptomyces* и *Micromonospora* являются постоянным компонентом бактериального сообщества. Исследования, проведенные Парфеновой В.В. и др. (2008) показали, что род *Micromonospora* доминирует среди культивируемых актинобактерий во всех изученных губках из

озера Байкал (Parfenova *et al.*, 2008). Несмотря на то, что к настоящему времени проведено множество исследований культивируемых и некультивируемых штаммов актинобактерий, выделенных из воды, осадков, и губок, материалы настоящего исследования являются первым результатом, описывающим разнообразие культивируемых актинобактерий в глубоководных амфиподах озера Байкал. Также настоящее исследование является первым сообщением о выделении актинобактерий, принадлежащих к родам *Micromonospora* и *Pseudonocardia*, из байкальских эндемичных амфипод. Ранее из амфипод рода *Brandtia* sp. выделено 10 штаммов актинобактерий, принадлежащих к родам *Aeromicrobium* sp., *Nocardia* sp., *Streptomyces* sp., а из амфипод вида *Pallasea cancellous* был выделен один штамм - представитель *Nocardia* sp. (Axenov-Gribanov *et al.*, 2015).

Известно, что микроорганизмы, ассоциированные с амфиподами, могут разлагать сложные субстраты, например, целлюлозу и хитин (Anderson *et al.*, 2012). Так, амфиподы могут получать дополнительное питание от ассоциированной с ними микрофлоры. Ввиду низкого уровня органического вещества в воде озера Байкал, данное свойство актинобактерий может играть существенную роль в питании амфипод. Также ранее показано, что бактериальная биомасса, образующаяся в детритовых пищевых цепях, является частью энергетического обмена арктических амфипод (Atlas and Busdosh, 1982). Исследованиями Barlocher (1982) показано, что грибные ферменты расщепляют структурные углеводы в кишечнике амфипод *Gammarus fossarum* (Barlocher, 1982). Кроме того, существует доказательство того, что отдельные

амфиподы обладают постоянной и транзитной микрофлорой, а некоторые глубоководные морские амфиподы из зоны абиссали обладают постоянной микрофлорой, участвующей в питании организма-хозяина (Deming *et al.*, 1981).

Таким образом, результаты данного исследования показывают, что в организмах амфипод рода *Ommatogammarus* обитают актинобактерии, которые продуцируют соединения с антимикробной активностью. Предполагается, что последние могут оказывать влияние на метаболизм глубоководных амфипод-падальщиков. Кроме того, актинобактерии, выделенные из байкальских эндемичных амфипод, обладают высоким фармацевтическим потенциалом в качестве источников антибиотиков и биологически активных соединений и расширяют понимание взаимоотношений между микроорганизмами и эндемичными амфиподами.

ACKNOWLEDGEMENTS

Исследование проведено при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, в т.ч. проектов Госзадания (№6.382.2014/К, 6.734.2016 DAAD, 6.696.2016 DAAD), гранта РНФ (№ 14-14-00400), РФФИ (№ 14-04-00501, 16-34-00686), грантом Иркутского государственного университета для молодых ученых и немецкой службой академических обменов.

REFERENCES

Anderson I., Abt B., Lykidis A., Klenk H.P., Kyrpides N., Ivanova N. (2012) Genomics of aerobic cellulose utilization systems in actinobacteria. *PLoS One*, **7**:e39331.

Atlas R., Busdosh M. (1982) Bacterial populations associated with the Arctic amphipod

Boeckosimus affinis. *Canadian Journal of Microbiology*, **28**, 92–99.

Axenov-Gribanov D., Rebets Y., Tokovenko B., Voytsekhovskaya I., Timofeyev M., Luzhetskyy A. (2015) The isolation and characterization of actinobacteria from dominant benthic macroinvertebrates endemic to Lake Baikal. *Folia Microbiologica*, **61**(2):159-168.

Barlocher F (1982) The contribution of fungal enzymes to the digestion of leaves by *Gammarus fossarum* Koch (Amphipoda). *Oecologia*, **52**, 5–8.

Barlocher F. (1981) Fungi on the food and in the faeces of *Gammarus pulex*. *Transactions of the British Mycological Society*, **76**,160–165.

Bonfante P., Genre A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*, **1**, 48.

Costa R., Keller-Costa T., Gomes N.C., da Rocha U.N., van Overbeek L., van Elsas J.D. (2013) Evidence for selective bacterial community structuring in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Microbial ecology*, **65**(1), 232-244.

Deming J., Tabor P., Colwell R. (1981) Barophilic growth of bacteria from intestinal tracts of deep-sea invertebrates. *Microbial Ecology*, **7**(1), 85–94.

Duncan K.R., Crüsemann M., Lechner A., Sarkar A., Li J., Ziemert N., Wang M., Bandeira N., Moore B., Dorrestein P., Jensen P. (2015) Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species. *Chemical Biology*, **22**, 460–471.

Kieser B, Buttner M, Charter K, Hopwood B (2000) *Practical streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich.

Parfenova V.V., Terkina I.A., Kostornova T.Y.,

- Nikulina I.G., Chernikh V.I., Maksimova E.A. (2008) Microbial community of freshwater sponges in Lake Baikal. *Biological Bulletin*, **35**, 374–379.
- Takhteev V.V., Berezina N.A., Sidorov D.A. (2015) Checklist of the Amphipoda (Crustacea) from continental waters of Russia, with data on alien species. *Arthropoda Selecta*, **24**, 335–370.
- Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and molecular biology reviews*, **71(2)**, 295-347.
- Timoshkin O.A., Sitnikova T.Y., Rusinek O.T., Pronin N.M., Proviz V.I., Mel'nik N.G., Kamaltynov R.M., Mazepova G.F., Adov F.V., Anohin B.A., Arov I.V., Baldanova D.R., Biserov V.I., Bondarenko N.A., Burdukovskaja T.G., Grajger M.Dzh., Danilov S.N., Dzjuba E.V., Dubeshko L.N., Dugarov Zh.N., Dudichev A.L., Evstigneeva T.D., Efremova S.M., Zhil'cova L.A., Kavakatsu M., Korgina E.M., Korobkova N.V., Krickaja U.A., Kutikova L.A., Ljamkin V.F., Natjaganova A.V., Naumova T.V., Nekrasov A.V., Novikova O.A., Obolkina L.A., Okuneva G.L., Podtjzhkina M.M., Pomazkova G.I., Popov V.V., Pronina S.V., Rozhkova N.A., Sanzhieva S.D., Semernoj V.P., Sideleva V.G., Slugina Z.V., Starobogatov Ja., Stepan'janc S.D., Tanichev A.I., Tuzovskij P.V., Hamnueva T.R., Calolihin S.Ja, Sheveleva N.G., Shibanova I.V., Shirokaja A.A., Shoshinin A.V. (2001) *Index of animal species inhabiting Lake Baikal and its catchment area*, Novosibirsk: Nauka.