

УДК 619:616.98:579.852.11

У. М. ЯНЕНКО, кандидат ветеринарних наук

В. М. ЯНЕНКО, С. М. ТЕРЕЩЕНКО, Н. О. ШЕРЕМЕТ

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

## МЕТОДИ ЕКСТРАКЦІЇ СПОР *BACILLUS ANTHRACIS* ВІД РІЗНИХ ТИПІВ ҐРУНТІВ

*Дослідження по визначенню ступеню ризиків місць сибіркових захоронень різного строку давнини є актуальним, особливо при прогнозуванні епізоотичної ситуації в Україні. Відомо, що спори збудника сибірки не втрачають своєї патогенності більше 100 років, тому виявлення збудника сибірки з ґрунтів дозволяє володіти об'єктивною інформацією про епізоотичний стан даного регіону. У статті представлені три варіанти екстракції спор *Bacillus anthracis* із різних типів ґрунтів і проведено їх порівняння.*

*Ключові слова: *Bacillus anthracis*, ґрунт, екстракція.*

Узагальнення доступних даних з реєстрації спалахів сибірки на території України за останні 10 років 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. 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 щебенкуваті ґрунти. Отже, у різних географічно-земельних зонах різний прояв інтенсивності епізоотичного прояву хвороби.

У зв'язку зі зміною клімату та пов'язаними з цим природними катаклізмами, зокрема повеннями, підвищенням рівня ґрунтових вод, а також у зв'язку з широкою господарчою діяльністю людини, стрімким розвитком відносин у сфері земельного та водного природокористування, зокрема масштабного будівництва та іншого використання землі, та іншими формами систематичних контактів людини з природою підвищується ризик виносу збудника сибірки на поверхню ґрунтів та поширення його певною територією. У цій ситуації ґрунти, їх склад, мають першорядну роль, адже у ґрунті спорові форми збудника не тільки довго зберігаються але й реклонуються з переходом у вегетативну, а потім знову у спорову форму. Це обумовлює стійкість резервуару *Bacillus anthracis*. Такі пасажі підвищують життєздатність бацил і без контамінації осередки землі можуть існувати невизначено тривалий час, бути джерелом інфекції для свійських і диких тварин [1].

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 2 000 до 20 000 випадків захворювання людей [2].

Тому для прогнозування епізоотичної ситуації по Україні нашою лабораторією проводяться відбір зразків ґрунту з різних областей для проведення бактеріологічних досліджень.

**Мета дослідження** – дослідження методів екстракції та очищення життездатних спор *B. anthracis*, виділених від чорноземно-підзолених та коричневих гірських щепенюватих ґрунтів, порівняння їх ефективності.

**Матеріали та методи.** Роботу проводили з використанням референтного спороутворюючого без капсульного штаму *B. anthracis* UA-07, 42 зразки ґрунту трьох видів:

- 14 зразків чорноземно-підзоленого ґрунту;
- 14 зразків коричневого гірського щепенюватого ґрунту;
- 14 зразків буреземно-підзоленого ґрунту.

28 зразки ґрунту трьох видів (по 7 зразків) були зважені по 10,0 г і розфасовані у скляні флакони, проавтоклавовані двічі при 1 Атм 60 хв., з інтервалом 24 год.;

Інші зразки землі використовувались для досліду нестерильними.

Контролем слугували 7 зразків нестерильного ґрунту кожного типу без збудника сибірки.

Споровий матеріал отримували інкубацією культури *B. anthracis* UA-07 на МПА за температури 37<sup>0</sup> С протягом 14 днів. У проведенні експерименту використовували спорову біомасу штаму *B. anthracis* UA-07 з концентрацією 2,8×10<sup>5</sup> млрд./см<sup>3</sup>.

Кожний зразок ґрунту (стерильного і нестерильного) засівали 0,2 см<sup>3</sup> культурою *B. anthracis* UA-07. Ставили до термостату за температури 37<sup>0</sup> С на 24 години, до випарування конденсату на стінках посуду

Середовища:

- м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), селективне диференційно-діагностичне середовище з 0,01 % натрієм фенолфталеїн фосфатом [3].

Для екстракції *B. anthracis* UA-07 використовували три методи.

