

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ЕКСТРАКЦІЇ *BACILLUS ANTHRACIS* З РІЗНИХ ҐРУНТІВ НА РОЗМНОЖЕННЯ ТА СПОРОУТВОРЕННЯ

У. М. Яненко, В. М. Яненко, С. М. Терещенко, Н. О. Шеремет, О. Є. Петров

Інститут ветеринарної медицини НААН

Прогнозування епізоотичної ситуації з сибірки обумовлюється сукупністю природно-географічних та епізоотичних факторів. Виявлення збудника сибірки з ґрунтів дозволяє володіти об'єктивною інформацією про епізоотичний стан регіону. У статті проводиться порівняння методів екстракції *Bacillus anthracis* різними методами із різних ґрунтів.

Ключові слова: BACILLUS ANTHRACIS, ҐРУНТ, ЕКСТРАКЦІЯ

Сибірка — зоонозна інфекція, збудником якої є *Bacillus anthracis*, лишається актуальним питанням для ветеринарії та охорони здоров'я людей у всьому світі. На сьогоднішній момент за даними ВОЗ захворювання на сибірку людей, а також великої і дрібної рогатої худоби, реєструється у 158 країнах. Щорічно у світі відмічають від 2000 до 20000 випадків захворювання людей [1]. Резервуар *Bacillus anthracis* досить стійкий через те, що в ґрунті спорові форми збудника не тільки довго зберігаються але й реклонуються з переходом у вегетативну, а потім знову у спорову форму. Такі пасажі підвищують життєздатність бацил і без контамінації осередки землі можуть існувати невизначено тривалий час, бути джерелом інфекції для свійських і диких тварин [2].

У ході багаторічної роботи по дослідженню інтенсивності прояву сибіркової інфекції в Україні виявлено таку закономірність: найчастіше спалахи захворювання реєструвались у Чернівецькій (75 %), Вінницькій (71,4 %), Харківській (71,4 %), Черкаській (71,4 %), Луганській (63,1 %), Миколаївській (60 %), Рівненській (58,8 %), Донецькій (57,1 %), Кіровоградській (54,5 %) та Київській (53,8 %) областях, тобто там де переважно чорноземні ґрунти [3]. Найменшу кількість спалахів даної інфекції було зареєстровано у гірських областях — АР Крим (2,5 %) і Закарпатській (5,1 %), де переважно бурі гірсько-лісові та коричнево-гірські щепенуваті ґрунти. Отже, у різних географічно-земельних зонах різний прояв інтенсивності епізоотичного прояву хвороби. Ґрунти між собою відрізняються вмістом органічних речовин та елементів мінерального живлення, реакції середовища і асоціацією мікроорганізмів [4].

Тому для прогнозування епізоотичної ситуації по Україні нашою лабораторією проводяться відбір зразків ґрунту з різних областей для проведення бактеріологічних досліджень. Мета дослідження — порівняння методів екстракції та очищення життєздатних спор *B. anthracis*, виділених від чорноземно-підзолених та коричневих гірських щепенуватих ґрунтів.

Матеріали і методи

Роботу проводили з використанням референтного спороутворюючого безкапсульного штаму *B. anthracis* UA-07,

— 14 зразків чорноземно-підзоленого ґрунту;

— 14 зразків коричневого-гірського щепенуватого ґрунту.

Чотирнадцять зразків ґрунту обох видів (по 7 зразків) були зважені по 10,0 г і розфасовані у скляні флакони, проавтоклавовані двічі при 1 Атм впродовж 60 хв, з інтервалом 24 год. Інші зразки землі використовувались для досліду нестерильними.

Контролем слугували 7 зразків нестерильного ґрунту без збудника сибірки. Для екстракції *B. anthracis* UA-07 використовували насичені розчини: сахарози, карбаміду, 0,9 % розчин натрію хлориду.

Середовища: м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ).

