

**Широбоков В.П.¹, Понятовський В.А.¹, Юришинець В.І.²,
Чоботар А.П.¹, Саламатін Р.В.³**

¹ Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця,
м. Київ, пр. Перемоги 34, 03056, Україна;

² Інститут гідробіології НАН України,
м. Київ просп. Героїв Сталінграда 12, 04210, Україна;

³ Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, Rzeczpospolita Polska.

ВІЛЬНОІСНУЮЧІ АМЕБИ ЯК ПРЕДСТАВНИКИ ЕУКАРІОТО-ПРОКАРІОТИЧНОГО КОНСОРЦІУМУ БЕНТОНІТОВИХ ГЛИН

Мета роботи: дослідження різноманіття прокаріото-еукаріотичних мікроконсорціумів бентонітових глин. **Методи:** в дослідженнях використано класичні мікробіологічні та протистологічні методи виділення та накопичення мікроорганізмів, мікроскопічні методи дослідження морфологічних особливостей, осмо- та термотолерантний тести для оцінки патогенного потенціалу вперше знайдених «бентонітових» амєб та сучасні молекулярно-біологічні методи (ПЛР, секвенування) для визначення систематичного положення ізольованих мікроорганізмів. **Результати:** виділено та охарактеризовано представників еукаріото-прокаріотичних консорціумів бентонітових глин. Проведено морфологічне та молекулярно-генетичне типування ізольованих амєб та бактерій, що використовуються амєбами як харчовий елемент – «годувальники». Встановлено, що «бентонітові» амєби відносяться до представників роду *Acanthamoeba*. Визначено їх патогенний потенціал, та показано, що вони здатні до активної взаємодії із умовно-патогенними мікроорганізмами. Дана модель може бути використана для дослідження ролі вільноіснуючих амєб в процесах поширення та виживання патогенних мікроорганізмів в зовнішньому середовищі.

Ключові слова: бентоніт, амєби, культивування.

Бентонітові глини – мінеральна сировина багатоцільового призначення, яка характеризується сукупністю корисних фізико-механічних і хімічних властивостей, таких, як пластичність, здатність до набрякання, висока сорбційна активність [1].

Бентонітові глини (смектити або монтморилоніти) поширені на земній кулі. Здебільшого вони мають вулканічне походження і виникли у Мезозойську еру (більше, ніж 170 млн років тому) внаслідок переважно вулканічної діяльності. Бентоніти – це природні алюмосилікати, мають відповідну кристалічну решітку. Вони характеризуються вираженими адсорбційними властивостями і широко застосовуються для очистки нафтопродуктів, вина, сукна та шерсті. На сьогодні монтморилонітові глини знайшли чимале використання як природні мінеральні бар'єри проти поширення техногенних забруднювачів і як середовища для захоронення радіоактивних відходів. Монтморилоніт, каолініт та інші глинисті мінерали все частіше застосовуються у ветеринарії та медицині як ентеросорбенти [2].

Як відомо, бактерії мають убіквітарне поширення, вони широко представлені в природних ґрунтах, в їх нижніх шарах та гірських породах і знаходяться в постійному контакті з глинистими мінералами. Є безліч способів, за якими бактерії можуть взаємодіяти з глинистими мінералами і змінювати їх – це розчинення, модифікація, трансформація та зміна мікроелементного складу [3].

Тому важливим питанням науково-практичного значення є вивчення складу прокаріото-еукаріотичних консорціумів в глинистих екосистемах, їх структури та особливостей біологічної активності. Саме це є основною метою нашого дослідження.

Матеріали і методи. *Відбір зразків бентоніту.* Всі проби бентоніту було відібрані на території України в наступних родовищах:

Черкаське (Дашуківське) родовище — родовище бентонітових глин, розташоване в Лисянському районі Черкаської області, найбільше в Україні і Європі та одне з найбільших у світі; тут знаходиться понад 90% всіх запасів бентонітів в Україні. Глини залягають на глибині 10-40 м. Потужність продуктивної товщі від 0,5 до 43 м. Велике родовище, величина запасів якого понад 20000 тис. т. Глини бейде-літ-монтморилонітового складу.

Закарпатське (Горбське) родовище – величина запасів середня, від 3000 до 20000 тис. т., розробляється.

Кримське (Курцівське) родовище – величина запасів мала, до 3000 тис. т. Глини монтморилонітового складу. На даний момент законсервоване [4].

