

УДК 579.6

**КУЛЬТУРАЛЬНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ К *BACILLUS ANTHRACIS*
СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
ПАЛЕОНТОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ**

Салтыкова Анастасия Леонидовна

магистрант

ФГБУН ВО «Арктический государственный
агротехнологический университет»

Научный руководитель: **Ерофеевская Лариса Анатольевна**

к.б.н., доцент

Горный институт СВФУ им. М.К. Аммосова

старший научный сотрудник

ФГБУН ФИЦ «Якутский научный центр СО РАН» обособленное

подразделение Институт проблем нефти и газа СО РАН

Научный консультант: **Боескоров Геннадий Гаврилович**

д.б.н., профессор

Институт естественных наук СВФУ им. М.К. Аммосова

главный научный сотрудник

ФГБУН Институт геологии алмаза и благородных металлов СО РАН

Аннотация. Представлены результаты исследования культурально-биохимических свойств близкородственных к *Bacillus anthracis* спорообразующих бактерий, выделенных из почвенных частиц, собранных с шерсти двух замороженных детенышей ископаемого пещерного льва *Pantheraspelaea*, найденных в низовьях р. Уяндина в Абыйском районе, Республика Саха (Якутия) в естественных условиях. Из полученных образцов почвы выделены преимущественно спорообразующие аэробные бактерии рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. atropheus*, *B. simplex*, *B. megaterium*,). Общим для всех выделенных культур бактерий является свойство криофильности. Способность к спорулированию и криофильность, позволили полученным бактериальным культурам сохраниться длительное время на почвенных частицах, прилипших к шерсти палеонтологических образцов при их длительном хранении в холодильных условиях.

Ключевые слова: палеонтологические образцы, почва, микроорганизмы, пещерный лев, криофильность, сибирская язва, *Bacillus*.

CULTURAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF SPORE-FORMING BACTERIA CLOSELY RELATED TO BACILLUS ANTHRACIS ISOLATED FROM PALEONTOLOGICAL SAMPLES

**Saltykova Anastasia Leonidovna
Erofeevskaya Larisa Anatoljevna
Boeskorov Gennady Gavrilovich**

Abstract: The article presents the results of a study of the cultural and biochemical properties of spore-forming bacteria closely related to *Bacillus anthracis*, isolated from soil particles collected from the wool of two frozen cubs of the fossil cave lion *Pantheraspelaea*, found in the lower reaches of the Uyandina River in the Aby district, the Republic of Sakha (Yakutia) under natural conditions. Mainly spore-forming aerobic bacteria of the genus *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. atropheus*, *B. simplex*, *B. megaterium*) were isolated from the obtained soil samples. The cryophilicity property is common for all isolated bacterial cultures. The ability to sporulate and cryophilicity allowed the obtained bacterial cultures to persist for a long time on soil particles adhering to the wool of paleontological samples during their long-term storage in refrigerating conditions.

Key words: paleontological samples, soil, microorganisms, cave lion, cryophilicity, anthrax, *Bacillus*.

Актуальность исследований. В условиях вечной мерзлоты сохранность микроорганизмов может значительно увеличиваться, и поэтому вечная мерзлота является своеобразным аккумулятором микробиоты. Сохранение спор бацилл, в том числе *B. anthracis* в условиях вечной мерзлоты теоретически должно превышать сохранность микроорганизмов в вегетативной форме. Следовательно, вечная мерзлота может позволить обнаружить архаичные формы этого микроорганизма, что может дополнить наши знания об эволюции микроба сибирской язвы [1, Doi: 10.1371/journal.pone.0209140].

12 августа 2015 года шахтеры, добывающие бивни мамонта из вечной мерзлоты на берегу реки Уяндина в Абыйском улусе (районе) Якутии в 57 км

от районного центра Белая гора (широта N68.564567, долгота E 144.769827) обнаружили двух замороженных льдом котят пещерного льва *Pantheraspelaea*. Открытие было замечательным своей беспрецедентной степенью сохранности, шерсть и мягкие ткани животных были сохранены (рис. 1).



Рис. 1. Подготовка к отбору биоматериала пещерного львёнка (Павлов И.С., Чернявский В.Ф., Никифоров О.И.), фото Ерофеевской Л.А.

В июне 2016 года был произведён отбор образцов биоматериалов детенышей ископаемого пещерного льва на микробиологические исследования, в ходе которых был выделен возбудитель сибирской язвы – *Bacillus anthracis*.

