

Н.А.Шишкова, Л.И.Маринин, А.Н.Мокриевич

## ВЛИЯНИЕ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ НА НАХОДЯЩИЕСЯ В ПОЧВЕ СПОРЫ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Изучены фенотипические и генетические свойства штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных от дождевых червей через 20 и 30 сут нахождения в инфицированной почве. Установлено, что под влиянием червей происходит снижение количества *Bacillus anthracis* в почве на 30–50 %, но оставшиеся споры не меняют своих свойств и сохраняют все биологические и генетические детерминанты вирулентности.

*Ключевые слова:* *Bacillus anthracis*, дождевые черви, ДНК, ПЦР.

N.A.Shishkova, L.I.Marinin, A.N.Mokrievich

### Interaction between Earthworms and Soil-Inhabiting Anthrax Microbe Spores

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Studied are phenotypic and genetic properties of anthrax agent strains, isolated from earthworms retained in infected soil for a period of 20 and 30 days. Discovered is the fact that the presence of worms in the biotope reduces the number of *Bacillus anthracis* spores by 30–50 %. However, the rest of the spores preserve original properties, and biological and genetic virulence dominants.

*Key words:* *Bacillus anthracis*, earthworms, DNA, PCR.

Попавший в окружающую среду возбудитель сибирской язвы быстро образует споровую форму. В виде споры *B. anthracis* способен к длительному переживанию в почве, создавая стационарно-неблагополучные регионы. В 1887 г. Р. Кох писал: «...споры выживают каким-то невероятным образом. Ни годы засухи, ни существование в течение месяцев в гниющей жидкости, ни чередование засухи и влаги не могут лишить их способности прорасти. Когда эти споры уже образовались, то появляются достаточные предпосылки для сохранения сибирской язвы в течение длительного времени в определенном районе».

Контаминированная почва может оставаться инфицированной многие годы, даже десятилетия. Одним из примеров служит случай сибирской язвы у человека, заразившегося на месте захоронения трупов сельскохозяйственных животных, проведенного более 80 лет назад. Показательна вспышка сибирской язвы в Австралии, возникшая в местности, где заболевания не регистрировались 83 года [11]. Заслуживает внимания сообщение о выделении двух жизнеспособных штаммов возбудителя сибирской язвы из костей животных, найденных при археологических раскопках в Национальном Крюгер-парке (Южная Африка). Радиоуглеродный анализ этих костей показал, что они относятся к животным, погибшим от сибирской язвы 200±50 лет назад [12]. Имеется предположение, что возбудитель сибирской язвы может быть активным через 1300 лет [6].

Находящийся в почве возбудитель сибирской язвы подвергается воздействию различных факторов. Он имеет много антагонистов среди растений и микроорганизмов. Длительное время дискутируется вопрос о роли дождевых червей в санации по-

чвы, инфицированной возбудителем сибирской язвы. Начиная с Л.Пастера считалось, что дождевые черви выносят *B. anthracis* из глубины почвы на ее поверхность. Р.Кох отрицал это заявление Л.Пастера. O.Bollinger [7] проверил данное положение в эксперименте. Автор на пастбищах в Баварских Альпах, где часто встречались заболевания сибирской язвой, добыл 72 червя. Тщательно очистив их, он растер червей в стерильной воде и полученную массу ввел животным (кроликам, морским свинкам и белым мышам). В одном случае получил гибель от сибирской язвы. На основании проведенных исследований был сделан вывод о правильности теории Л.Пастера. В ответ на экстремальные условия среды обитания у дождевого червя сформировалась уникальная иммунная система, которая представлена антибиотической, ферментативной системой, комплексом специфических иммунных клеток и комплементарных белков [4].

В данной работе проведено изучение влияния Калифорнийских дождевых червей на очищение почвы от возбудителя инфекции и свойства микроорганизма.

### Материалы и методы

В работе использовали общепринятые материалы и методические приемы работ с возбудителем сибирской язвы [3].

Был использован штамм *B. anthracis* 71/12 (Второй вакцины Ценковского) из коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk»), обладающий генотипом pXO1<sup>+</sup>/pXO2<sup>+</sup> (Cap<sup>+</sup> Tox<sup>+</sup>).