Культивування амеб. Ізольовані варіанти амеб культивували моноексично на МПА (пептичний перевар тваринної тканини – 5 г/л; м'ясний екстракт – 1,5 г/л; дріжджовий екстракт – 1,5 г/л; хлорид натрію – 5,0 г/л; глюкоза 10 г/л) з попереднім засівом бактерій *Cellulosimicrobium sp.* Культивування здійснювали при температурі 35°C протягом 5 днів. Видимий ріст амеб розпочинався з 2-3 доби.

Мікроскопічне дослідження. Морфологічні особливості амеб досліджували з використанням електронної (мікроскоп електронний JEM-100CX) та фазово-контрастної (мікроскоп Carl Zeiss AxioPlan) мікроскопії.

Термо- і осмотолерантний тести. Дані дослідження спрямовані на визначення потенційної патогенності амеб. Термотолерантний тест проводили на середовищі МПА із попереднім засівом бактерій *Cellulosimicrobium sp.* Один посів інкубували при температурі 37°C, інший - при 40°C. Термін інкубації складав 7 діб. Після закінчення визначали наявність росту візуально та з використанням світлового мікроскопу. Осмотолерантний тест проводили на середовищі МПА, що містило 0,5 та 1,0 М манітолу. Культивування проводили протягом 7 діб при температурі 37°C. Візуалізацію проводили, як при термотолерантному тесті [5,6].

ДНК екстракція. Екстракцію ДНК проводили із чистих культур, що були вирощені на 1 % глюкозному МПА протягом 24 (бактерії) та 96 годин (амеби). ДНК виділяли шляхом сорбції її на силікагелі за Boom et al. [7].

ПЛР-аналіз. ДНК амеб ампліфікували з використанням родо-специфічних JDP праймерів: прямий JDP1 (5'- GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA) та зворотній JDP2 (5'- TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA). Дана пара

праймерів ампліфікує фрагмент протяжністю ≈ 500 нп. ПЛР ампліфікацію гену 16S рРНК бактерій-годувальників здійснювали з використанням універсальних праймерів: 27F 5'>AGAGTTTGATCMTGGCTCAG<3' та 1492R (s) 5'>GGTTACSTTGTTACGACTT<3'.

Програма ПЛР-ампліфікації включала в себе тривалу денатурацію протягом 5 хвилин при 95°C; 30 циклів: 95°C – 30 с, 55°C – 40 с, 72°C – 50 с; фінальну елонгацію 72°C – 7 хвилин. Загальний об'єм проби складав 25 мкл. Суміш містила: 2 мкл ізольованої ДНК, 1ОД. Taq DNA Polymerase, 0,2 мМ кожного дНТФ, 1-х ПЛР буфер з 2,5 мМ MgCl₂, 10 пмоль кожного праймеру [8].

Аналіз ампліфікованих ділянок ДНК проводили методом розділення фрагментів ДНК в агарозному 1,5 % гелі в присутності інтеркалюючого агенту – бромистого етидію. Виділення ДНК із агарозного гелю здійснювалося із використанням пакету реагентів «Gel-Out izolacja DNA z żeli agarozowych» (© Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Poland), у відповідності до інструкції виробника.

Секвенування ПЛР продуктів. ПЛР продукти із ізольованих амеб та бактерій секвенували з використанням апарату ABI3730 Genetic Analyzer (Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk).

Результати та їх обговорення. При одержанні гелів бентоніту за розробленою нами методикою [9], було помічено, що звичайні режими автоклавування (0,5 атм, 121°C) не забезпечують повної стерилізації препарату. Клаптева структура гелю бентоніту, його багат шаровість є потужними факторами, що сприяють виживанню мікроорганізмів навіть при автоклавуванні. Деякі автори, які також зіткнулися з подібним явищем, порівнюють багат шаровий гель бентоніту з «гігантською спорою» в якій мікроби здатні виживати в екстремальних умовах.

Вперше вільноіснуючі амеби із зразків бентоніту вдалося виділити, використовуючи загальноприйнятий спосіб ізоляції даних мікроорганізмів на поживних середовищах із попереднім засівом *E. coli* [10]. Найкраще себе зарекомендувала *E. coli B* (ATCC 8739), дещо гірше ріст проявлявся з використанням *E. coli* (ATCC 25922). Однак, недоліком даного способу культивування амеб було погана відтворюваність результатів. Не вдалося також моноксенічно культивувати ізольовані амеби з використанням мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), що деякими дослідниками застосовуються для ізоляції та накопичення амеб [11]. Подальше дослідження еукаріото-прокаріотичних консорціумів бентонітових глин дало можливість ізолювати бактерії-годувальники, які виявилися найбільш оптимальною системою для культивування та використовувалися амебами як харчовий субстрат. Детальне дослідження морфологічних, культуральних та біохімічних особливостей, а також проведення сіквенс-аналізу гену 16S РНК, дало можливість віднести ізольовані мікроорганізми до роду грампозитивних бактерій *Cellulosimicrobium* (рис.1).