Споры сибиреязвенной палочки устойчивы к внешним воздействиям и могут сохранять в почве жизнеспособность в течение многих десятилетий (по некоторым данным – до 100 лет). **Заразиться можно преимущественно контактным путём.** Большую опасность из зараженных объектов представляют почва, навоз и особенно скотомогильники. Возможен и **пищевой (алиментарный)** путь передачи при употреблении продуктов,

полученных от больных животных. Наибольшую опасность представляет **аспирационный (воздушно-пылевой)** путь заражения, когда споры микроорганизма вместе с пылью проникают в организм человека через органы дыхания, что приводит к развитию генерализованной формы сибирской язвы. Это может происходить в ходе различных земляных и **строительных работ** (рытья траншей, закладки зданий и сооружений и др.). При этом, почвенные горизонты почвы, а вместе с ними и микроорганизмы покоящиеся в них, оказываются вскрытыми, выброшенными на поверхность и рассеянными в окружающей среде. Ежегодно в мире регистрируют около 1 миллиона случаев сибирской язвы у животных и 25-100 тысяч случаев заболевания у людей [2, С. 300-301].

Принадлежность полученного в ходе исследований штамма к виду *B. anthracis* была подтверждена методами классической и современной микробиологии.

Первичный скрининг по базе данных по базе данных GenBank и Ribosomal Database Project II (RDP-II) показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующим систематическим группам: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Bacillus*, причём гомология с некоторыми видами рода *Bacillus* составляет 99%.

При секвенировании переменных участков 16S rDNA получили следующую собранную нуклеотидную последовательность для исследуемого штамма (рис. 2).

```
TTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCCTCCACGGTTGAGCC  
GTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAAT  
AATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGT  
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGC  
ACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCA  
CGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTG  
CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTC  
TCAGGTTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCT  
AATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTTG  
AACCATGCAGTTCAAAATRTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTAT  
CCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACT  
TCWTRAGAGCAAGCTCTYAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGC  
CGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCT
```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность для исследуемого штамма

Результаты обработки секвенсов при помощи компьютерной программы находящейся на сайте RDP-II, предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев, представлены на рис. 3.

<u>S000001855</u>	0.993 0.935 1428	<i>Bacillus mycoides</i> (T); ATCC6462; AB021192
<u>S000012966</u>	0.959 0.812 1446	<i>Bacillus flexus</i> (T); IF015715; AB021185
<u>S000016288</u>	0.993 0.963 1446	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (T); DSM11821; AB021199
<u>S000102217</u>	0.961 0.814 1450	<i>Bacillus acidicola</i> (T); 105-2; AF547209
<u>S000131291</u>	0.955 0.781 1410	<i>Bacillus shackletonii</i> (T); LMG 18435; AJ250318
<u>S000376345</u>	0.993 0.887 1236	<i>Bacillus anthracis</i> (T); ATCC 14578; AB190217
<u>S000979524</u>	0.998 0.967 1408	<i>Bacillus thuringiensis</i> (T); IAM 12077; D16281
<u>S002287229</u>	0.997 0.986 1465	<i>Bacillus cereus</i> (T); ATCC 14579; AE016877

Рис. 3. Результаты обработки секвенсов

Дальнейший анализ по RDP-II 16S рРНК показал гомологию с теми же видами бактерий.

По данным анализа было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (рис. 4).

