

Случай заражения лабораторной культуры клещей домашней пыли (семейство *Pyroglyphidae*) бактериями *Bacillus subtilis*

Ахапкина И. Г., кандидат биологических наук, e-mail: isun17@yandex.ru,
Антропова А. Б., кандидат биологических наук, e-mail: antropova-a@yandex.ru,
Желтикова Т. М., доктор биологических наук, e-mail: t-zheltikova@yandex.ru
ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, 105064 Москва, М. Казенный пер., д. 5а

В статье сообщается об обнаружении штамма бактерии *Bacillus subtilis*, обладающего акарицидными свойствами в отношении пироглифидных клещей. Штамм выделен из лабораторных культур клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и *D. farinae*. Проведено длительное (16 недель) культивирование *D. pteronyssinus* и *D. farinae* на субстрате, содержащем *B. subtilis*. Контролем служили культуры клещей, не содержащие *B. subtilis*. Проанализирована микрофлора опытных и контрольных культур. Показано, что выделенный штамм *B. subtilis* обладает акарицидными свойствами в отношении пироглифидных клещей. Проведено секвенирование участка 16S рРНК, полученная последовательность нуклеотидов депонирована в GenBank (номер MN079011). Штамм депонирован в ВКМ (ВКМ В-3395).

Ключевые слова: клещи домашней пыли, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Bacillus subtilis*, акарицид.

Введение. Культивирование клещей домашней пыли проводится с целью получения сырья для производства аллергенных экстрактов (клещевых аллерговакцин), а также для изучения биоценологических отношений между клещами и другими микроорганизмами – бактериями и грибами. В настоящее время известно, что в пищевом субстрате клещей домашней пыли, как правило, развиваются мицелиальные грибы, которые переносятся на тела клещей или в их пищеварительном тракте при инокуляции сред культивирования [8,9]. Нами ранее ни в среде культивирования (утильные волосы из электробритв), ни на телах или в пищеварительном тракте клещей какие-либо бактерии выявлены не были [2]. В статье В. Santos сообщалось о том, что даже при специальном заражении места обитания *D. farinae* бактериями *Escherichia coli* эти микроорганизмы обнаруживались живыми не более 8 суток [12]. Однако при разработке искусственных пищевых субстратов для пироглифидных клещей нами было отмечено снижение численности клещей в садках в течение второго месяца культивирования, сопровождавшееся появлением специфического запаха. В связи с отмеченными изменениями параметров культивирования клещей домашней пыли была изучена микрофлора, заселившая садки с натуральными пищевыми субстратами, а также ее влияние на численность популяции пироглифидных клещей.

Материалы и методы. В стеклянные садки (100 см³) помещали по 2 г утильных волос из электробритв, предварительно обработанных водным раствором этилового спирта и тщательно высушенных при 40°C. Пищевой субстрат заселяли *Dermatophagoides pteronyssinus* и *D. farinae* (50 экз./г среды) из маточных культур (контрольный опыт). Аналогично проводили инокуляцию пищевого субстрата из садков, зараженных нехарактерной микрофлорой. Садки помещали в эксикаторы, на дно которых наливали насыщенный раствор хлористого натрия для создания относительной влажности воздушной среды 75±3%. Культивирование вели при температуре 25±2°C в течение 16 недель. По истечению времени культивирования брали пробы для визуального подсчета численности клещей и микробиологического анализа. Микромицеты выделяли методом серийных разведений на стандартную среду Чапека и среду Чапека с 40% сахарозы. Идентификацию грибов проводили по морфолого-культуральным признакам с помощью определителей [10]. Численность КОЕ микромицетов пересчитывали на грамм субстрата. Наиболее вероятное число микробных клеток (НВЧК) в среде культивирования пироглифидных клещей определяли при помощи метода предельных разведений в тиогликолевой среде (среда для контроля стерильности) по таблице Мак-Креди [3, 4]. 0,05 г зараженной среды культивирования клещей помещали в 4 мл

БЕЗОПАСНОСТЬ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

стерильного физиологического раствора, экстрагировали 40 мин. при перемешивании при комнатной температуре, центрифугировали. 100 мкл надосадочной жидкости помещали в чашки Петри с питательным агаром, культивировали 48 часов при температуре 37°C. Тинкториальные свойства бактерий определяли в мазках, окрашенных по Граму. Секвенирование региона 16S рНК бактерии проведено в ГНУ ВНИИСБ «Синтол». Полученная последовательность нуклеотидов депонирована в GenBank (номер MN079011).