Таблица 1

Праймеры, использованные в работе		
Наименование	5'-3' последовательность	Ожидаемый размер фрагмента (п.о.)
F1Pxo2	GTCTTCTCGCACTATCAAGGCTCAATG	355
R1Pxo2	CTGCATTATTATCAATTGTTATATCAGG	
F1lef	CCCTACACTAATGAACATAACCAAATTGG	365
R1lef	GCTGTTACTAAACATGACATACTAATTAC	
F1pag	CCTGTGCTTGAAACTAATATCGTAGAC	375
R1pag	GTATACAGCATACACAATCTATTGAAGG	
F1edema	CTATAGCCTGTGAGGAGGATATAGCAAATAG	405
R1edema	CAGCTGAACTTTATCAACTTAGAATCTC	

Культивирование и оценку свойств возбудителя сибирской язвы проводили с использованием плотных и жидких питательных сред: L-агар/бульон (по Луриа-Бертани), МПБ и МПА, а также дифференциально-диагностические питательные среды: среда с сорбитом и бромтимоловым синим [2] и среда с фенолфталейнфосфатом натрия. Определение характера роста на питательных средах проводили визуально или под малым увеличением микроскопа. Обращали внимание на характер колонии на агаре, прозрачность бульона и вид осадка.

Калифорнийские дождевые черви получены из Центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов.

Для выделения ДНК использовали методику щелочной денатурации Birnboim и Doly [5]. ДНК выделяли из жидких культур, выращенных в L-бульоне с качанием в течение 16 ч.

**Постановка полимеразной цепной реакции.** Были использованы пары праймеров, гомологичные участкам нуклеотидных последовательностей плазмид *B. anthracis* (табл. 1). Праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол», Москва.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10×буфер для ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва) – 75 мМ трис-НСl (рН 8,8); 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01 % Tween 20; 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,4 пкМ праймера; 0,2 мкМ каждого дНТФ; 1 ед. Taq ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва) и 50–100 нг ДНК. Условия проведения ПЦР-амплификации: начальная денатурация 94 °С (3 мин); 30 циклов, состоящих из денатурации при 94 °С (30 с), отжига при 54 °С (30 с) и элонгации при 72 °С (30 с); завершающая элонгация при 72 °С (5 мин). Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Applied biosystem 2700», США. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,8 % агарозном геле, гель готовили на буфере ТЕА [10]. ДНК в геле окрашивали бромистым этидием [10]. Фотодокументирование проводили на системе для гель-документирования Vilber-Lourmat (Франция) при ультрафиолетовом освещении с помощью трансиллюминатора фирмы «Cole Parmer», США. Для определения размеров ампликонов использовали фрагмент ДНК определенной молекулярной массы.

Определение капсулообразования осуществляли

при выращивании на специальных питательных средах: бикарбонатно-сывороточном агаре, среде ГКИ, среде по Green. Посевы инкубировали при температуре (36±1) °С в условиях повышенного содержания в атмосфере углекислого газа. Капсулообразование в организме определяли просмотром мазков из трупов белых мышей, погибших после заражения споровой суспензией *B. anthracis*.

Для определения величины ЛД<sub>50</sub> заражали беспородных белых мышей массой 16–18 г подкожным введением разных доз споровой суспензии – от 10 до 10<sup>8</sup>. Рабочие инфицирующие дозы готовили, исходя из концентрации спор, определяемой по счету в камере Горяева. Правильность приготовления заражающей дозы контролировали высевом каждого разведения на 5 чашек Петри с питательным агаром по 0,1 см<sup>3</sup> на каждую чашку. Каждую заражающую дозу вводили 10 белым мышам. За животными наблюдали в течение 8 сут, ежедневно учитывая количество погибших мышей в каждой группе. По результатам гибели экспериментальных животных, инфицированных различными дозами спорового материала, рассчитывали дозу, вызывающую гибель 50 % животных (величину ЛД<sub>50</sub>) по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина [1].