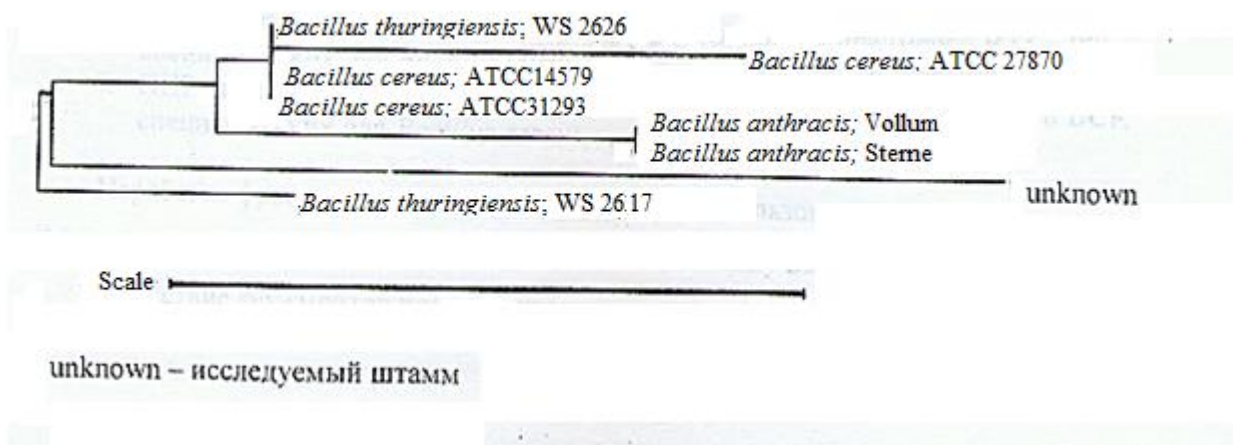


Рис. 4. Филогенетическое дерево

Для более точной идентификации исследуемых штаммов был использован метод идентификации с помощью видоспецифических праймеров.

По данным проведенного анализа секвенсов переменных участков 16S рДНК (99%), а также ПЦР анализа видоспецифических праймеров исследуемая культура отнесена к виду *Bacillus anthracis*.

В виду патогенности дальнейшая работа по идентификации культуры не проводилась.

21.09. 2016 года, по распоряжению главного государственного санитарного врача Республики Саха (Якутия), в палеонтологическом пункте обнаружения детенышей ископаемого пещерного льва были отобраны 6 проб грунта, в которых обнаружены 3 штамма *B. anthracis*.

С целью изучения свойств, близкородственных к *B. anthracis*, спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, в 2021 г. на микробиологические показатели были исследованы законсервированные образцы почвенных частиц, снятые с шерсти замороженных детенышей ископаемого пещерного льва.

Краткая характеристика объекта исследования.

Детеныши ископаемого пещерного льва *Pantheraspelaea* (Goldfuss, 1810) обнаружены в августе 2015 г. в низовьях р. Уяндина в Абыйском районе, Республика Саха (Якутия) в естественных условиях. Два замороженных трупа детенышей пещерного льва были найдены совместно в многолетнемерзлых отложениях, по-видимому, относились к одному выводку и, возможно, погибли в результате обвала норы. Возраст детенышей составлял примерно 1-2 недели. Один из детенышей хорошо сохранился, практически все части его тела не нарушены; желтовато-коричневый шерстный покров также сохранен. Останки второго львенка, из которого взят образец №2, фрагментарны, от него сохранились только вмерзшие в лед голова и передняя часть тела с одной передней лапой и, частично, шерсть желтовато-коричневого цвета, с отдельными прядями на концах темно-коричневого цвета. Радиоуглеродная датировка второго львенка составляет около 47 тысяч лет назад, что свидетельствует о том, что детеныш жил во время позднего плейстоцена, в конце ледникового периода. Ископаемые пещерные львы были широко распространены в Восточной Сибири, в том числе и на территории Якутии, в среднем и позднем плейстоцене (примерно 400 – 12 тысяч лет назад) [3, С. 24-32].

Методы лабораторных исследований включали: выделение почвенных микроорганизмов в культуру, идентификацию и исследование чистых культур, микроскопию.

Основными параметрами микробиологических результатов являлись: изучение пейзажа микробных культур, выделенных из почвенных образцов; морфо-культуральные признаки колоний; биохимические характеристики выделенных культур.

Для исследования ростовых характеристик выделенных микроорганизмов использовали классические методы культивирования [4, 479 с.; 5, 131 с.]. Для получения изолированных колоний готовили ряд разведений почвенной суспензии в стерильной воде, используя постоянный коэффициент разведения равный 10. В ходе опыта использовали один и тот же коэффициент разведения, т.к. это уменьшает вероятность ошибки. Для этого стерильную воду разливали по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносили в пробирку с 9 мл стерильной воды - это 1-е разведение, 10^{-1} . Полученное разведение тщательно перемешивали новой пипеткой, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру выполняли 3-5 раз, затем этой же пипеткой отбирали 1 мл полученной суспензии и переносили во 2-ю пробирку – получая 2-е разведение, 10^{-2} . Таким же образом готовили и последующие разведения.

Посев исследуемого материала проводили поверхностным способом. Для этого, перед посевом разливали расплавленную агаризованную питательную среду в ряд стерильных чашек Петри, по 20 мл в каждую. На поверхность застывшей и подсушенной среды стерильной пипеткой наносили точно измеренный объем (0,1 мл) соответствующего разведения и распределяли его стерильным шпателем по поверхности среды. Высевы на плотную среду проводили из 3-х последних разведений, причем из каждого делали 2-4 параллельных высева. Для каждого разведения использовали новый стерильный шпатель. После посева чашки Петри помещали в термостат крышками вниз.

