

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ АССОЦИИРОВАННОЙ МИКРОФЛОРЫ ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБ: РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС

© 2010 Н.Л. Белькова^{1,3}, Е.В. Суханова¹, Н.Н. Деникина¹, О.Т. Русинек^{2,3},
Е.В. Дзюба¹

¹ Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

² Байкальский музей ИНЦ СО РАН, пос. Листвянка

³ Иркутский государственный университет

Поступила в редакцию 29.04.2010

Актуальность внедрения молекулярно-генетического мониторинга ассоциированной микрофлоры рыб предусматривает развитие молекулярной диагностики заболеваний и обусловлена в первую очередь угрозой широкого распространения бактериальных, вирусных и грибковых инфекций в условиях искусственного содержания. Разработка и внедрение эффективной методики селективной детекции живых и жизнеспособных бактериальных клеток на основе направленного ингибирования внеклеточной ДНК позволит быстро и корректно выявлять возбудителя инфекционных заболеваний рыб и контролировать эффективность проведения санитарно-эпидемиологических мероприятий. Предложен и апробирован на лососевидных рыбах из аквариумных экспозиций Байкальского музея ИНЦ СО РАН метод селективной инактивации ДНК отмерших клеток организма-хозяина и бактерий с использованием моноазида этидиумбромида (ЕМА). Подобраны условия выделения ДНК, в групп- и видо-специфичных ПЦР получены наборы целевых ампликонов, проведена серия экспериментов с лабораторной культурой штамма *E. coli*. Установлено, что при низких концентрациях анавидин является эффективным лизирующим реагентом и на его основе возможно создание нового набора для выделения тотальной ДНК. Предлагаемая методика будет востребована при разработке современных наукоемких технологий молекулярно-генетического мониторинга водных экосистем.

Ключевые слова: лососевидные рыбы, микрофлора рыб, бактериальные инфекции, молекулярно-генетические методы, аквариумные экспозиции

Одной из серьезных проблем искусственного содержания рыб является изменение трофности водной среды с образованием токсичных соединений, вызванное увеличением концентраций продуктов животного метаболизма. В этих условиях преимущество для роста и развития получают сапрофитные микроорганизмы, увеличивается риск распространения бактериальных, вирусных и грибковых инфекций, что ведет к повышению уровня смертности объектов культивирования.

Белькова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник. E-mail: belkovan@mail.ru

Суханова Елена Викторовна, аспирантка. E-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Деникина Наталья Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. E-mail: denikina@lin.irk.ru

Русинек Ольга Тимофеевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник. E-mail: rusinek@isc.irk.ru

Дзюба Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Использование новых, современных технологий в профилактике и терапии заболеваний рыб позволит существенно снизить экономические потери, вызванные их массовой гибелью. Методы диагностики бактериальных инфекций на основе видоспецифичной полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностика) показали свое преимущество перед классическими микробиологическими методами [3] и могут стать основой молекулярно-генетического мониторинга ассоциированной микрофлоры водных организмов. Они требуют меньше времени и эффективны в детекции конкретных патогенов на всех стадиях заболевания. ПЦР-диагностика позволяет корректно идентифицировать микроорганизмы, культивирование и определение которых по классическим биохимическим тестам затруднительно. Эти методы активно используются в странах с развитой аквакультурой, постоянно совершенствуются и развиваются [5, 8, 9, 19, 20].

Известно, что бактериальные клетки имеют различный физиологический статус: живые; жизнеспособные, но некультивируемые;

резистентные – споры; мертвые. Определение жизнеспособности клеток с использованием молекулярно-генетических методов имеет принципиальное значение в медицинской, ветеринарной и пищевой микробиологии. Методы микроскопии и проточной цитометрии с красителями, позволяющими различать живые и мертвые клетки, такие как Syto 9 или BacLight [6, 13, 17], существенно менее чувствительны, чем полимеразная цепная реакция (ПЦР) или подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) [17]. Применение ОТ-ПЦР для детекции живых клеток [4, 16] также имеет ряд недостатков, как в корректности дифференцировки живых и мертвых клеток при использовании мРНК в качестве маркерных молекул, так и в воспроизводимости результатов анализа [12, 18]. В связи с этим становится актуальной разработка метода дифференцировки ДНК из живых и мертвых бактериальных клеток, что позволит полностью использовать потенциал ПЦР-диагностики [11]. Лабораторные эксперименты по селективному различению ДНК из живых и мертвых бактериальных клеток в настоящее время проводятся с применением производных этидиумбромидов [7, 10, 11, 15].