Оптимальний ріст бентонітових амеб на газоні бактерій-годувальників спостерігався на щільному МПА з 1% вмістом глюкози. Замість глюкози були придатні й інші вуглеводи – гексози і дигексози (сахароза). Помітно гірший ріст спостерігався на середовищах з багатоатомними спиртами. При застосуванні МПА без вуглеводів також вдалося культивувати амеби,

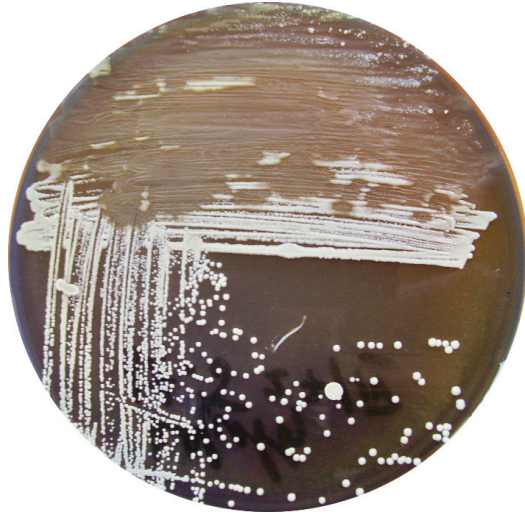


Рис.1. Зона просвітлення на газоні бактерій *Cellulosimicrobium sp.*, 4-а доба після посіву амеб від краю чашки Петрі.

але ріст дослідних мікроорганізмів був повільний та ледь помітний. Цікавим залишається факт залежності росту амеб від походження та ступеню очистки агар-агару, що входить до складу поживного середовища. При додаванні різних варіантів агар-агару до м'ясо-пептонного бульйону різко змінювалася інтенсивність росту амеб – від рясного інтенсивного росту до повної його відсутності. Дане явище потребує подальшого детального дослідження. На рідкому поживному середовищі (глюкозний МПБ) амеби майже не росли, ріст відмічався лише у верхніх шарах середовища як білий наліт на стінці пробірки. Кращий ріст був у колбах Ерленмейєра, у дуже тонкому (2-4 мм) шарі 1 % глюкозного МПБ.

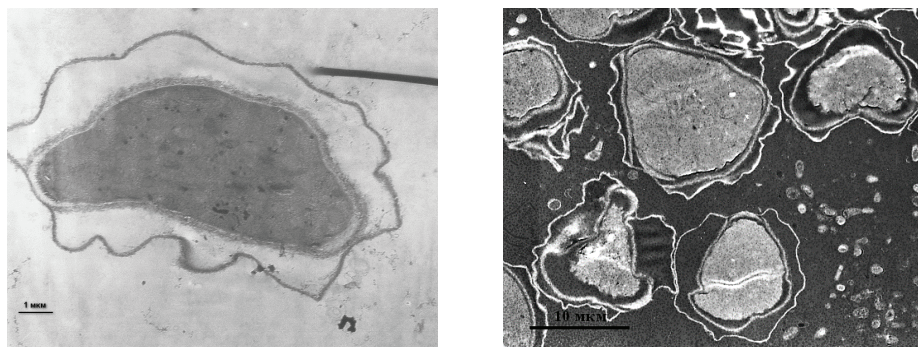
Вільноіснуючі амеби були ізолювані із зразків всіх трьох родовищ бентоніту (Дашуківське, Курцівське, Горбське).

При використанні секвенування ПЛР продуктів були отримані нуклеотидні послідовності протяжністю в 421 та 417 нп. Проведений подальший аналіз одержаних послідовностей гену 18S рРНК з використанням баз даних GenBank та EMBL підтвердив приналежність виділених амеб до представників роду *Acanthamoeba*. При здійсненні порівняльного співставлення нуклеотидних послідовностей було показано наявність відмінностей між трьома штамми. Ізолювані мікроорганізми були названі відповідно *Acanthamoeba sp. штам Крим*, *штам Черкаси* та *штам Карпати*.