Результаты. В контрольном опыте через 16 недель культивирования клещей домашней пыли бактериальная флора не была выявлена. В микобиоте культур клещей абсолютно доминировал *Aspergillus penicillioides* Speng., численность которого составляла 5×10^9 КОЕ/г среды и $1,3 \times 10^{10}$ КОЕ/г среды в садках с *D. farinae* и *D. pteronyssinus* соответственно. Другие микромицеты были выявлены в единичных КОЕ и отнесены к случайным. Численность популяций *D. farinae* и *D. pteronyssinus* составляла 1600 экз./г среды и 1100 экз./г среды соответственно. В культурах, инокулированных клещами, взятыми из зараженных нехарактерной микрофлорой сред культивирования, также абсолютно доминировал *A. penicillioides*, численность которого была 2×10^8 КОЕ/г среды и 3×10^9 КОЕ/г среды в садках с *D. farinae* и *D. pteronyssinus* соответственно через 16 недель культивирования. Численность других микромицетов составляла единичные КОЕ. Численность популяций *D. farinae* и *D. pteronyssinus* составляла 320 экз./г среды и 260 экз./г среды соответственно. Через 8 недель дальнейшего культивирования на зараженных средах живые особи клещей не выявляли. На полужидкой среде (среда для контроля стерильности) визуально определялся пленочный рост на поверхности столбика среды. НВЧК равнялось 5×10^7 КОЕ/г среды. На плотной среде визуализировались морщинистые сухие колонии с небольшим белесым оттенком. В мазках определялись грамположительные палочковидные бактерии. Отмечено образование овальной споры с субцентральной расположением. Бактерия отнесена к роду *Bacillus*. По данным секвенирования региона 16S рНК, бактерия идентифицирована как *B. subtilis* (номер в GenBank e: MN079011). Штамм депонирован в ВКМ (ВКМ В-3395).

Обсуждение. Условия культивирования клещей домашней пыли не являются пригодными для длительного развития широкого спектра бактерий. Возможно, микробному инфицированию пищевых субстратов пироглифидных клещей в лабораторных условиях препятствует и сопутству-

ющее интенсивное развитие мицелиальных грибов, в частности *A. penicillioides*. Тем не менее, для некоторых спорообразующих бактерий богатый азот- и углерод-содержащими соединениями субстрат вполне пригоден для колонизации, тем более что в данном случае микроскопические грибы дополнительно перерабатывают пищевой субстрат, при этом являются источниками витаминов [11]. Культурально-морфологические и молекулярно-генетические признаки выделенного микроорганизма указали на принадлежность данной бактерии к виду *B. subtilis*. Бактерии вида *B. subtilis* широко распространены в окружающей среде. Многие штаммы этого вида используются в качестве продуцентов различных биологически активных соединений – витаминов, антибиотиков, антимикотиков, ферментов, многие также являются источниками различных летучих веществ [1, 6, 7]. Как было отмечено выше, пищевые субстраты клещей, зараженные *B. subtilis* ВКМ В-3395, отличались резким запахом. В то же время при культивировании этого штамма бацилл на питательном агаре не было отмечено выделения ощутимого количества подобных летучих веществ. Очевидно, что синтетические свойства штамма *B. subtilis* ВКМ В-3395 меняются в зависимости от среды культивирования. Возможно, этим обусловлено незначительное снижение численности *A. penicillioides* в культуральной среде пироглифидных клещей, либо данный штамм не отличается продукцией веществ с фунгицидными свойствами. Некоторые штаммы бацилл вида *B. thuringiensis* используются в качестве энтомоцидных препаратов либо продуцентов инсектицидных и фунгицидных соединений [5]. Для вида *B. subtilis* нет сведений о синтезе акарицидных веществ. В нашем случае штамм *B. subtilis* ВКМ В-3395 достаточно активно ингибировал развитие популяции клещей домашней пыли в лабораторной культуре. На данном этапе трудно ответить на такие важные для понимания механизма акарицидного действия вопросы, как например, продуцируют ли бактерии одно вещество или группу? Акарицидное действие является результатом комплексного воздействия группы соединений? К какому классу относятся эти соединения? Относится ли это соединение к эндотоксинам или экзопродуктам жизнедеятельности бацилл? На какую стадию цикла развития клещей от яйца до половозрелой особи оказывается действие? Ответы, вероятно, будут получены в течение дальнейших исследований.

Таким образом, случайное заражение пищевого субстрата лабораторной культуры клещей домашней пыли позволило выделить штамм *B. subtilis* ВКМ В-3395, который продемонстри-

ровал акарицидные свойства в отношении пироглифидных клещей.