Цель работы – разработка эффективной методики селективной детекции живых и жизнеспособных бактериальных клеток на основе направленного ингибирования внеклеточной ДНК, позволяющей проводить молекулярно-генетический мониторинг ассоциированной (в том числе и патогенной) микрофлоры рыб.

Материалы и методы. Исследования выполнены на здоровых и больных (с язвами на внешних покровах) байкальских рыбах: ленке (*Brachymystax lenok*), байкальском сига (*Coregonus lavaretus baicalensis*) и черном байкальском хариусе (*Thymallus baicalensis*) из аквариумной экспозиции Байкальского музея ИНЦ СО РАН.

Отбор биологического материала и первичная обработка проб. Соскобы с внешних покровов живых рыб собирали стерильным скальпелем в пробирки эппендорф и добавляли от 100 мкл до 1 мл трис-солевого буфера в зависимости от объема биологического материала (ТСБ: 10 мМ трис-HCl, pH 7,5; 0,1 М NaCl; 2 мМ ЭДТА). Проводили три эксперимента по определению оптимальных условий первичной обработки бактериального материала.

(1) Определение оптимальных условий фиксации биологического материала для его транспортировки в лабораторию. Для этого суспензию клеток в ТСБ или фиксировали

этанолом до конечной концентрации 70%, или использовали без фиксации, после чего обрабатывали лизирующим раствором из коммерческих наборов (ДНК-сорб, АмплиСенс, Москва).

(2) Оценка возможности использования анавицина для эффективного лизиса клеточной биомассы. Для этого лизис образцов проводили в растворах с понижающими концентрациями анавицина, лизат использовали для выделения ДНК (табл. 1).

(3) Обработка биологического материала моноазидом этидиумбромидом (ЕМА) для удаления внеклеточной ДНК. Для этого к 100 мкл суспензии добавляли 2 мкл ЕМА (50 мг/мл), инкубировали во льду 1 мин при освещении 650 Вт. Выдерживали в темноте 20 мин.

Все эксперименты были проведены в трех повторностях. Суспензии клеток использовали для выделения тотальной ДНК методом ферментативного лизиса, а лизаты – с помощью коммерческих сорбентов.

Таблица 1. Схема эксперимента по использованию раствора анавицина

Концентрация анавицина	Дополнительный лизирующий агент	Результаты амплификации
0,01% Ана 1*	–	–
0,02% Ана 1	–	–
0,05% Ана 1	–	–
0,1% Ана 1	–	–
0,01% Ана 1	1% SDS	+
0,02% Ана 1	1% SDS	+
0,05% Ана 1	1% SDS	+
0,1% Ана 1	1% SDS	–
0,01% Ана 2**	–	+
0,02% Ана 2	–	–
0,05% Ана 2	–	–
0,1% Ана 2	–	–
0,01% Ана 2	1% SDS	+
0,02% Ана 2	1% SDS	+
0,05% Ана 2	1% SDS	+
0,1% Ана 2	1% SDS	–
–	1% SDS	–
–	ферментативный лизис	+

Примечания: * - Анавицин 1 – товарный продукт; ** - Анавицин 2 – № партии 16-07 МК-6

Выделение ДНК методом ферментативного лизиса проводили по [1].

Выделение ДНК с помощью коммерческих сорбентов. После обработки образцов лизирующими растворами, их прогревали 10 мин при 60°C, центрифугировали 15 мин на настольной центрифуге (12000 об/мин), надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. К прозрачному лизату

добавляли 25 мкл сорбента универсального (АмплиСенс, Москва). Суспензию тщательно перемешивали на вортексе, выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Центрифугировали 30 сек при 12000 об/мин, супернатант удаляли, а осадок промывали 400 мкл 70% этанола и подсушивали 30 мин при 60°C. Нуклеиновые кислоты элюировали в 25 мкл ТЕ буфера и использовали в качестве матрицы в ПЦР.