**Ізоляція спор сибірки з ґрунту за допомогою насиченого розчину карбаміду.**

До кожної дослідної наважки ґрунту (10,0 г) скляною піпеткою додаємо 20 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину. Зразки ставимо на водяну баню за температури 37<sup>0</sup> С і додаємо, помішуючи скляною паличкою, кристалічну сечовину (карбамід) до утворення на дні пробірки білого осаду.

Пробірки із дослідними зразками залишаємо у водяній бані на 5 -10 хв.

Усі наважки ґрунту ставимо у термостат за температури 37<sup>0</sup> С на 30 хв.

Після інкубації надосадову рідину зливаємо, а осад центрифугуємо при 2,5 тис. об./хв. -10 хв. Надосад зливаємо.

Осад ресуспендують в 1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину і переносимо піпеткою у пробірку.

З пробірки з осадом землі робимо висів по 0,2 см<sup>3</sup> на МПА (із стерильних зразків) і на середовище з 0,01 % натрієм фенолфталеїн фосфатом (нестерильних зразків).

Методом титрування (від 1 : 2 до 1 : 1024) з пробірки з осадом землі проводили підрахунок життездатних спор. На кожне розведення виділяли по три

чашки Петрі з МПА(стерильні зразки) або з середовищем з 0,01 % натрієм фенолфталеїн фосфатом (нестерильні зразки).[4].

#### **Ізоляція спор сибірки з ґрунту за допомогою насиченого розчину сахарози з 0,1 % розчином «Твин -80» [5, 6].**

До кожної дослідної наважки ґрунту (10,0 г) скляною піпеткою додаємо 20 см<sup>3</sup> насиченого розчину сахарози з 0,1 % розчином «Твин -80». Зразки ставимо на водяну баню за температури 37<sup>0</sup> С на 5 -10 хв.

Усі наважки ґрунту ставимо у термостат за температури 37<sup>0</sup> С на 30 хв.

Після інкубації надосадову рідину зливаємо, а осад центрифугуємо при 2,5 тис. об./ хв. -10 хв. Надосад зливаємо.

Осад ресуспендують в 1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину і пе5реносимо піпеткою у пробірку.

З пробірки робимо висів по 0,2 см<sup>3</sup> на МПА (із стерильних зразків) і на середовище з 0,01 % натрієм фенолфталеїн фосфатом (нестерильних зразків).

Підрахунок життєздатних спор проводили методом титрування (див. вище)

#### **Ізоляція спор сибірки з ґрунту за допомогою 0,9% фізіологічного розчину**

До кожної дослідної наважки ґрунту (10,0 г) скляною піпеткою додаємо 20 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину. Зразки ставимо на водяну баню за температури 37<sup>0</sup> С на 5 -10 хв.

Усі наважки ґрунту ставимо у термостат за температури 37<sup>0</sup> С на 30 хв.

Після інкубації надосадову рідину зливаємо, а осад центрифугуємо при 2,5 тис. об./ хв. -10 хв. Надосад зливаємо.

Осад ресуспендують в 1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину і переносимо піпеткою у пробірку.

З пробірки робимо висів по 0,2 см<sup>3</sup> на МПА (із стерильних зразків) і на середовище з 0,01 % натрієм фенолфталеїн фосфатом (нестерильних зразків).

Підрахунок життєздатних спор проводили методом титрування (див. вище).

#### **Результати досліджень і обговорення.**

При екстракції спор сибірки від зразків чорноземно-підзоленого ґрунту за допомогою трьох розчинів отримали тотожні результати. При підрахуванні життєздатних спор *B. anthracis* UA-07 у кінцевому результаті отримали : екстракція з сахарозою + ПАР –  $6,8 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>; карбонатом –  $6,3 \pm 0,1 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> і 0,9% натрієм хлориду –  $6,5 \pm 0,18 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> ( $p \geq 0,3$ ).

Аналогічі результати були отримані при дослідженні буроземно-підзолених ґрунтів: кількість життєздатних спор *B. anthracis* UA-07 при екстракції з сахарозою + ПАР –  $5,2 \pm 0,3 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>; карбонатом –  $5,0 \pm 0,1 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> і 0,9% натрієм хлориду –  $4,8 \pm 0,1 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> ( $p \geq 0,3$ ). Тобто застосування трьох різних варіантів ізоляції збудника сибірки має рівноцінний результат (табл.).