## Результаты и обсуждение

Калифорнийских дождевых червей в количестве 50 штук помещали в контейнер с землей (около 1 кг). Брли равные навески сухих опилок (по 100 г) и смачивали 10 см<sup>3</sup> споровой суспензии *B. anthracis* с концентрацией 3·10<sup>8</sup> спор/см<sup>3</sup>. Затем опилки вносили в контейнер с почвой и тщательно перемешивали. В разные временные интервалы из хранившихся контейнеров отбирали небольшие образцы почвы, взвешивали их и добавляли равное по весу количество физиологического раствора. Колбы помещали в шейкер и встряхивали в течение одного часа. Затем отбирали 1 см<sup>3</sup> суспензии и титровали методом десятикратных разведений. Из соответствующих разведений делали высев суспензии на чашки с питательным агаром, содержащим полимиксин 100 мкг/см<sup>3</sup>. С целью выделения сибирезывенных культур суспензии из проб почвы высевали на дифференциально-

Количество микроорганизмов *B. anthracis* в почве с дождевыми червями

Срок хранения проб почвы, сутки	Количество микроорганизмов в 1 г почвы в пробах				
	1	2	3	4	Среднее
0	6,0·10 <sup>6</sup>	6,5·10 <sup>6</sup>	6,5·10 <sup>6</sup>	6,7·10 <sup>6</sup>	6,4·10 <sup>6</sup>
7	6,2·10 <sup>6</sup>	5,9·10 <sup>6</sup>	4,0·10 <sup>6</sup>	6,5·10 <sup>6</sup>	5,7·10 <sup>6</sup>
14	6,0·10 <sup>6</sup>	4,6·10 <sup>6</sup>	4,4·10 <sup>6</sup>	7,0·10 <sup>6</sup>	5,5·10 <sup>6</sup>
28	4,2·10 <sup>6</sup>	1,9·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>6</sup>	5,6·10 <sup>6</sup>	3,5·10 <sup>6</sup>
42	4,6·10 <sup>6</sup>	2,8·10 <sup>6</sup>	3,4·10 <sup>6</sup>	5,4·10 <sup>6</sup>	4,1·10 <sup>6</sup>
56	3,4·10 <sup>6</sup>	1,2·10 <sup>6</sup>	2,6·10 <sup>6</sup>	3,8·10 <sup>6</sup>	2,8·10 <sup>6</sup>
63	4,4·10 <sup>6</sup>	3,8·10 <sup>6</sup>	4,2·10 <sup>6</sup>	5,6·10 <sup>6</sup>	4,5·10 <sup>6</sup>
77	2,9·10 <sup>6</sup>	2,9·10 <sup>6</sup>	2,0·10 <sup>6</sup>	4,8·10 <sup>6</sup>	3,2·10 <sup>6</sup>
90	3,5·10 <sup>6</sup>	3,0·10 <sup>6</sup>	2,3·10 <sup>6</sup>	4,3·10 <sup>6</sup>	3,3·10 <sup>6</sup>

диагностические питательные среды. После 24–36 ч инкубирования при температуре (36±1)°С подсчитывали количество типичных по морфологии колоний *B. anthracis*, выросших на плотной питательной среде. Полученные результаты представлены в табл. 2.

На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что в присутствии дождевых червей происходит снижение в почве количества сибиреязвенных бацилл (от 30 до 50 %).

Следующим этапом работы явилось изучение свойств сибиреязвенных культур, выделенных от червей на 20-е и 30-е сутки после помещения в инфицированную почву. Готовили 250 г корма (измельченные бананы, яблоки и груши), в него добавляли 25 см<sup>3</sup> споровой суспензии штамма *B. anthracis* 71/12, содержащей 1·10<sup>8</sup> спор/см<sup>3</sup>. В итоге концентрация спор составила 1·10<sup>6</sup> спор/на 1 г субстрата. Далее этот субстрат переносили в банку с почвой, нанеся его толстым слоем, и сверху вновь насыпали почву слоем 3–4 см. На поверхность почвы помещали калифорнийских червей в количестве 50 шт. Банку накрывали марлей и хранили в темном месте при комнатной температуре. Через 5 дней черви с поверхности полностью переместились в питательный субстрат и перемешали почву с субстратом. Началось активное размножение червей. Через 20 и 30 дней наблюдения отобрали по 5 крупных особей, тщательно отмыли в стерильном физиологическом растворе 5 раз. Червей растерли в стерильных ступках с песком и сделали

высев на дифференциально-диагностическую питательную среду с полимиксином 100 мкг/см<sup>3</sup>. После инкубации посевов при температуре (36±1)°С в течение 24–48 ч отобрали характерные колонии (рис. 1).

