

РАЗРУШЕНИЕ СПОР И ВЕГЕТАТИВНЫХ КЛЕТОК ТЕТРОДОТОКСИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *BACILLUS SP. 1839*

© 2015 А.С. Кротов¹, Т.Ю. Магарламов², Е.А. Горобец¹, Д.И. Мельникова¹, О.А. Шокур¹

¹Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

Статья поступила 11.11.2015

Проведен анализ методов разрушения вегетативных бактериальных клеток и спор условно-патогенного штамма *Bacillus sp. 1839*, являющегося продуцентом тетродотоксина – низкомолекулярного термостабильного нейротоксина. Выявлены оптимальные условия полного разрушения бактериальной культуры, среди которых наиболее эффективными являются сочетание повышенной температуры и давления, а также ультразвуковая дезинтеграция клеточных структур.

Ключевые слова: *тетродотоксин, бациллы, ультразвуковая дезинтеграция, разрушение спор*

Бактерии являются первоисточником различных низкомолекулярных токсинов [1], многие из которых способны выступать в качестве естественных «загрязнителей» окружающей среды благодаря своей устойчивости к внешним воздействиям и способности к быстрому распространению в окружающей среде. Подобные устойчивые токсины накапливаются в донных отложениях, а также способны «мигрировать» между различными организмами по пищевым цепям, достигая максимального уровня в конечных звеньях [2, 3]. Одним из таких токсинов, обнаруженных как в морских донных отложениях, так и в морских гидробионтах, таких как рыба-фугу, моллюски, ракообразные, иглокожие и немертины, является тетродотоксин (ТТХ) [4, 5]. ТТХ – это низкомолекулярный термостабильный нейротоксин, являющийся чрезвычайно сильным блокаторм натриевых каналов. Продуцентом ТТХ в морских гидробионтах, как правило, выступают морские бактерии из рода *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Actinomyces*, *Serratia*, *Microbacterium* [5]. Основным критерием загрязнения среды подобными токсин-продуцирующими бактериями является устойчивость этих микроорганизмов к различным внешним факторам, таким как термическое воздействие,

разрушение химическими реагентами и др. В соответствии с этим критерием наибольшую опасность загрязнения окружающей среды представляют бактерии, способные к генерации спор – особым клеточным структурам, позволяющих бактериям переживать неблагоприятные условия. Одним из продуцентов низкомолекулярных токсинов являются бактерии рода *Bacillus*, споры которых содержат токсичные соединения и при этом чрезвычайно устойчивы к разнообразным физико-химическим воздействиям, таким как термическая обработка, электромагнитное излучение, ферментативное разрушение [6]. Тем не менее, существует целый ряд методов, позволяющий добиться полного или частичного разрушения спор *Bacillus*. Часть методов, целью которых является абсолютная нейтрализация и уничтожение спор, предполагает использование экстремально жестких физических факторов, таких как длительное микроволновое излучение, высокая температура (до 800-1000 К) и давление (до 800-900 МПа) [7-9]. Другая группа методов, направленная на разрушение клеточной стенки спор с целью экстракции определенных соединений, например, ДНК, заключается, в основном, в сочетании относительно мягких термических, химических и механических воздействий.

В морском черве *Cephalothrix simula* (Nemertea) нами был обнаружен штамм *Bacillus 1839*, продуцирующий ТТХ. Уникальной особенностью обнаруженного штамма выступает его способность накапливать ТТХ внутри свободных спор и эндоспор [4].

Цель работы: проверить резистентность спор и эндоспор бацилл к действию различных факторов среды и подобрать оптимальные условия разрушения спор и эндоспор. Полученные данные должны лечь в основу разработки методов стерилизации продуктов из морских гидробионтов.