Полимеразная цепная реакция. В серии экспериментов подбирали режим

амплификации, обеспечивающий высокое качество ПЦР-продукта требуемой длины на праймерах, комплементарных участкам гена 16S рРНК бактерий с разным уровнем специфичности (табл. 2) по [1]. Для этого проверяли температуру отжига в градиенте температур от 44 до 72°C в амплификаторе DNA Engine DYADTM. Анализ продуктов проводили разделением фрагментов ДНК в 1,5% агарозном геле.

Таблица 2. Структуры праймеров, использованных в работе

Название праймера	Структура 5'-3'	Детектируемая филогенетическая группа
Консервативные праймеры		
21L	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	архебактерии
109L	ACKGCTCAGTAACACGT	архебактерии
333L	TCCAGGCCCTACGGG	архебактерии
344L	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	архебактерии
915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	архебактерии
958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	архебактерии
1492R	GGCTACCTTGTTACGACTT	архебактерии
500L	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA	эубактерии
1350R	GACGGGCGGTGTGTACAAG	эубактерии
338L	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	эубактерии
500R	TTACCGCGGCTGCTGGFACG	эубактерии
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	эукариоты
Групп-специфичные праймеры		
35L	CTGGCTCAGAYCGAACG	альфа-протеобактерии
681L	AGTGTAAGAGGTGAAATT	альфа-протеобактерии
663L	GAATTCCATCCCCCTCT	бета-протеобактерии
680L	CRCGTGTAGCAGTGA	бета-протеобактерии
319L	GTA CTGAGACACGGACCA	цитобаги-флавобактерии
342L	CAGCAGTAGGGAATCTTC	бациллы
31L	GATCCTGGCTCAGAATC	ацидобактерии
235L	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	актинобактерии
930R	CTCCACCGCTTGTGTGA	планктомицеты
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	Saprolegniaceae
Видо-специфичные праймеры		
АН-F	GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA	<i>Aeromonas hydrophila</i>
АН-R	CGTGCTGGCAACAAAGGCCAG	<i>Aeromonas hydrophila</i>
PAF	GACCTCGCGCCATTA	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>
PAR	CTCAGCAGTTTTGAAAG	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>
BF1	TCACCAAGGCRACGATGCG	<i>Bacillus licheniformis</i>
BR2	CGTATTCACCGCGGCATG	<i>Bacillus licheniformis</i>
650L	TAGAGTATGGGAGAGGAT	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Результаты и обсуждение. Для разработки эффективной методики, позволяющей проводить молекулярно-генетический мониторинг ассоциированной микрофлоры рыб, важно оценить применение различных способов фиксации бактериального материала и выделения тотальной ДНК. Нами были использованы как общепринятые методики: фиксация этанолом и выделение ДНК методом ферментативного лизиса, так и апробирована

возможность применения новых химических реагентов, лизирующих клеточные стенки бактерий и денатурирующих внутриклеточные белки. Для этой цели впервые был использован эффективный антисептик – анавидин (табл. 1), разработанный на основе производных гуанидина в Иркутском институте химии СО РАН (патент РФ N2144024). Качество полученной ДНК проверяли с помощью ПЦР на консервативных бактериальных

праймерах (табл. 2). Установлено, что оптимальной для лизиса клеток является концентрация анавидина 0,01% с добавлением додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1% (рис. 1).

Ранее нами показано, что при использовании рибосомной ДНК в качестве мишени в амплификации на консервативных бактериальных праймерах образуются неспецифичные ПЦР-продукты, соответствующие фрагменту гена 18S рРНК исследуемого вида рыб [2]. Загрязнение ДНК организма-хозяина при проведении групп- и видоспецифичной амплификации на бактериальных праймерах может приводить к ложно положительному результату. Поэтому для дальнейшей разработки методики использованы праймеры с широким уровнем специфичности (табл. 2). Установлено, что с матричных ДНК получается спектр целевых ампликонов, а неспецифичные могут синтезироваться с ДНК организма-хозяина (рис. 2). Повышение температуры отжига в некоторых случаях не увеличивает специфичность амплификации, а приводит к полному отсутствию ПЦР-продукта – ложно отрицательному результату. Поэтому на следующем этапе была предпринята попытка селективной амплификации ДНК из живых бактериальных клеток.