Промывную воду (последнюю порцию) также высевали на чашки с питательной средой для контроля наличия спор сибиреязвенного микроба на поверхности червей. В результате проведенных экспериментов нами выделены культуры *B. anthracis* на 20-е и 30-е сутки после начала эксперимента. Были проверены биологические свойства выделенных культур – характер роста в жидкой и на плотной питательных средах, вирулентность для беспородных белых мышей, выделена ДНК и поставлена ПЦР с видоспецифическими праймерами.

При выращивании на плотных и жидких питательных средах выделенные штаммы проявляли типичные культурально-морфологические признаки (характер роста, морфология колоний и клеток). На агаризованной питательной среде вырастали плоские колонии различной величины, сероватого или серовато-белого цвета, сухие, матовые, шероховатые R и RRO-форм. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдались крупные (от 1,0÷1,3 до 3÷10 мкм) грамположительные палочки с обрубленными или слегка закругленными концами, расположенные в цепочках. В жидкой питательной среде рост на дне пробирки отдельными хлопьями или хлопком («комоч ваты»), бульон остается прозрачным.

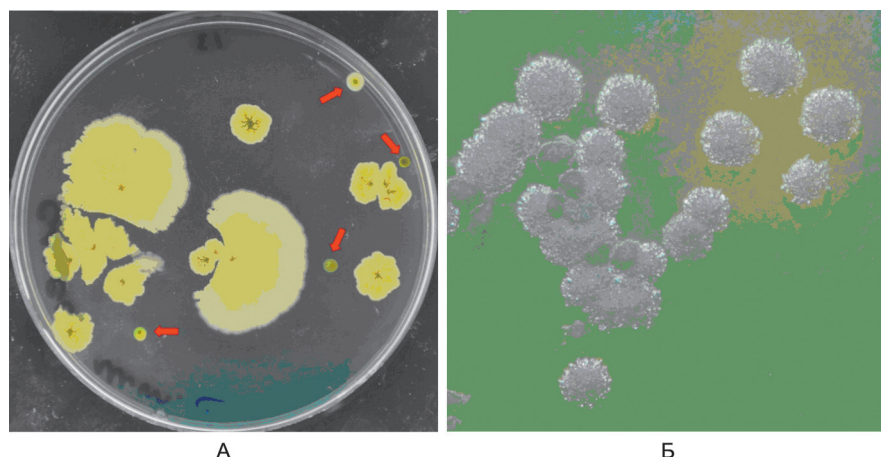


Рис. 1. Рост микроорганизмов на диагностической питательной среде: А – рост *B. cereus*, *B. subtilis* и *B. anthracis* (отмечены стрелками); Б – колонии *B. anthracis* под малым увеличением микроскопа

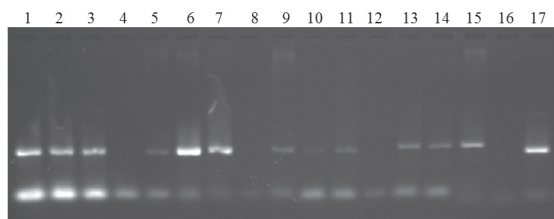


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймерами на гены патогенности плазмидной локализации:

1–4 – F1PхO2/R1PхO2 (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 355 п.о.);  
 5–8 – F1lef/R1lef (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 365 п.о.);  
 9–12 – F1rag/R1rag (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 375 п.о.);  
 13–16 – F1edema/R1edema (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 405 п.о.). 1, 5, 9, 13 – ДНК выделена из червей на 20-й день после начала эксперимента; 2, 6, 10, 14 – ДНК выделена из червей на 30-й день после начала эксперимента; 3, 7, 11, 15 – ДНК выделена из исходного штамма 71/12; 4, 8, 12, 16 – отрицательный контроль (вода); 17 – маркер молекулярной массы (фрагмент ДНК 362 п.о.)

Выделенные культуры лизировались специфическими сибирезывенными бактериофагами Гамма и Fah-ВНИИВВиМ.

На специальных питательных средах (по Green) при культивировании в атмосфере углекислого газа вырастали крупные, выпуклые, блестящие, полупрозрачные гладкие колонии слизистой (мукоидной) консистенции. Процент капсулообразующих клеток у вновь выделенных культур не изменился по сравнению с исходной культурой и находился на уровне 90 %.