Ізоляція збудника *B. anthracis* UA-07 від нестерильних чорноземів і буроземів показала, що застосування вищезазначених методів однаково ефективно. При екстракції спор сибірки від чорноземів за допомогою сахарози+ ПАР отримали таку концентрацію спор *B. anthracis*:  $4,5 \pm 0,3 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>, карбонату –  $4,7 \pm 0,03 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>, а 0,9 % натрію хлориду –  $3,7 \pm 0,18 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> ( $p \geq 0,5$ ), буроземів: при застосуванні методу з сахарозою –  $3,2 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>, карбонатом –  $3,0 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>, та 0,9 % натрію хлориду –  $3,0 \pm 0,21 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>.

**Порівняння методів екстракції *B. anthracis* UA-07 від стерильних і нестерильних ґрунтів ( $M \pm m, \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>)**

Типи ґрунтів	Методи екстракції спор <i>B. anthracis</i>		
	Насичений розчин сахарози + Твинн-80	Насичений розчин карбаміду	0,9% розчин натрію хлориду
<b>Чорноземно-підзолистий</b>			
Стерильний	6,8±0,2	6,3±0,1	6,5±0,18
нестерильний	4,5±0,3	4,7± 0,3	4,3±0,2
<b>Буроземно-підзолистий</b>			
Стерильний	5,2±0,3	5,0±0,1	4,8±0,1
нестерильний	3,2±0,2	3,0±0,2	3,0±0,2
<b>Коричневий гірський щебенюватий</b>			
Стерильний	2,5± 0,16	1,7 ±0,2	1,5±0,2
нестерильний	2,0±0,2	1,2±0,2	1,1± 0,2
<b>Контроль</b>	–	–	–

Дослідження стерильних зразків коричневих гірських щебенюватих ґрунтів показало, що ізоляція збудника сибірки із застосуванням сахарози+ПАР є результативним –  $2,5 \pm 0,16 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>, тоді як екстракція спор з карбамідом є менш ефективно –  $1,7 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> та 0,9% хлориду натрію –  $1,5 \pm 0,17 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> ( $p \geq 0,3$ ).

Подібну тенденцію спостерігали при ізоляції збудника сибірки від нестерильних зразків гірського ґрунту. найбільший результат екстракції спор *B. anthracis* отримали при використанні насиченого розчину сахарози –  $2,0 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>, тоді як з карбамідом –  $1,2 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> та 0,9% хлориду натрію  $1,1 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>.

У контрольних зразках ґрунту *B. anthracis* не виявлено

Також проводили дослідження стерильних і нестерильних зразків ґрунту через 3, 6, 9, 12 та 24 год після зараження їх спорами сибірки і було зафіксовано процес проростання спор через 6 год., у буроземному ґрунті, через 12 год., тоді як у гірських ґрунтах не вдалось виявити інтенсивного процесу проростання спор. В даному експерименті наші результати співпали з дослідженнями Г. Я. Чуйської [7], яка вивчала умови перебування збудника сибірки у ґрунтах і використовувала метод макрозйомки.

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

З проведеного досліду 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 з концентрацією  $2,8 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> по завершенні досліду

отримали в середньому  $6,5 \pm 0,07 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>. Це результат після 24 годин культивування за температури 37<sup>0</sup> С. Значить, спори потрапили у сприятливі умови для проростання, що дало їх «урожай».

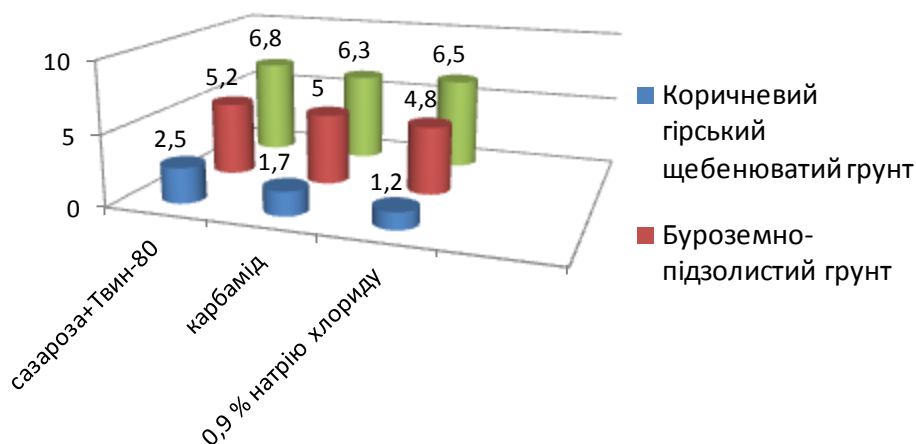


Рис. Порівняння методів екстракції *B. anthracis* UA-07 від різних ґрунтів.