Споровий матеріал отримували інкубацією культури *B. anthracis* UA-07 на МПА за температури 37 °С впродовж 14 днів. У проведенні експерименту використовували спорову біомасу штаму *B. anthracis* UA-07 з концентрацією $2,8 \times 10^5$ млрд/см³.

Кожний зразок стерильного ґрунту засівали 0,2 см³ культурою *B. anthracis* UA-07. Ставили термостат за температури 37 °С на 24 години, до випарування конденсату на стінках посуду

Ізоляцію збудника сибірки з дослідного матеріалу проводили згідно «методических рекомендаций по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителей сибирской язвы и актиномицетов антагонистов» (1984 р.) та методом, запропонованим Carman J. A., Hambleton P. (1985 р.).

Екстракцію спор збудника сибірки проводили використовуючи три розчини: 1) насичений розчин карбаміду; 2) насичений розчин сахарози і поверхнево активної речовини (ПАР); 3) 0,9 % розчин натрію хлориду. Після ізоляції збудника проводили висів на МПА і підрахунок життєздатних спор методом титрування.

Результати й обговорення

При екстракції спор сибірки від зразків чорноземно-підзоленого ґрунту за допомогою трьох розчинів отримали тотожні результати. При підрахунках життєздатних спор *B. anthracis* UA-07 у кінцевому результаті отримали відповідну концентрацію збудника сибірки: екстракція з сахарозою + ПАР — $6,8 \pm 0,2 \times 10^5$ млрд/см³; карбонатом — $6,3 \pm 0,1 \times 10^5$ млрд/см³ і 0,9 % натрієм хлориду — $6,5 \pm 0,18 \times 10^5$ млрд/см³ ($p \geq 0,3$). Тобто застосування трьох різних варіантів ізоляції збудника сибірки має рівноцінний результат.

Ізоляція збудника *B. anthracis* UA-07 від нестерильних чорноземів показала, що застосування вищезазначених методів однаково ефективне. При екстракції спор сибірки за допомогою сахарози + ПАР отримали таку концентрацію спор *B. anthracis*: $4,5 \pm 0,3 \times 10^5$ млрд/см³, карбонату — $4,7 \pm 0,03 \times 10^5$ млрд/см³, а 0,9 % натрію хлориду — $3,7 \pm 0,18 \times 10^5$ млрд/см³ ($p \geq 0,5$). У контрольних зразках ґрунту *B. anthracis* не виявлено (табл.).

Таблиця

Порівняння методів екстракції *B. anthracis* UA-07 від стерильних і нестерильних ґрунтів ($M \pm m, \times 10^5$ млрд/см³)

Методи екстракції спор	чорноземно-підзолений ґрунт			коричневий гірський щебенюватий ґрунт		
	стерильний n=7	нестерильний n=7	контроль n=7/n	стерильний n=7	нестерильний n=7	контроль n=7
Насичений розчин сахарози + ПАР	6,8±0,2	4,5±0,3	–	2,5±0,16	2,0±0,2	–
Насичений розчин карбаміду	6,3±0,1	4,7±0,3	–	1,7±0,2	1,2±0,2	–
0,9% розчин натрію хлориду	6,5±0,18	4,3±0,2	–	1,5±0,17	1,1±0,2	–
p≥	0,3	0,5		0,3	0,2	

Дослідження стерильних зразків коричневих гірських щебенюватих ґрунтів показало, що ізоляція збудника сибірки із застосуванням сахарози+ПАР є більш результативною —

$2,5 \pm 0,16 \times 10^5$ млрд/см³, тоді як екстракція спор з карбамідом та 0,9 % хлоридом натрію є менш ефективними, відповідно — $1,7 \pm 0,2 \times 10^5$ млрд/см³ та $1,5 \pm 0,17 \times 10^5$ млрд/см³ ($p \geq 0,3$).