При проведении молекулярно-генетического мониторинга ассоциированной микрофлоры рыб важно иметь достоверную информацию: из живых или мертвых бактериальных клеток получен ампликон. Актуальность проведения такой диагностики вызвана следующими факторами: 1) в пробах, взятых с внешних покровов рыб, особенно с травмированных участков тела, присутствуют как

бактериальные, так и мертвые (лизированные) клетки организма-хозяина; 2) специфика профилактики и лечения бактериальных инфекций заключается в регулярной обработке аквариумов дезинфицирующими средствами, разрушающими клетки микроорганизмов. Известно, что некоторые производные этидиумбромиды не способны проникать через клеточную стенку живых и жизнеспособных клеток, однако они встраиваются в двойную цепь внеклеточной и находящейся в мертвых или частично разрушенных клетках ДНК и способствуют ее разрушению при УФ-облучении или освещении с мощностью более 600 Вт. Таким образом, обработка биологического материала производным этидиумбромидов – моноазидом (ЕМА) с последующим кратковременным световым воздействием приводит к селективной инактивации внеклеточной ДНК [14, 21].

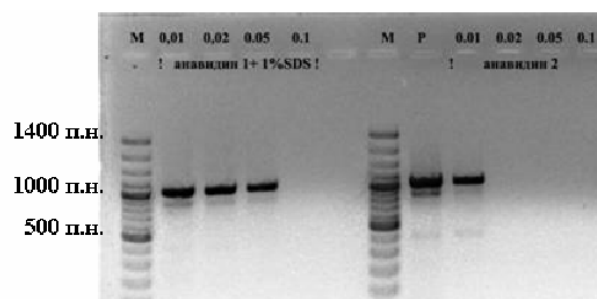


Рис. 1. Электрофоретический анализ результатов амплификации тотальной ДНК из соскоба внешних покровов с язвенными проявлениями байкальского сига:

М – маркер молекулярного веса, Р – положительный контроль – ДНК выделена методом ферментативного лизиса, в остальных случаях указаны концентрации анавидина 1 и 2 (% об/об)

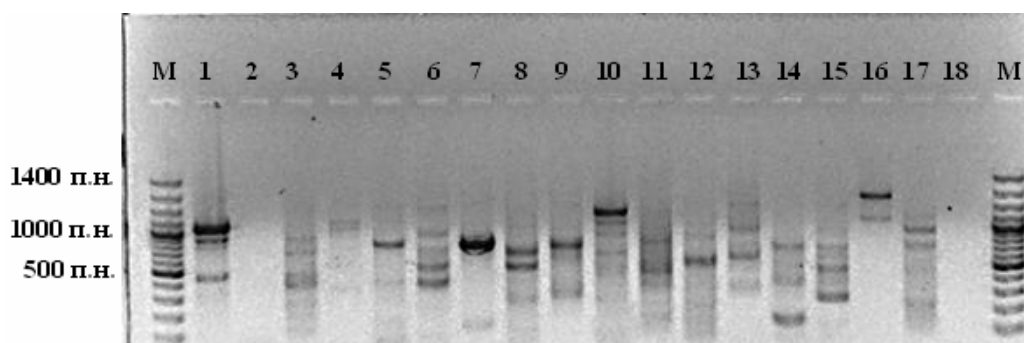


Рис. 2. Электрофоретический анализ результатов амплификации тотальной ДНК, выделенной из соскоба внешних покровов с язвенными проявлениями байкальского сига на парах праймеров: 1 – 500L-1350R, 2 – 21L-1492R, 3 – 109L-915R, 4 – 333L-958R, 5 – 344L-958R, 6 – 35L-500R, 7 – 681L-1350R, 8 – 663L-1350R, 9 – 680L-1350R, 10 – 319L-1350R, 11 – 338L-930R, 12 – 235L-1350R, 13 – 31L-1350R, 14 – BF1-BR2, 15 – 342L-1350R, 16 – NS8-NS1, 17 – 650L-1350R, 18 – безматричный контроль на паре 500L-1350R, М – маркер молекулярного веса

Мы использовали моноазид этидиум-бромид для селективной инактивации внеклеточной ДНК, а так же ДНК из мертвых клеток организма-хозяина и (или) бактерий. При этом вся процедура дополнительной обработки занимает несколько минут (обработка светом идет в течение 90 сек). В экспериментах использовали соскобы с внешних покровов рыб (рис. 3). Следует отметить не только полное исчезновение неспецифического ПЦР-продукта и, следовательно, ложно положительного ампликона, с рибосомной ДНК организма-хозяина (рис. 3А), но и специфичную детекцию таких организмов как представители рода *Bacillus* и *Acinetobacter calcoaceticus*. ПЦР-продукты на этих специфичных праймерах удалось получить только с препаратов ДНК, полученных после дополнительной обработки ЕМА (рис. 3Б, В).

