

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet8827
http://nvlvet.com.ua

UDC 619:616.981

Isolation *Bac. anthracis* at different pH and soil humus content

I. Rublenko, S. Rublenko

Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, Ukraine

Article info

Received 14.09.2018
Received in revised form
15.10.2018
Accepted 16.10.2018

Bila Tserkva National Agrarian
University, Soborna sq., 8/1,
Bila Tserkva, 09111, Ukraine.
Tel.: + 38-097-398-57-83
E-mail: rubs@ukr.net

Rublenko, I., & Rublenko, S. (2018). Isolation *Bac. anthracis* at different pH and soil humus content. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(88), 147–151. doi: 10.32718/nvlvet8827

*Anthrax is one of the diseases that cause great damage to livestock and at the same time is a dangerous disease for humans. This disease under different names is known from ancient times. The source of the pathogen is diseased animals. However, an important factor in the transmission of the pathogen is the burial place of animals that died from anthrax. The pathogen can be stored in the soil for more than 100 years. Anthrax is one of the diseases that cause great damage to livestock and at the same time is a dangerous disease for humans. This disease under different names is known from ancient times. The source of the pathogen is diseased animals. However, an important factor in the transmission of the pathogen is the burial place of animals that died from anthrax. In Ukraine there is burial of dead animals from anthrax. Most of the Siberian burial ground is registered in Vinnytsia, Kharkiv, Chernihiv, Ternopil, Lugansk and Kirovograd regions of Ukraine. In this regard, there is a need to study the issues of epizootology and improve diagnostic techniques, measures for general and specific anthrax prevention. The pathogen can be stored in the soil for more than 100 years. The purpose of these studies was to select the *Bacillus anthracis* spores for the influence of pH and different humus content in the soil. The pH and soil humus content were determined, which was used in experiments at the Laboratory of Agrochemistry of the Institute of Bioenergetic Cultures and Sugar Beet at the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine. The work was performed on the basis of the State Scientific-Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms. Used methodology in which soil sample – 2.5 grams grow. In studies, spores of the avirulence strain *Bacillus anthracis* were introduced into a sterile soil. Registered methods of separating the argument of anthracite from the soil are obsolete. The method allows distinguishing anthrax spores from soils with different pH and humus content. when 21.76 ± 0.94 spores were applied to sterile soil (which was 17.41 ± 0.75 s/gram), the amount of spores selected was 3.33 ± 0.27 spores/grams (19.13%). The amount of controversy in the experimental soil was lower (17.41 ± 0.75), compared with the amount of controversy submitted to the soil with a pH of 6.5 ($P < 0.05$), 6.7 ($P < 0.05$), 7.5 and 7.8, however, the number of allocated – higher – 3.33 ± 0.27 (19.1%). The introduction of 18.54 ± 1.29 spores/grams of soil (3.67% of humus content) amounting to 18% of the deductions. Isolation *Bac. anthracis* with different pH indicates that the most spores of the pathogen are released within the pH range of 6.7–7.5. The content of humus in the soil affects the number of selected spores. With a higher content of humus, fewer amounts of spores is released anthracis, optimum pH for spore selection – 7.0.*

Key words: Siberian ulcer, *Bacillus anthracis*, spores, selection, method, pH, humus content.

Виділення *Bac. anthracis* при різному pH та вмісту гумусу ґрунту

I.O. Рубленко, С.В. Рубленко

Білоцерківський національний аграрний університет, м. Біла Церква, Україна

Сибірка належить до числа захворювань, які завдають великої шкоди тваринництву і одночасно є небезпечним захворюванням для людей. Дане захворювання під різними назвами відоме з глибокої давнини. Джерелом збудника є хворі тварини. Однак важливим фактором передачі збудника є місця поховань тварин, загиблих від сибірки. Збудник може зберігатися в ґрунті понад 100 років. В Україні є також поховання тварин, загиблих від даного захворювання. Найбільше таких захоронень зареєстровано у Вінницькій, Харківській, Чернігівській, Тернопільській, Луганській і Кіровоградській областях. Зареєстровані методи виділення спор сибірської виразки з ґрунту застарілі. У зв'язку з цим існує необхідність вивчення питань епізоотології та вдосконалення методик діагностики, заходів загальної та специфічної профілактики сибірки. Метою даних досліджень було виділення спор