Подібну тенденцію спостерігали при ізоляції збудника сибірки від нестерильних зразків гірського ґрунту. Найвищий результат екстракції спор *B. anthracis* отримали при використанні насиченого розчину сахарози — $2,0 \pm 0,2 \times 10^5$ млрд/см³, тоді як з карбамідом — $1,2 \pm 0,2 \times 10^5$ млрд/см³ та з 0,9 % хлоридом натрію $1,1 \pm 0,2 \times 10^5$ млрд/см³. У контрольних зразках збудника сибірки не виявлено.

Якщо порівняти результати, які одержані від експерименту на ґрунтах обох видів і різними за стерильністю, то бачимо, що для виділення спор сибірки для чорноземних видів можна застосовувати усі три методи екстракції, тоді як для зразків з гірської місцевості краще застосовувати метод із насиченим розчином сахарози (рис).

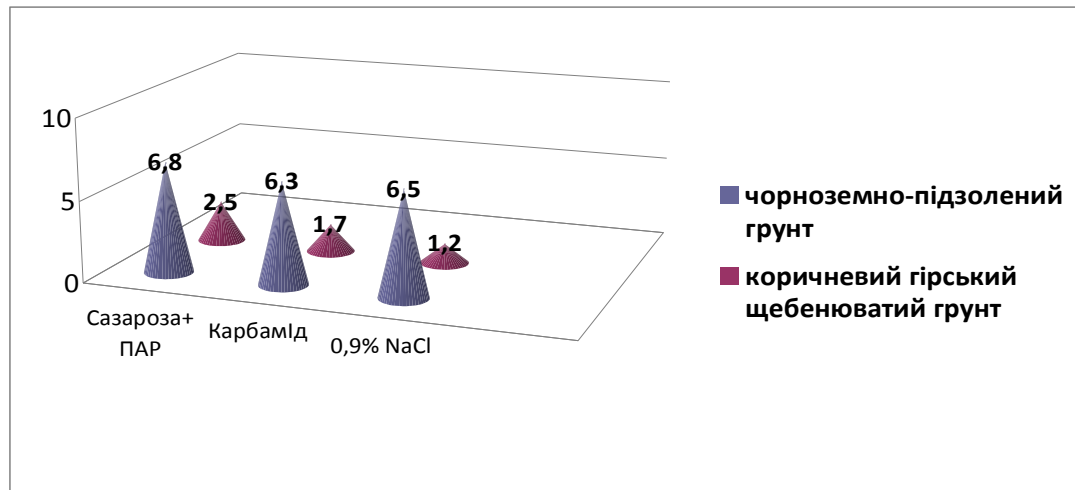


Рис. Порівняння методів екстракції *B. anthracis* UA-07 від різних ґрунтів

З проведеного дослідження видно, що кількість внесеного дослідного матеріалу у стерильні зразки чорноземно-підзоленого ґрунту відрізняється від отриманого кінцевого результату. Так, після зараження даних зразків землі спорами *B. anthracis* UA-07 концентрацією $2,8 \times 10^5$ млрд/см³ після 24 годин культивування за температури 37 °C отримали в середньому $6,5 \pm 0,07 \times 10^5$ млрд/см³ спор. Отже, у стерильних чорноземно-підзоленних ґрунтах спори *B. anthracis* інтенсивно розмножуються.

Якщо порівняти результати отримані з стерильними гірськими ґрунтами, то бачимо протилежний результат: було внесено $2,8 \times 10^5$ млрд/см³ *B. anthracis* UA-07, а отримано в середньому $1,8 \pm 0,2 \times 10^5$ млрд/см³. Тобто розмноження і спороутворення збудника сибірки у даному середовищі не відбулось.

З нестерильних ґрунтів ізолювання спор проводилось в значно менших концентраціях, ніж їх було внесено на початку дослідження. Це пояснюється не тільки складом землі, але й вмістом мікроорганізмів, що мають властивості антагоністів відносно до *B. anthracis* — актиноміцетів.