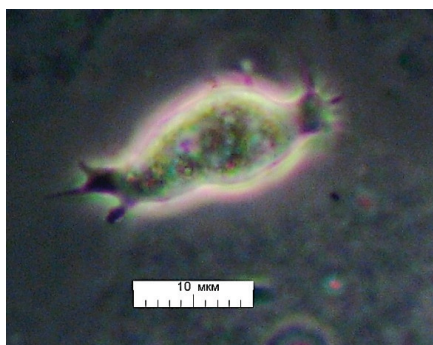
Для вивчення морфологічних особливостей ізолюваних амеб застосовували фазово-контрастну систему (об'єктиви 100x і 40x) та світлову імерсійну систему з об'єктивом 100x при дослідженні зафарбованих препаратів. Переважно використовували фарбування за методом Грама, в окремих випадках за Романовським-Гімзою, Цилем-Нільсеном. Дослідження показали, що амеби, незалежно від штамової належності, проходять закономірний цикл розвитку: спора – трофозоїт – передспора – спора.

Використовуючи традиційну класифікацію Pussard & Pons (1977) [12], що базується на характеристичні морфологічних особливостей, всі три ва-

ріанти амеб були віднесені до 3-ї морфологічної групи (рис. 2).



а.



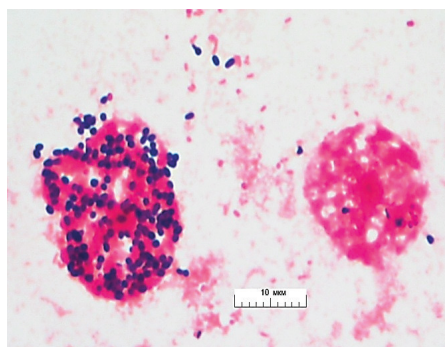
б.



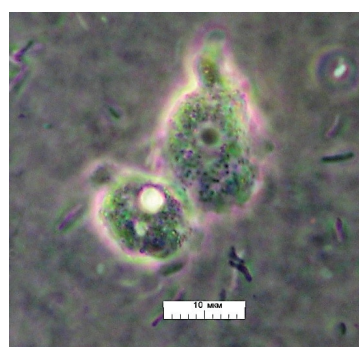
в.

Рис. 2. Морфологічні особливості «бентонітових» амеб: а – електронна мікроскопія спор амеб; б – трофозойт амеб Закарпатського родовища (фазовий контраст); в – перехід передспор у стадію спори (фазовий контраст).

Важливою особливістю «бентонітових» амеб є наявність в певній частині амебних клітин рухливих зерен, які за морфологією нагадують кокові бактерії (виявлення рухливості у вологих камерах близько року). Їх величина наближається до 1 мкм, фарбуються вони грампозитивно (на відміну від парахламідій, які описані як ендосимбіонти у акантамеб) [13] (рис. 3).



а.

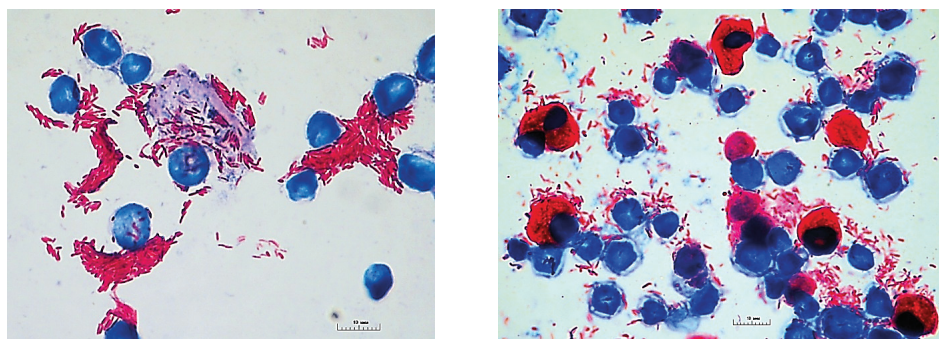


б.

Рис. 3. Ендосимбіонти «бентонітових» амеб. а – фарбування за Грамом; б – фазовий контраст.

Попередньо проведені нами дослідження також вказують на те, що «бентонітові» амеби можуть активно взаємодіяти з патогенними для людини вірусами і бактеріями.