Кротов Антон Сергеевич, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: as_krotov94@mail.ru

Магарламов Тимур Юсифович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии. E-mail: biotimur@yandex.ru

Горобец Екатерина Алексеевна, студентка

Мельникова Дарья Игоревна Мельникова, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: dashkamelnikova93@gmail.com

Шокур Ольга Андреевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии и биоиспытаний. E-mail: olga_shokur@list.ru

Материалы и методы. Бактерии штамма *Bacillus 1839* были взяты из коллекции морских гетеротрофных микроорганизмов ИБМ ДВО РАН и культивированы при 23°C в течение 7 суток на среде Йошимицу–Кимура следующего состава: пептон (5,0 г), дрожжевой экстракт (2,0 г), глюкоза (1 г), K₂HPO₄ (0,2 г), MgSO₄ × 7H₂O (0,1 г), агар (12,0 г), дистиллированная вода (500 мл), и морская вода (500 мл); pH среды 7,8–8,0. По истечению 7 суток производили смыв бактерий с твердой среды, используя 1% фосфатный буфер, следующего состава: NaCl (9,0 г), KCl (0,1 г), Na₂HPO₄ (1,65 г), KH₂PO₄ (0,083 г), дистиллированная вода (50 мл), pH 7,4. Полученную суспензию использовали в дальнейших экспериментах для разрушения спор. Перед каждым экспериментом осуществляли контрольную оценку состояния спор и бактериальных клеток на временных препаратах, а также производили подсчет процентного соотношения спор и вегетативных клеток. Для этого изготавливали мазки и окрашивали препараты по методу Пешкова. Бактериальные препараты анализировали на световом микроскопе (IX83, Olympus, Япония).

Для разрушения спор термическим шоком из суспензии бактерий отбирали аликвоты по 1 мл, помещали их на 15 мин и 30 мин в автоклав (TUT-2540EKA, Tuttnauer, Израиль), со следующими условиями: температура 121°C и давление 21 атм. После прохождения указанного времени производили оценку состояния спор и бактериальных клеток.

Для разрушения спор холодным шоком суспензию бактерий помещали в низкотемпературный холодильник (MDF-U73V, Sanyo, Япония) при -80°C и оставляли на 1 ч и на 24 ч. По прошествии указанного времени бактерий размораживали, проводили оценку состояния клеток.

Для разрушения спор этиловым спиртом из суспензии бактерий отбирали две аликвоты по 100 мкл и доводили их до 1 мл 70% и 95% этанолом, соответственно. Образцы оставляли на шейкере (MSV-3500, Biosan, Латвия) 1100 об/мин, на 15 мин, 1 ч, 3 ч и 21 ч; через соответствующее время производили оценку состояния клеток.

Для ультразвукового разрушения спор суспензию клеток помещали в ультразвуковой гомогенизатор (HD 2070, Vandelin Sonopuls, Германия) и производили ультразвуковое воздействие (20 kHz, амплитуда 228 мкм, рабочий цикл 0.8 с интервалом 0.2 с) периодами по 10 мин. После каждого периода проводили оценку состояния клеток.

Результаты. Представленные в норме клетки имели хорошо прокрашенную цитоплазму с четко выраженной клеточной стенкой (рис. 1А). Вегетативные клетки были представлены палочками, (средняя длина - 2,68 мкм, средняя ширина - 0,41 мкм), споры имели яркое гомогенное

окрашивание интенсивно голубого цвета с хорошо выраженной коккобациллярной формой (ср. длина - 1,11 мкм, ср. ширина - 0,56 мкм). Сильные морфологические изменения у вегетативных клеток и спор вызывал термический шок при 121°C и 21 атм. По истечению 15 мин в автоклаве у большинства вегетативных клеток клеточная стенка была бледно окрашенной, цитоплазма либо не окрашивалась, либо окрашивалась слабо, размеры и форма клеток также менялись - клетки становились более широкими (ср. длина - 2,64 мкм, ср. ширина - 0,68 мкм) (рис. 1Б). Большая часть спор имела то же строение, что и в норме: короткие палочки с интенсивно окрашенным содержимым. Часть спор была видоизменена: внутреннее содержимое имело менее интенсивное окрашивание по сравнению с контролем (рис. 1В). По прохождении 30 мин в автоклаве все клетки приобрели очень бледную окраску цитоплазмы и бледную окраску клеточной стенки, спор обнаружено не было.