Очевидно, что соотношение ДНК: ЕМА на стадии пробоподготовки биологического материала необходимо оптимизировать для полного ингибирования ДНК как в мертвых клетках, так и внеклеточной. Проведены предварительные эксперименты по поиску

оптимальных концентраций суспензии клеток для их разрушения или фиксации на примере культуры грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*. Результаты показали, что фиксация или лизис клеточной суспензии, титр клеток в которой меньше $1-2 \times 10^5$ кл./мл, с последующей обработкой ЕМА приводят к полному ингибированию тотальной ДНК и ампликоны на праймерах с разным уровнем специфичности получить не удастся. При титре клеток выше 1×10^6 кл./мл обработка суспензии клеток ЕМА после их лизиса не влияет на получение ПЦР-продукта. По-видимому, соотношение ДНК:ЕМА в последнем случае не является оптимальным для полного ингибирования ДНК в мертвых клетках. Это соотношение необходимо учитывать при оценке оптимального для проведения диагностического молекулярно-генетического анализа количества биологического материала. Для этого следует провести дополнительные эксперименты по определению концентрацией ЕМА, требуемых для ингибирования внеклеточной ДНК, при обработке микроорганизмов с разным типом клеточной стенки.

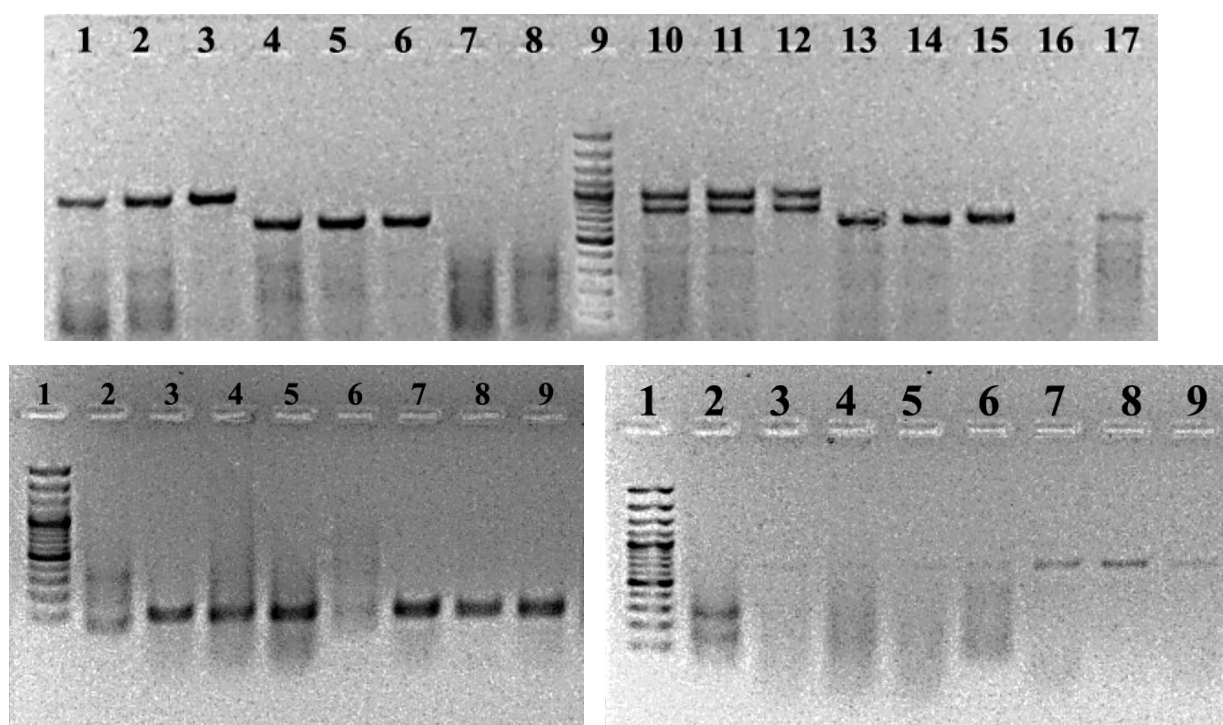


Рис. 3. Электрофоретический анализ результатов амплификации тотальной ДНК, выделенной из соскобов с внешних покровов байкальского сига:

(А) Пары праймеров 500L-1350R (1,2,3,10,11,12), ALF-1350R (4,5,6,13,14,15), BET-1350R (7,8,16,17), 9 – маркер молекулярного веса. 1–8 – суспензия клеток обработана ЕМА, 10–17 – суспензия клеток без обработки ЕМА. (Б) Пара праймеров специфичных для представителей рода *Bacillus*, 1 – маркер молекулярного веса, 2,6 – суспензия клеток без обработки, 3,4,5,7,8,9 – суспензия клеток обработана ЕМА. (В) Пара видоспецифичных праймеров для *Acinetobacter calcoaceticus*, 1 – маркер молекулярного веса, 2,6 – суспензия клеток без обработки, 3,4,5,7,8,9 – суспензия клеток обработана ЕМА

На следующем этапе была проведена диагностика бактериальных инфекций лососевидных рыб, вызываемых *Aeromonas hydrophila* и *Pseudomonas anguilliseptica*, в условиях аквариумной экспозиции Байкальского музея ИНЦ СО РАН на основе видо-специфичной амплификации. Апробацию метода и подбор условий видо-специфичной амплификации проводили для анализа соскобов с внешних покровов исследуемых видов рыб. Ампликоны были получены с препаратов ДНК из образцов биологического материала, обработанного ЕМА, взятого от рыб с явными проявлениями язвенных заболеваний.

Выводы: разработанная методика позволит решить проблему селективной детекции живых бактериальных клеток для корректного выявления возбудителей инфекционных заболеваний рыб и найдет применение в системе молекулярно-генетического мониторинга водных экосистем.

Работа поддержана инновационным проектом «Тест-системы для диагностики бактериальных инфекций рыб» 2008 г. ИНЦ СО РАН и выполнена в рамках программы РАН №26, подпрограммы 1, проект 26.13.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Белькова, Н.Л. Введение в молекулярную экологию микроорганизмов: Учебно-методическое пособие / Н.Л. Белькова, А.М. Андреева. – Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – 91 с.
2. Белькова, Н.Л. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами / Н.Л. Белькова, Е.В. Дзюба, Е.В. Суханова, Т.А. Ханаева // Биология внутренних вод. – 2008. - №2. – С. 91-94.
3. Белькова, Н.Л. Молекулярно-генетическая идентификация кишечной микрофлоры и протистов байкальских рыб / Н.Л. Белькова, Е.В. Дзюба, Е.В. Суханова // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: в 2 томах. – Новосибирск: Наука, 2009. – Т. II: Водоемы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии / О.А. Тимошкин, В.И. Провиз, Т.Я. Ситникова и др. – (Справочники и определители по фауне и флоре озера Байкал). – С. 957-980.
4. Bentsink, L. Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato / L. Bentsink, G.O. Leone, J.R. van Beckhoven et al. // J. Appl. Microbiol. – 2002. – V. 93. – P. 647-655.
5. Buller, N.B. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. – Oxfordshire: CABI publishing, 2004. – 361 p.
6. Burnett, S.L. Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total *Escherichia coli* O157:H7 cells in suspensions and on apples using confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers / S.L. Burnett, L.R. Beuchat // Int. J. Food Microbiol. – 2002. – V. 74. – P. 37-45.
7. Flekna, G. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR / G. Flekna, P. Stefanic, M. Wagner et al. // Res. Microbiol. – 2007. – V. 158. – P. 405-412.
8. Haygood, M.G. Light organ symbioses in fishes // Crit. Rev. Microbiol. – 1993. – V. 19. – P. 191-216.
9. Haygood, M.G. Polymerase chain-reaction and 16S-ribosomal-RNA gene-sequences from the luminous bacterial symbionts of 2 deep-sea anglerfishes / M.G. Haygood, D.L. Distel, P.J. Herring // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. – 1992. – V. 72. – P. 149-159.
10. Lee, J.-L. Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction / J.-L. Lee, R.E. Levin // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – V. 118. – P. 312-317.
11. Lee, J.-L. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets / J.-L. Lee, R.E. Levin // J. Microbiol. Methods. – 2009. – V. 76. – P. 93-96.
12. McKillip, J.L. rRNA stability in heat killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 / J.L. McKillip, L.A. Jaykus, M. Drake // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 4264-4268.
13. Michel, C. Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum*: approach and control / C. Michel, D. Antonio, R.P. Hedrick // Res. Microbiol. – 1999. – V. 150. – P. 351-358.
14. Nocker, A. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide / A. Nocker, A.K. Camper // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – P. 1997-2004.
15. Nocker, A. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology / A. Nocker, A. Mazza, L. Masson et al. // J. Microbiol. Methods. – 2009. – V. 76. – P. 253-261.
16. Novak, J.S. Detection of heat injury in *Listeria monocytogenes* Scott A / J.S. Novak, V.K. Juneja // J. Food Prot. – 2001. – V. 64. – P. 1739-1743.
17. Rudi, K. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples / K. Rudi, B. Moen, S.M. Dromtorp, A.L. Holck // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 1018-1024.
18. Sheridan, G.E. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells / G.E. Sheridan, C.I. Masters, J.A. Shallcross, B.M. MacKey // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 1313-1318.