Идентификацию микроорганизмов осуществляли по известным определителям [6, 408 р.].

В работе использован лабораторный поляризованный микроскоп Axiolab Pol, производство фирма "Карл Цейсс" Германия, объектив N Achromat 5×/0.13 (цветовой код – красный, свободное рабочее расстояние (FOD) – 11,2 мм). Числовая апертура × 1000. Максимальное полезное увеличение микроскопа – 130000 и биологический микроскоп «Biomed-3» с увеличением от 40 до 1000 крат.

Результаты исследований.

Из полученных образцов почвы выделены преимущественно близкородственные спорообразующие аэробные бактерии рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. atropheus*, *B. simplex*, *B. megaterium*).

Общим для всех выделенных культур бактерий является свойство криофильности (способность развиваться при относительно низких

температурах, с оптимумом роста для этих микробов (+15...+20 °С), минимумом – 0 °С и максимум 30 °С).

Способность к спорулированию и криофильность, позволили полученным бактериальным культурам сохраниться длительное время в почвенных частицах, прилипших к шерсти палеонтологических образцов при их длительном хранении в условиях заморозки.

Биохимические свойства выделенных из почвы бактерий представлены в таблице 1.

Таблица 1

Свойства выделенных культур

Свойства	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus atropheus</i>	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
Окраска по Граму	+	+	+	+	+	+
Подвижность	+	+	+	+	+	—
Наличие спор	+	+	+	+	+	+
Наличие капсул	-	-	-	-	-	+
Каталаза	+	+	-	-	+	+
Желатиназа	+	+	+	+	+	+
Лецитиназа	-	+	-	-	-	+
Редукция NO ₃ до NO ₂	+	+	-	-	-	+
Гидролиз крахмала	-	+	+	+	+	+
Кислота из: глюкозы	-	+	+	+	-	+
лактозы	-	+	-	+	-	-
мальтозы	-	+	-	-	-	+
маннита	-	-	-	-	-	-
ксилозы	-	-	-	-	-	-
глицерина	-	+	-	+	+	-
арабинозы	-	-	-	-	-	-
сорбита	+	-	-	-	-	+
сахароза	-	+	+	-	-	-
фруктоза	-	-	-	-	-	+
Цитрат натрия	-	+	-	-	-	-
Малонат натрия	-	+	-	-	-	-
β-галактозидаза	-	-	-	-	-	-
Образование уреазы	-	-	-	-	-	-
Образование индола	-	-	-	-	-	-
Сероводород	-	-	-	-	-	-
Лизин	-	-	-	-	-	-
Орнитин	+	-	-	-	-	-
Обозначения тестов: + положительный; - отрицательный; (+) слабоположительный						

Интерес микробиологов к бактериям рода *Bacillus* связан с разнообразием видового состава и повсеместного распространения представителей этого рода, цикла развития, необычной устойчивости их спор к химическим и физическим агентам и патогенности.

Споры признаны самой выносливой среди известных форм жизни на Земле. В состоянии покоя у спор метаболизма нет, и они показывают высокую степень устойчивости к инаktivации различными физическими факторами, включая влажный пар, высушивание, ультрафиолетовое и гамма-излучение, вакуум и окисляющие агенты. Несмотря на инаktivацию метаболизма в состоянии покоя, споры остаются способными к непрерывному контролю пищевого состояния их среды и быстро реагируют на поступление подходящих питательных веществ, прорастая и возобновляя вегетативный рост [7, Р. 572-584].

Изучение *Bacillus* ведется в разных отраслях, начиная от пищевой промышленности и заканчивая биотехнологией и генной инженерией. Но бактерии рода *Bacillus* представляют интерес и в экологических исследованиях, так как населяют различные места обитания. Очевидно, что антропогенный пресс, который испытывает современная окружающая среда, так же может влиять на изменчивость этих микроорганизмов.

В настоящее время штаммы *Bacillus* используются для получения продуктов четырех типов: 1) ферментов, 2) антибиотиков, 3) высокоочищенных биопрепаратов, включая усилители запаха и пищевые добавки, и 4) инсектицидов.

За исключением сибиреязвенной бациллы, бактерии рода *Bacillus* не обладают большой патогенностью для млекопитающих. Разве что, *B. cereus* является возбудителем ряда оппортунистических инфекций (осложняющих другие заболевания) – чаще всего мастит у коров, образование абсцессов, септицемию, эндокардиты, а также инфекции уха, глаз и ран [8, Р. 207-314].