Амеби можуть тривалий час зберігати збудника в цитоплазмі, і таким чином, виконувати роль своєрідного «троянського коня». Висловлене припущення підтверджується результатами дослідження взаємодії амеб з умовно-патогенними мікобактеріями: *Mycobacterium terrae* та *Mycobacterium smegmatis* (близькими за властивостями до збудників туберкульозу людини). Після контакту з вказаними бактеріями останні декілька місяців висівалися з культури амеб. Мікроскопічні дослідження підтверджують інтенсивне розмноження мікобактерій поблизу амеб, а також знаходження їх в цитоплазмі найпростіших (рис. 4).



а.

б.

Рис. 4. Взаємодія бентонітових амеб з мікобактеріями: а – *Mycobacterium smegmatis*; б – *Mycobacterium terrae*. Фарбування за Цилем-Нільсеном.

Представлені дані піднімають питання щодо епідеміологічного і екологічного значення вільноіснуючих амеб, а також можливого використання зручної моделі «бентонітових» амеб для дослідження цієї проблеми.

Для встановлення патогенного потенціалу ізольованих штамів *Acanthamoeba sp.* використовували термотолерантний та осмотолерантний тести [14.15]. Отримані експериментальні дані свідчать про наявність в дослідних штамів помірної осмотичної резистентності (наявність росту при концентрації маніту 0,5 М) та терморезистентності (наявність росту при температурі 37°C). Це вказує на можливий патогенний потенціал для людей та тварин в усіх трьох штамів «бентонітових» амеб (таблиця 1).

Таблиця 1

Біологічні властивості ізольованих амеб

Штам	Осмотолерантний тест		Термотолерантний тест		
	0,5 М	1,0 М	Ріст при температурі 25°C	Ріст при температурі 37°C	Ріст при температурі 40°C
<i>Acanthamoeba sp.</i> штам Крим	+	-	+	+	-
<i>Acanthamoeba sp.</i> штам Карпати	+	-	+	+	-
<i>Acanthamoeba sp.</i> штам Черкаси	+	-	+	+	-

Таким чином, в ході проведених експериментальних досліджень виділено та охарактеризовано окремих представників мікробних співтовариств бентонітових глин.

Необхідним є подальше дослідження морфологічних особливостей «бентонітових» амеб, здійснення детального молекулярно-генетичного дослідження з визначенням безпосередньо генотипу ізольованих амеб, а також встановлення можливості переживання в амебах патогенних бактерій та вірусів як у резервуарі.

**Широбоков В.П.¹, Понятовский В.А.¹, Юришинец В.И.²,
Чоботар А.П.¹, Саламатин Р.В.³**

¹ Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца,
г. Киев, пр. Победы 34, 03056, Украина;

² Институт гидробиологии НАН Украины,
г. Киев просп. Героев Сталинграда 12, 04210, Украина;

³ Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa, Rzeczpospolita Polska.

СВОБОДНОЖИВУЩИЕ АМЕБЫ КАК ПРЕДСТАВИТЕЛИ ЭУКАРИОТО-ПРОКАРИОТИЧЕСКОГО КОНСОРЦИУМА БЕНТОНИТОВЫХ ГЛИН

Резюме

Цель работы: исследование разнообразия прокариото-эукариотических микросорциумов бентонитовых глин. **Методы:** в исследованиях использованы классические микробиологические и протистологические методы выделения и накопления микроорганизмов, микроскопические методы исследования морфологических особенностей, осмо- и термотолерантны тесты для оценки патогенного потенциала впервые найденных «бентонитовых» амеб, современные молекулярно-биологические методы (ПЦР, секвенирование) для определения систематического положения изолированных микроорганизмов. **Результаты:** выделены и охарактеризованы представители эукариото-прокариотических консорциумов бентонитовых глин. Проведено морфологическое и молекулярно-генетическое типирование изолированных амеб и бактерий, используемых амебами в качестве пищевого элемента – «кормильцев». Установлено, что «бентонитовые» амебы относятся к представителям рода *Acanthamoeba*. Определен их патогенный потенциал, и показано, что они способны к активному взаимодействию с условно-патогенными микроорганизмами. Данная модель может быть использована для исследования роли свободноживущих амеб в процессах распространения и выживания патогенных микроорганизмов во внешней среде.

Ключевые слова: бентонит, амебы, культивирования.