Холодовой шок при минус 80°C в течение 1 часа и 24 часов не привел к разрушению спор и бактериальных клеток. По прохождении 24 ч существенных морфологических изменений клеток и спор по сравнению нормой не было выявлено. Соотношение спор и клеток спустя 24 ч незначительно отличалось от контроля и находилось в пределах допустимой погрешности.

При обработке бактериальной культуры этанолом морфологические особенности клеток и спор не подвергались заметным изменениям даже спустя максимальное время в 70% и 95% этиловом спирте и оставались схожими с контролем. После обработки 70% этанолом в течение 21 ч соотношение спор и клеток слабо изменилось и составило 41,3% спор, 2,0% эндоспор и 56,7% клеток, в то время, как перед началом эксперимента соотношение в бактериальной культуре было следующим: 49,1% спор, 0,2% эндоспор и 50,7% клеток. При обработке бактерий 95% этанолом спустя 21 ч относительное количество спор и клеток осталось практически на уровне начала эксперимента (47,2% спор и 48,1% клеток), а соотношение эндоспор заметно увеличилось и составило 4,6%.

При ультразвуковом воздействии уже на 10-й минуте в вегетативных клетках становились заметны деструктивные изменения: часть клеток приобретала неправильную форму с изрезанными границами (рис. 1Г), у некоторых бактерий происходил выход внутреннего содержимого (плазмодия) из клеточной оболочки (рис. 1Д), клеточная оболочка при этом слабо окрашивалась в розоватый цвет, а вышедший плазмодий был ассоциирован с клеточной стенкой и был окрашен в интенсивно синий гомогенный цвет. На 20-й минуте ультразвукового разрушения подобные изменения наблюдались уже у большинства

бактериальных клеток. При ультразвуковой дезинтеграции более 30 мин деструктивные трансформации становились заметны и в спорах: наравне с нормально выраженными спорами были выявлены структуры, имеющие различную неправильную форму и небольшой размер (ср. длина - 0,73 мкм, ср. ширина - 0,34 мкм) (рис. 1Е) и,

по всей видимости, являющиеся фрагментами разрушенных спор. Однако, полного разрушения бактериальной культуры (как вегетативных клеток, так и спор), удалось добиться только спустя 70 минут ультразвукового воздействия при данных условиях.

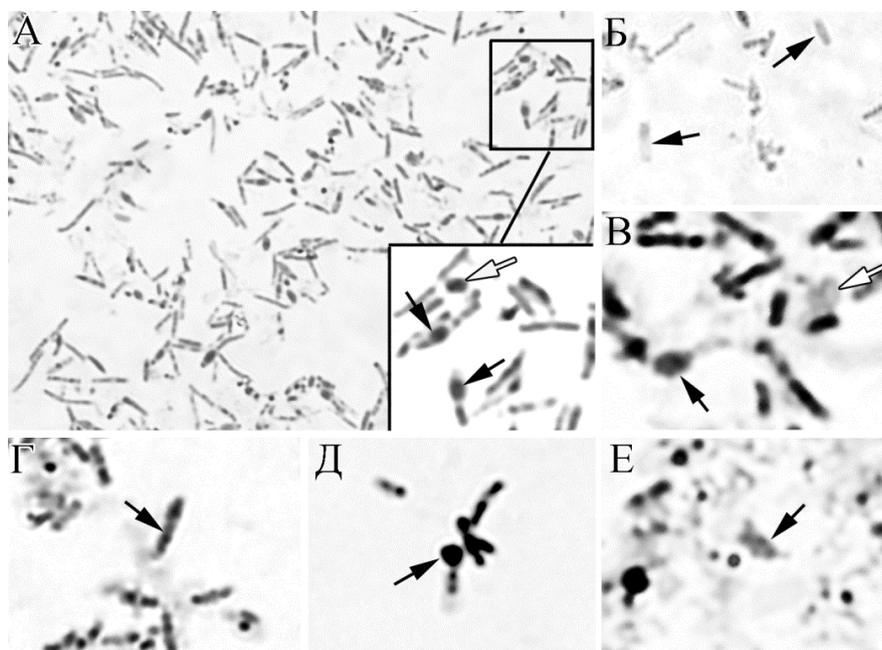


Рис. 1. Бактериальные клетки *Bacillus* sp. (1839), окрашенные по методу Пешкова, световая микроскопия:

А – бактериальные клетки в норме (400 X). Вставка – свободные споры (белая стрелка) и эндоспоры (черные стрелки) (1000 X). Б – бактериальные клетки (стрелки), подверженные термическому шоку при 121°C и 21 атмосфере в течение 15 минут (500 X). В – бактериальные клетки (стрелки), подверженные термическому шоку при 121°C и 21 атмосфере в течение 15 минут: часть спор имеют нормальное строение (черная стрелка), часть спор разрушена (белая стрелка) (1200 X). Г – Бактериальная культура, обработанная ультразвуком в течение 10 мин.: часть вегетативных клеток (черная стрелка) имеют деструктивные изменения (1000 X). Д - Бактериальная культура, обработанная ультразвуком в течение 10 минут. Выход плазмодия из клеточной стенки (стрелка) (1000 X). Е - Бактериальная культура, обработанная ультразвуком в течение 30 минут, деструктивные изменения в вегетативных бактериальных клетках и в спорах (1000 X).

Обсуждение. Среди всего многообразия методов разрушения спор и вегетативных бактериальных клеток лишь довольно небольшое число подходов являются доступными в промышленности и в домашних условиях. Тем не менее, такие методы, как термический и холодовой шок, спиртовая дезинфекция и ультразвуковая дезинтеграция, были выбраны нами, поскольку их эффективность в разрушении или нейтрализации спор *Bacillus* была отмечена во многих работах [9, 10]. Этиловый спирт - это наиболее популярный дезинфектант, который, как правило, всегда используется для дезинфекции рабочих поверхностей, так как считается, что он высокоэффективно вызывает гибель бактериальных клеток [11]. Проведенные нами исследования по разрушению бактериальной культуры *Bacillus* 1839 этиловым спиртом в концентрации 70% и 95% в условиях длительного культивирования

показали неэффективность этого метода, поскольку обработка этанолом не привела к разрушению, как спор, так и вегетативных клеток. По всей видимости, бактерии и споры штамма *Bacillus* 1839, как и многие другие штаммы рода *Bacillus*, обладают резистентностью к этиловому спирту различной концентрации.

Еще одним распространённым способом разрушения клеточной культуры в микробиологии является воздействие низкой температуры. Деструктивные изменения в этом случае происходят в клетках за счет формирования кристаллов льда, которые разрывают биологический объект. Эксперименты, проведенные нами при температуре минус 80°C не выявили разрушения как вегетативных клеток, так и их спор. Возможно, отсутствие разрушений в спорах связано с принципом действия льда, как разрушающего агента: поскольку споры являются дегидратированными

структурами, практически полностью лишены воды, то низкая температура не может привести к формированию кристаллов льда, а, следовательно, и к разрушению спор. Однако причины отсутствия разрушений в вегетативных клетках остаются неясными и требуют дальнейших исследований.

Наиболее эффективными методами полного разрушения клеточной культуры *Bacillus* выступили термошок, обусловленный сочетанием повышенной температуры и давления, и ультразвуковая дезинтеграция. Разрушение бактерий и спор при температуре 121°C и давлении 21 атм происходило в течение 30 мин, в то время как ультразвуковое воздействие при частоте 20 kHz достигало подобного результата в течение 70 мин. Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности использования сочетания повышенной температуры и давления для разрушения спор *Bacillus* 1839 с целью дезинфекции продуктов, потенциально загрязненных ТТХ-продуцирующими бациллами. Тем не менее, открытым остается вопрос сохранения активности токсина при данных условиях, поскольку неизвестно, вступает ли ТТХ в химические взаимодействия при подобной температуре и давлении. Дальнейшие наши исследования будут направлены на выяснение активности ТТХ, полученного при разрушении спор с помощью термического шока и ультразвуковой дезинтеграции.