Бактерии рода *Bacillus* обычно не прихотливы и растут на простых питательных средах, но для некоторых видов предпочтительны специальные условия. Некоторые способы получения накопительных культур для селективного выделения штаммов рода *Bacillus* представлены в таблице 2 [9].

Таблица 2

Способы получения накопительных культур для выделения *Bacillus*

Вид рода <i>Bacillus</i>	Способ получения
<i>B. acidocaldarius</i>	Среда с pH 4, инкубация при 60°C
<i>B. alcalophilus</i>	Высев на питательный агар с pH 8,5-11
<i>B. azotofixans</i>	Агаризованная среда, не содержащая N, с тиамин и биотином
<i>B. azotoformans</i>	Среда с пептоном, инкубация в атмосфере N ₂ O
<i>B. coagulans</i>	Накопительная культура в питательном бульоне с глюкозой при pH 5,5 и 50°C. Инкубация чашек Петри с той же средой при 50°C
<i>B. fastidiosus</i>	Минимальная среда с мочевиной или аллантином в качестве единственного источника C и N
<i>B. firmus</i>	Среда с агаром на морской воде, инкубация при 22°C в течение 7 дней
<i>B. licheniformis</i>	Накопительная культура на среде с пептоном и нитратом в анаэробных условиях
<i>B. megaterium</i>	Минимальная среда с глюкозой и нитратом в качестве единственного источника N
<i>B. pantothenicus</i>	Накопительная культура в питательном бульоне, содержащем 4% NaCl, инкубация при 3°C
<i>B. pasteurii</i>	Среда, содержащая дрожжевой экстракт, (NH ₄)SO ₄ и 5% мочевины, pH 9. Инкубация в аэробных условиях
<i>B. polymyxa</i>	Среда с пептоном и крахмалом в пробирках с дюрхемовскими трубками. Должно наблюдаться выделение газа
<i>B. sphaericus</i>	Среда, содержащая аргинин в качестве единственного источника углерода и азота. Стрептоцин используется как селективный фактор для выделения патогенных для насекомых штаммов
<i>B. stearothermophilus</i>	Различные среды, инкубация при 65°C

Таким образом, бактерии, выделенные из палеонтологических образцов и окружающего грунта и почвенного покрова, хотя и имеют перспективу на эффективное включение их в решение экологических проблем, однако требуют детального изучения и применения современных методов идентификации выделенных штаммов. Сам же факт идентификации близкородственных спорообразующих бактерий, с возможным клинико-эпидемиологическим потенциалом, системно вписывается в современные проблемы сибирской язвы, которая является компонентой особо-опасных инфекций.

Считаем, что научно-практические дискуссии по этому вопросу будут полезны и продуктивны не только в решении задач в области обеспечения

биологической безопасности Республики Саха (Якутия), но и будут востребованы в разработке экологосберегающих технологий.

Список литературы

1. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christiany D., et al. (2019). Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. PLoS ONE 14(5): e0209140. Doi: 10.1371/journal.pone.0209140.
2. Медицинская микробиология / под ред. акад. РАМН В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД. – 2002. – С. 300-301.
3. Мащенко Е., Боескоров Г., Потапова О., Протопопов А. Львы – от плейстоцена до современности. О чем рассказали детеныши льва из Якутии? // Наука и жизнь. – 2016. – № 6. – С. 24-32.
4. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина. – 1972. – 479 с.
5. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, И.Б. Горнова, Н.А. Гусарова – М.: Делипринт. – 2001. – 131 с.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Book Review // Int. J. of Syst. Bact., July, 1985. – 408 p.
7. Nicholson W.L. Resistance of *Bacillus* Terrestrial and Extraterrestrial Environments / W.L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H.J. Melosh and P. Setlow // Microbiology and Molecular biology reviews. - 2000. - vol. 64, № 3. - p. 584-572.
8. Gilbert R. et al. *Bacillus cereus* and other *Bacillus species*: Their part in food poisoning and other clinical infections, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification (R. C W. Berkeley and M. Goodfellow, eds.) / R. Gilbert, P.C. Turnbull, J.M. Parry and J.M. Kramer // Academic Press. - London. - 1981. - p. 207-314.
9. Садунова А.В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus* // Материалы VI Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум» URL: <https://scienceforum.ru/2014/article/2014001198> (дата обращения: 28.09.2021).

© А.Л. Салтыкова, Л.А. Ерофеевская, Г.Г. Боескоров