Висновки

1. Екстракція спор *B. anthracis* UA-07 від чорноземних ґрунтів, як стерильних так і не стерильних, була ефективною при застосуванні всіх трьох методів ізоляції: карбамідом, сахарозою і 0,9 % натрієм хлориду. Кількість виділених спор збудника була більшою — $6,5 \pm 0,07 \times 10^8$ млрд/см³, тоді як було внесено $2,8 \times 10^8$ млрд/см³. Цей факт треба враховувати при прогнозуванні епізоотичної ситуації в областях України, яким притаманні чорноземи.

2. Проведений експеримент з ізоляції спор *B. anthracis* UA-07 від гірських ґрунтів показав, що ефективнішим методом є екстракція збудника за допомогою насиченого розчину сахарози + ПАР, так як ним було виявлено більшу кількість спор — $2,5 \pm 0,16 \times 10^8$ млрд/см³

від стерильних зразків землі і $2,0 \pm 0,2 \times 10^8$ млрд/см³, тоді як екстракція спор з карбамідом — $1,7 \pm 0,2 \times 10^8$ млрд/см³ та 0,9 % хлориду натрію — $1,2 \pm 0,17 \times 10^8$ млрд/см³. У гірських ґрунтах не відмічено збільшення кількості спорового матеріалу *B. anthracis*.

Перспективи подальших досліджень. Для отримання об'єктивної інформації про епізоотичний стан регіону слід провести дослідження води та обстежити тварин.

U. Yanenko, V. Yanenko, S. Terechenko, N. Cheremet, O. Petrov

COMPARATIVE ANALYSIS OF *BACILLUS ANTHRACIS* EXTRACTION METHODS FROM SOIL

S u m m a r y

Prediction of epizootic situation on anthrax is determined by the whole set of natural geographical and epizootic factors. The detection of the anthrax agent in soils allows obtaining objective data concerning epizootic state of anthrax in a given region. In this article a comparison of different *Bacillus anthracis* extraction methods is described.

У. Н. Яненко, В. М. Яненко, С. М. Терещенко, Н. О. Шеремет, О. Е. Петров

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ *BACILLUS ANTHRACIS* ОТ РАЗНЫХ ПОЧВ

А н н о т а ц и я

Прогнозирование эпизоотической ситуации по сибирке обуславливается совокупностью естественно-географических и эпизоотических факторов. Выявление возбудителя сибирки из почв позволяет владеть объективной информацией об эпизоотическом состоянии данного региона. В статье приводятся сравнение методов экстракции *Bacillus anthracis* различными методами от грунтов разных типов.

1. *Hugh-Jones M. E.* Global Report — 2000 : 4th International Conference on Anthrax. Program and Abstracts Book (2001, June 10–13) / M. E. Hugh-Jones. — Annapolis, Mariland, USA, 2001. — P. 13–19.

2. *Черкасский Б. Л.* Руководство по общей эпидемиологии / Б. Л. Черкасский. — М. : Медицина, 2001. — 368 с.

3. *Ушкалов В. О.* Епізоотична ситуація щодо сибірки тварин в Україні за 1979–2009 роки / В. О. Ушкалов, О. В. Мачуський // Ветеринарна медицина України. — 2010. — № 5. — С. 33–34.

4. *Чуйская Г. А.* Почва как среда сохранения и размножения возбудителя сибирской язвы. / Г. А. Чуйская // Актуальные вопросы профилактики сибирской язвы в СССР. — М., 1971. — С.72.

5. Методические рекомендации по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителей сибирской язвы и актиномицетов антагонистов. — МЗ РФ, ЦНИИЭ, 1984.

6. *Carman J. A.* In isolation and identification of micro-organisms of medical and veterinary importance / J. A. Carman, P. Hambleton, J. B. Melling ; ed. C. H. Collins, J. M. Grange. — London : Academic Press, 1985. — P. 207–214.

Рецензент: кандидат ветеринарных наук Айшпур О. Є., Інститут ветеринарної медицини НААН.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії репродуктивної біотехнології та розведення тварин, кандидат біологічних наук, с. н. с. Гевкан І. І.