Список использованной литературы References

1. Ахапкина И. Г., Бутова Л. Г., Блинкова Л. П., Фомкина И. П. Штамм *Bacillus subtilis* – продуцент фунгицида. Ж. Микробиол. 1995, 1: 91–92. [Akhapkina I. G., Butova L.G., Blinkova L. P., Fomkina I. P. *Bacillus subtilis* Strain is a fungicide producer. Zh. Microbiol. 1995, 1: 91–92]. [In Russian].

2. Ахапкина И. Г. Изучение сырья для получения аллергенных экстрактов клещей домашней пыли (сем. *Pyroglyphidae*) как потенциального источника чужеродных антигенов и пирогенных соединений. Иммунология. 2005, 6: 353–356. [Akhapkina I.G. Study of raw materials for obtaining allergenic extracts of house dust mites (family *Pyroglyphidae*) as a potential source of foreign antigens and pyrogenic compounds. Immunology. 2005, 6: 353–356]. [In Russian].

3. Ахапкина И. Г. Применение тиогликолевой среды для первичной характеристики микробного сообщества пыли помещений. Гигиена и санитария. 2005, 4: 66–67. [Akhapkina I. G. Application of a thioglycol medium for the primary characteristic of the microbial community of indoor dust. Hygiene and sanitation. 2005, 4: 66–67]. [In Russian].

4. Ахапкина И. Г., Желтикова Т. М. Способ определения бактериальной обсемененности пыли помещений. Патент №2428483 от 14.04.2010 г. [Akhapkina I. G., Zheltikova T. M. Method for determining bacterial contamination of house dust. Pat. no. 2428483 dated 14.04.2010]. [In Russian].

5. Гришечкина С. Д., Ермолова В. П., Романова Т. А., Нижников А. А. Поиск природных изолятов *Bacillus thuringiensis* для создания экологически безопасных биологических препаратов. Сельскохозяйственная биология. 2018, 53(5): 1062–1069. [Grishechkina S. D., Ermolova V. P., Romanova T. A., Nizhnikov A. A. Search for natural isolates of *Bacillus thuringiensis* to create environmentally safe biological preparations. Agricultural biology. 2018, 53(5): 1062–1069]. [In Russian] doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1062rus.

6. Грязнева Т. Н. Биологически активные вещества, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*. Лечащий врач. 2013, 4: 54–63. [Gryazneva T. N. Biologically active substances produced by bacteria of the genus *Bacillus*. Attending physician. 2013, 4: 54–63]. [In Russian].

7. Сидорова Т. М., Асатулова А. М., Хомяк А. И. Биологически активные метаболиты

Bacillus subtilis и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов. Сельскохозяйственная биология. 2018, 53(1): 29–37. [Sidorova T. M., Asaturova A. M., Khomyak A. I. Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms. Agricultural biology. 2018, 53(1): 29–37]. [In Russian] doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus.

8. Bronswijk J. E. M. H. van, Sinha R. N. Role of fungi in the survival of *Dermatophagoides* (Acarina: *Pyroglyphidae*) in house-dust environment. Environ. Ent. 1973, 2, 142–145.

9. Petrova-Nikitina A. D, Antropova A. B, Mokeeva V. L, Chekunova L. N, Bilanenko E. N, Bulgakova T. A, Zheltikova T. M. To the study of biocenotic relationships between house dust mites (Acariformes: *Pyroglyphidae*) and mould fungi. Acarina. 2005, 13(1): 75–84.

10. Raper K. B., Fennel D. I. The genus *Aspergillus*. Baltimore, 1965.

11. Saint Georges-Grèdelet D. De. Vitamin requirements of the European house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acarina: *Pyroglyphidae*), in relation to its fungal association. J. Med. Entomol. 1987, 24: 408–411.

12. Santos B. Transmission of *Escherichia coli* by the American dust mite, *Dermatophagoides farinae*. Int. J. Acarol. 2000, 26(3): 243–245.

A case of *Bacillus subtilis* bacteria infection of laboratory culture of house dust mites (family *Pyroglyphidae*)

Akhapkina I. G., Antropova A. B., Zheltikova T. M. Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Vaccines and Serums them. I. I. Mechnikov»

The article reports the detection of *Bacillus subtilis* strain with acaricidal properties against pyroglyphid mites. The strain was isolated from laboratory cultures of house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. Long-term cultivation (16 weeks) of *D. pteronyssinus* and *D. farinae* was carried out on a substrate containing *B. subtilis*. *B. subtilis*-free cultures were control ones. The microflora of the experimental and control mite cultures was analyzed. It was shown that isolated *B. subtilis* strain had acaricidal properties against pyroglyphid mites. Sequencing of the 16S rRNA was performed; the obtained nucleotide sequence was deposited in GenBank (accession number MN079011). The strain was deposited in VKM (VKM B-3395).

Key words: house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Bacillus subtilis*, acaricide.