Вирулентность выделенных из червей культур практически не имела отличий от величин исходного штамма – показатели ЛД<sub>50</sub> для белых мышей составили от 10 до 50 спор.

Провели генотипирование выделенных из червей штаммов по P.Keim [8] и Le Fleche [9]. Отличий от исходного штамма *B. anthracis* 71/12 не найдено.

Из клеток исходной культуры штамма 71/12 и полученных культур выделили ДНК. Выделенные ДНК были использованы в качестве матриц в ПЦР со специфическими праймерами (табл. 1): rag, lef, edema – к последовательностям генов плазмиды токсинообразования; рХO1 и рХO2 – к последовательности генов плазмиды капсулообразования возбудителя сибирской язвы (рис. 2).

Из представленных данных следует, что выделенные на 20-й и 30-й день после начала эксперимента культуры не изменили своих свойств после контакта с калифорнийскими червями – сохранились все генетические детерминанты вирулентности. Таким образом, пребывание сибирезывенной культуры в организме дождевого червя не привело к утрате ни одной из двух плазмид – капсуло- и токсинообразования.

Под влиянием червей происходит снижение количества *B. anthracis* в почве на 30–50 %. Остающиеся споры возбудителя сибирской язвы не меняют своих свойств и сохраняют все основные биологические и генетические факторы патогенности.

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д/2 от 15.08.2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., Медгиз; 1962. 180 с.
2. Говорунова В.А., Мацаренко Г.В., Маринин Л.И., Степанов А.В. Плотная питательная среда для выявления возбудителя сибирской язвы. Патент РФ 2125610, опубл. 27.01.1999.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ГИГИЕНА; 2009. 304 с.
4. Мечников И.И. Вопросы иммунитета. Избранные труды. М.: Изд. АН СССР; 1951. С. 37–69.
5. Смирнова А.М., Подлевский А.Ф. Микробиологические основы диагностики инфекционных заболеваний. В кн.: Инфекционные и паразитарные болезни. Л.: Медицина; 1979. 192 с.
6. Преснов И.Н. Некоторые итоги индикации *Bacillus anthracis* в неблагополучных по сибирской язве пунктах. В кн.: Проблемы ветеринарной санитарии. М.; 1967. Т. 29. С. 72–8.
7. Стом Д.И., Балаян А.Э., Полехина С.В., Быбин В.А. Способ тестирования активности препаратов, полученных из дождевых червей. Патент РФ 2377561, опубл. 27.12.2009.
8. Харди К., редактор. Плазмиды. Методы. М.: Мир; 1990. С. 11–8.
9. Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982; 33:60.
10. Bollinger O. Arbeiten aus dem pathologisch. Institut München; 1886.
11. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M. et al. Multi-locus variable number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182:2928–36.
12. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001; 1:2.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
14. Turner A.J., Galvin L.W., Miller G.T., Rubira R.J. Anthrax explodes in an Australian summer. In: Abstract Book. 3rd Intern. Confer. on Anthrax, 7–10 September. England, Plymuth. 1998. P. 3.
15. Van de Vós. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990; 68:19–23.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 180 p.
2. Govorunova V.A., Matsarenko G.V., Marinin L.I., Stepanov A.V. [Solid Medium for Anthrax Agent Detection]. RF Patent № 2125610.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., et al. [Methods of Studying of Anthrax Agent Biological Properties]. M.: Gigiena; 2009. 304 p.
4. Mechnikov I.I. [Immunity Issues. Selected Works]. M.: Izd. Akademii Nauk; 1951. P. 37–69.
5. Smirnova A.M., Podlevsky A.F. [Microbiological principles for infectious disease diagnostics]. In: [Infectious and Parasitic Diseases]. L.: Meditsina; 1979. 192 p.
6. Presnov I.N. [Some inferences on *Bacillus anthracis* indication in disadvantaged in relation to anthrax areas]. In: [Problems of Veterinarian Sanitary Science]. M.; 1967. Vol. 29. P. 72–8.
7. Stom D.I., Balayan A.E., Polekhina S.V., Bybin V.A. [Method of activity testing of preparations produced from earthworms]. RF Patent 2377561.
8. Hardy K., editor. [Plasmids. Methods]. M.: Mir; 1990. P. 11–8.

Authors:

Shishkova N.A., Marinin L.I., Mokrievich A.N. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Шшишкова Н.А., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 26.10.11.