Исследование выполнено при поддержке ДВФУ, проект №14-08-06-19_и. Работа поддержана грантом Программы фундаментальных научных исследований «Дальний Восток» №15-И-3-036.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Mosher, H. Occurrence and origin of tetrodotoxin / H. Mosher, F. Furhman // *Seafood Toxins*. 1984. V. 28. P. 333–344.
2. Do, H. Identification of Deep-Sea-Sediment Bacteria Which Produce Tetrodotoxin / H. Do, K. Kogure, U. Simidu // *Applied and environmental microbiology*. 1990. V. 56 (4). P. 1162-1163.
3. Williams, B. Behavioral and Chemical Ecology of Marine Organisms with Respect to Tetrodotoxin // *Mar. Drugs*. 2010. V. 8. P. 381-398.
4. Magarlamov, T. Tetrodotoxin-producing *Bacillus* sp. from the ribbon worm (Nemertea) *Cephalothrix simula* (Iwata, 1952) / T. Magarlamov, I. Beleneva, A. Chernyshev, A. Kuhlevsky // *Toxicon*. 2014. V. 85. P. 46–51.
5. Chau, R. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin / R. Chau, J.A. Kalaitzis, B.A. Neilan // *Aquatic Toxicology*. 2011. V. 104. P. 61-72.
6. Setlow, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals // *Journal of Applied Microbiology*. 2006. V. 101. P. 514–525.
7. Kim, S.-Y. Destruction of *Bacillus licheniformis* spores by microwave irradiation / S.-Y. Kim, S.J. Shin, C.-H. Song et al. // *Journal of Applied Microbiology*. 2009. V. 106. P. 877–885.
8. Lappas, P. Laser measurements of bacterial endospore destruction from shock waves / P. Lappas, A. McCartt, S. Gates et al. // *Proc. of SPIE*. 2010. V. 8923. P. 89231C-1 - 89231C-10.
9. Zhu, S. High-pressure destruction kinetics of *Clostridium sporogenes* spores in ground beef at elevated temperatures / S. Zhu, F. Naima, M. Marcotte et al. // *International Journal of Food Microbiology*. 2008. V. 126. P. 86–92.
10. Geissler, M. Modular Ultrasonic Lysis System for Rapid Nucleic Acid Extraction / M. Geissler, S. Isabel, B. Voisin et al. // *J. Bioterr. Biodef.* 2012. No 3 (3). P. 1-6.
11. Hyatt, M. Water Vapor, Aqueous Ethyl Alcohol, and Heat Activation of *Bacillus megaterium* Spore Germination / M. Hyatt, H. Levinson // *Journal of Bacteriology*. 1968. V.95. No 6. P. 2090-2101.

DESTRUCTION OF SPORES AND VEGETATIVE CELLS OF TETRODOTOXIN-PRODUCING BACTERIUM OF *BACILLUS* SP. 1839

© 2015 A.S. Krotov¹, T.Yu. Magarlamov², E.A. Gorobets¹, D.I. Melnikova¹, O.A. Shokur¹

¹ School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok

² Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy FEB RAS, Vladivostok

The analysis of destruction methods of vegetative bacterial cells and spores of the opportunistic pathogenic strain of *Bacillus* sp. 1839 producing tetrodotoxin – a low-molecular thermostable neurotoxin. The optimum conditions of final fracture of bacterial culture among which the most effective are the combination of increased temperature and pressure, and also ultrasonic disintegration of cellular structures are revealed.

Key words: *tetrodotoxin, bacilli, ultrasonic disintegration, spore destruction*

Anton Krotov, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: as_krotov94@mail.ru; Timur Magarlamov, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: biotimur@yandex.ru; Ekaterina Gorobets, Student; Daria Melnikova, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: dashkamelnikova93@gmail.com; Olga Shokur, Candidate of Biology, Research Fellow at the Laboratory of Pharmacology and Biotesting. E-mail: olga_shokur@list.ru