Якщо порівняти результати отримані з стерильними гірськими ґрунтами, то бачимо протилежний результат: було внесено  $2,8 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> *B. anthracis* UA-07, а отримано в середньому  $1,8 \pm 0,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup>. Тобто розмноження і спорування збудника сибірки у даному середовищі не відбулось.

З нестерильних ґрунтів спори ізолювались, але 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 по відношенню до *B. anthracis* – актиноміцетів.

#### Висновки:

1. Екстракція спор *B. anthracis* UA-07 від чорноземних і буроземних ґрунтів, як стерильних так і не стерильних, була ефективною при застосування усіх трьох методів ізоляції: карбамідом, сахарозою і 0,9% натрієм хлориду.

2. Кількість виділених спор збудника із чорноземів і буроземів була більшою –  $6,5 \pm 0,07 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> і  $5,2 \times 10^5$  млрд./см<sup>3</sup> тоді як внесено було  $2,8 \times 10^8$  млрд./см<sup>3</sup>. Проростання спор у чорноземах відбувалось вже через 6 год. інкубації спорового матеріалу у дослідних зразках землі, а в буроземно-підзолистих ґрунтах через 12 год. Цей факт треба враховувати при прогнозуванні епізоотичної ситуації в областях України, яким притаманні чорноземи.

3. Проведений експеримент по 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./см<sup>3</sup> від стерильних зразків землі і  $2,0 \pm 0,2 \times 10^8$  млрд./см<sup>3</sup>, тоді як екстракція спор з карбамідом –  $1,7 \pm 0,2 \times 10^8$  млрд./см<sup>3</sup> та 0,9 % хлориду натрію –  $1,2 \pm 0,17 \times 10^8$  млрд./см<sup>3</sup>. Динаміка кількості спорового матеріалу *B. anthracis* у гірських ґрунтах не відбулась.

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

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

3. *Методические указания «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». МУК 4.2.2413-08*

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

5. *Carman J. A., Hambleton P. and Melling J. (1985) B. anthracis. In Isolation and Identification of Micro-organisms of Medical and Veterinary Importance ed. Collins C. H. and Grange J. M. pp. 207-214. London: Academic Press.*

6. *Методические рекомендации "Использование 0,05 - 0,10% -ного раствора Твина-80 как разводящей жидкости для определения концентрации спор сибиреязвенного микроба" МЗ РФ, ЦНИИЭ, 1986.*

7. *Чуйская Г. Я. Условия пребывания возбудителя сибирской язвы в почвах/ Г. Я. Чуйская // Зоонозные инфекции. – Киев, 1966. – С. 168-173*

**МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ СПОР BACILLUS ANTHRACIS ОТ РАЗНЫХ ТИПОВ ПОЧВ/ У. Н. Яненко, В. М. Яненко, С. М. Терещенко, Н. О. Шеремет**

*Исследования для определения степени риска мест сибиреязвенных захоронений разного периода давности актуальны, особенно при прогнозировании эпизоотической ситуации в Украине. Известно, что споры возбудителя сибирки не теряют свою патогенность более 100 лет и обнаружение возбудителя сибирки с грунтов позволяет владеть объективной информацией о эпизоотической ситуации в данном регионе. В статье представлены три варианта экстракции спор от разных видов грунтов и проведено их сравнение.*

*Ключевые слова: Bacillus anthracis, грунт, экстракция.*

**METHODS OF EXTRACTION OF BACILLUS ANTHRACIS IN VARIOUS TYPES OF SOIL/ U. M. Yanenko, V. M. Yanenko, S. M. Tereschenko, N. O. Sheremet.**

*Studies on the definition of the degree of risk in Anthrax burial places of various periods of time ago are relevant, especially in predicting the epizootic situation in Ukraine. It is known that anthrax spores of the pathogen do not lose their pathogenicity over 100 years, therefore identify the causative agent of anthrax soils allows to have objective information on the epizootic situation in the region. The article presents three options for extraction of spores of Bacillus anthracis in different types of soil and compared.*

*Keywords: Bacillus anthracis, soil, extraction*

**Рецензент – кандидат ветеринарных наук О. С. Айшпур**