**Shyrobokov V.P.¹, Poniatovskiy V.A.¹, Yuryshynets V.I.²,
Chobotar A.P.¹, Salamatina R.V.³**

¹ National Bogomolets Medical University, 34, Peremogy ave, Kyiv, Ukraine, 03056;

² Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12, Heroes of Stalingrad ave, Kyiv, Ukraine, 04210;

³ Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa, Rzeczpospolita Polska.

**FREE-LIVING AMOEBAS AS A REPRESENTATIVES OF BENTONITE CLAY'S
PROKARYOTIC-EUKARYOTIC CONSORTIUM**

Summary

Objective: Investigation of the diversity of prokaryotic-eukaryotic microconsortia in the clay. **Methods:** Classical microbiological and protozoological methods of isolation and accumulation of microorganisms were used in this investigation. Also there were used the microscopic methods to study the morphological features and osmo- and thermo-tolerant tests to evaluate the pathogenic potential of first found «bentonite» amoebas. The modern molecular genetic methods (PCR, sequencing) were used to identify systematic position of isolated microorganisms. **Results:** The representatives of prokaryotic-eukaryotic consortia in bentonite clays have been isolated and characterized. A morphological and molecular-genetic typing of the isolated amoebas and “feeders” (bacteria which amoebas fed by) has been conducted. The «bentonite» amoebas have been recognized to belong to the genus of *Acanthamoeba*. The pathogenic potential of amoebas has been determined; their active interaction with opportunistic microorganisms has been shown as well. This model can be used to study the role of free-living amoebas in the spread and survival process of pathogens in the environment.

Keywords: bentonite, amoeba, cultivation.

1. Andrieieva OO, Heoloho-ekonomichnyi analiz mineralno-syrovynnoi bazy bentonitovykh hlyn Ukrainy: avtoref. dys. ... kand. ekonom. ekoloh. nauk : 04.00.19 / Andrieieva Olena Oleksandrivna. – Kyiv, 2011 – 22 s. Ukrainian.
2. Shyrobokov VP, Yankovskij DS, Dyment HS. Mikroby v biogeokhimicheskikh procesakh, evolyucii biosfery i sushchestvovanii chelovechestva. Kyiv: Veres O.I.; 2014. Ukrainian.
3. MUELLER B. Experimental Interactions Between Clay Minerals and Bacteria: A Review. *Pedosphere*. 2015; 25(6): 799-810.
4. Andrieieva O & Kurylo M. Vykorystannia suchasnykh klasyfikatsii zapasiv i resursiv pry otsinkakh vitchyznianskykh rodovyshch bentonitovykh hlyn. *Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenka*. 2013; 1 (60): 56-58. Ukrainian.
5. Niyiyati M, Behniafar H, Lasjerdi Z. Molecular Characterization of Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from Drinking and Recreational water in East Azerbaijan, Northwest Iran. *Environmental Health Insights*. 2015; :7.
6. Khan N. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006; 30 (4):564-595.
7. Boom R, Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-van P. M. E. Dillen, and van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28(3): 495-503.

8. Schroeder J, Booton G, Hay J, Niszl I, Seal D, Markus M et al. Use of Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of Acanthamoebae from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(5):1903-1911.
9. Shyrobokov VP, Yankovskyi DS, Dymant HS & Bobyr VV. (patentee) (2009) Sposib oderzhannia heliu bentonitu dlia medychnykh tsilei Patent № 45163 Ukrayina (korysna model) A 61 K 35/66, A 61 K 35/74. *Bulleten*, 20. Ukrainian.
10. Schuster F. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15(3): 342-354.
11. Eroğlu F, Evyapan G, Koltaş İ. The cultivation of Acanthamoeba using with different axenic and monoxenic media. *MIDDLE BLACK SEA JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*. 2015; 1(3): 13-17.
12. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 1977; 13 (4): 557-598.
13. Rolf Michel, Karl-Dieter Müller, Lothar Zöller, Julia Walochnik, Mathias Hartmann and Ernst-N. Schmid. Free-living Amoebae Serve as a Host for the Chlamydia-like Bacterium *Simkania negevensis*. *Acta Protozool*. 2005; 44: 113-121.
14. Griffin JL. Temperature Tolerance of Pathogenic and Nonpathogenic Free-Living Amoebas. *Science*. 1972; 178: 869.
15. Khan N, Jarroll E, Paget T. Acanthamoeba Can Be Differentiated by the Polymerase Chain Reaction and Simple Plating Assays. *Current Microbiology*. 2001; 43(3): 204-208.

Отримано 15.02.2017