19. Spanggaard, B. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification / B. Spanggaard, I. Huber, J. Nielsen et al. // *Aquaculture*. – 2000. – V. 182. – P. 1-15.
20. Van der Maarel, M.J.E.C. Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species / M.J.E.C. Van der Maarel, W. Sprenger, R. Haanstra, L.J. Forney // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. – V. 173. – P. 189-194.
21. Wagner, A.O. Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide / A.O. Wagner, C. Malin, B.A. Knapp, P. Illmer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – P. 2537-2539.

MOLECULAR-GENETIC MONITORING OF SALMON FISHES ASSOCIATED MICROFLORA: DIVERSITY AND PHYSIOLOGICAL STATUS

© 2010 N.L. Belkova^{1,3}, E.V. Suhanova¹, N.N. Denikina¹, O.T. Rusinek^{2,3}, E.V. Dzyuba¹

¹ Limnological Institutes SB RAS, Irkutsk

² Baikal Museum of ISC SB RAS, settlement Listvyanka

³ Irkutsk State University

The urgency of introduction the molecular-genetic monitoring of associated fishes microflorae provides development of diseases molecular diagnostics and is caused first of all by threat of wide circulation of bacterial, virus and fungoid infections in conditions of the artificial contents. Development and introduction of the effective selective detection methodology on alive and viable bacterial cells on the basis of directed inhibition of extracellular DNA will allow to reveal quickly and correctly the activator of fishes infectious diseases and to monitor efficiency of carrying out the sanitary-and-epidemiologic actions. The method of DNA selective inactivation the death cells of organism-owner and bacteria with use of mono-asid ethidiumbromid (MEB) is offered and approved on salmon fishes from aquarian expositions of Baikal museum ISC SB RAS. Conditions of DNA allocation are picked up, in group-and kind-specific PCR sets of target amplicons are received, series of experiments with laboratory culture of *E. coli* strain are lead. It is established, that at low concentration anavidin is an effective lytic reagent and on its basis the creation of a new set for allocation of total DNA is possible. The offered methodology will be demanded by development of modern high technologies of molecular-genetic monitoring of aquatic ecosystems.

Key words: *salmon fishes, microflora of fishes, bacterial infections, molecular-genetic methods, aquarian expositions*

Nataliya Belkova, Candidate of Biology, Associate Professor,
Senior Research Fellow. E-mail: belkovan@mail.ru

Elena Suhanova, Post-graduate Student. E-mail:
sukhanova@lin.irk.ru

Nataliya Denikina, Candidate of Biology, Senior Research Fellow.
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Olga Rusinek, Doctor of Biology, Main Research Fellow. E-mail:
rusinek@isc.irk.ru

Elena Dzyuba, Candidate of Biology, Senior Research Fellow.
E-mail: e_dzyuba@lin.irk.ru