Bacillus anthracis при впливі рН та різного вмісту гумусу в ґрунті. Визначали рН та вміст гумусу ґрунту, який використовувався в дослідках в лабораторії агрохімії Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків Національної академії аграрних наук України. Дослідження виконували на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Використовували методіку, в якій проби ґрунту були по 2,5 грам, з різним вмістом спор. У дослідженнях зі стерильним ґрунтом вносили спори авірулентного штаму *Bacillus anthracis*. Методика дозволяє виділити спори сибірки з ґрунтів з різним рН і вмістом гумусу. При внесенні $21,76 \pm 0,94$ спор до стерильного ґрунту (становило $17,41 \pm 0,75$ спор/грам ґрунту) кількість виділених спор була $3,33 \pm 0,27$ спор/г (19,13%). Кількість внесених спор у досліджуваному ґрунті була нижчою – $17,41 \pm 0,75$, порівняно з кількістю внесених спор у ґрунт з рН 6,5 ($P < 0,05$), 6,7 ($P < 0,05$), 7,5, і 7,8. Проте кількість виділених – вищою: $3,33 \pm 0,27$ (19,1%). Внесення $18,54 \pm 1,29$ спор/грам ґрунту (при 3,67% вмісту гумусу) – кількість 18% виділених внесених. Виділення спор *Bac. anthracis* з різним рН свідчить, що більше спор збудника виділяється в межах рН 6,7–7,5. Вміст гумусу в ґрунті впливає на кількість виділених спор. При більшому вмісті гумусу виділяється менша кількість спор *Bac. anthracis*, а оптимальне рН для виділення – 7,0.

Ключові слова: сибірка, *Bacillus anthracis*, спори, виділення, методика, рН, вміст гумусу.

Вступ

Сибірка належить до числа захворювань, які наносять великі збитки тваринництву і одночасно є небезпечним захворюванням для людей. Дане захворювання під різними назвами відоме з глибокої давнини. У зв'язку з зміною клімату, пов'язаними з цим природними катаклізмами (зокрема повеннями, підвищенням рівня ґрунтових вод), а також у зв'язку з розширенням господарчої діяльності людини, стрімким розвитком сфери земельного та водного природокористування (зокрема масштабного будівництва) та іншого використання землі підвищується ризик зміни глиби існування та розвитку збудника сибірки у товщі ґрунтів. Збудник може зберігатися у ґрунті понад 100 років. Внаслідок цього відбувається поширення інфекції на нові території. Історія зберегла дані виключно великих епізоотій сибірки серед тварин у XIV–XV столітті: у 1309 році (“был мор на люди и кони и на всякий скот”), 1375 (“на люди и кони и на скот был мор в Твери”), 1433, 1448 роках (“мор на коней и люди мерли”). Особливою подією у світовій історії сибірки стала заборона використання як біологічної зброї цього збудника після підписання Женевського протоколу. Проте це не зупинило поширення збудника сибірки.

Сучасні інформаційні, діагностичні технології дозволяють відкривати можливість швидших та точніших методів дослідження сибірки. Лабораторна діагностика сибірки застосовується для виявлення збудника, визначення біологічних властивостей тощо. Даний процес складається з кількох етапів, кожен з яких має свої вимоги, від яких залежить кінцевий підсумок. Бактеріологічний метод діагностики ґрунту на наявність спор сибірки полягає у дослідженні відповідно затвердженої інструкції та методичних рекомендацій. Джерелом збудника є хворі тварини, з організму яких збудник виділяється у навколишнє середовище. Проте важливим фактором передачі збудника є місця захоронень тварин, які загинули від сибірки. Для виділення та його ідентифікації приділяється значна увага серед дослідників у різних країнах світу (Yoong et al., 2006; Rouli et al., 2014; Kammanadiminti et al., 2014; Kasradze et al., 2018). На територіях різних країн розроблені схеми, методи боротьби та профілактики із сибіркою (Cieslac and Eitzen, 1999). Проте щорічно виникають нові випадки захворювань не лише тварин, а й людей (Creel et al., 1995; Mongoh et al., 2005; Bellan et al., 2012). У чутливих до сибірки травоядних тварин захворювання перебігає переважно

у септичній формі. В Україні сибірку реєструють переважно у великої рогатої худоби, зрідка – у свиней. Небезпечне захворювання і для людей, особливо легенева форма.

На території нашої країни майже щорічно (1994–2007, 2010, 2012, 2016, 2017 рр.) реєструються випадки сибірки, особливо серед тварин (Rublenko and Skrypyuk, 2016; Derzhprodsposivsluzhba, 2017). Випадки захворювання серед людей найчастіше реєструють в аграрних та слаборозвинених країнах. В Україні в останній час спалахи сибірки бувають рідко, у вигляді спорадичних випадків раз на 1–2 роки. Актуальність проблеми зумовлена, тим, що, враховуючи літературні дані, в Україні знаходиться від 9 до 11 тис. стаціонарно-неблагополучних пунктів, тому забезпечення біологічної безпеки тварин, населення, збереження природного середовища України залишається одним із важливих завдань у другому тисячолітті. Найбільше сибіркових захоронень зареєстровано у Вінницькій, Харківській, Чернігівській, Тернопільській, Луганській та Кіровоградській областях України.

Проблема захворювання на сибірку є актуальною не лише для України, а й для більшості країн Європи та всього світу. Оскільки захворюваність залишається на високому рівні, щорічно реєструються летальні випадки, на лікування хворих витрачаються великі кошти, а виробники тваринницької продукції несуть значні економічні збитки через загибель тварин та проведення протиепізоотичних і профілактичних заходів. У зв'язку з цим існує необхідність вивчення питань епізоотології та удосконалення методик діагностики, заходів загальної та специфічної профілактики сибірки.

Метою даних досліджень було виділення спор *Bacillus anthracis* за впливу рН та різного вмісту гумусу в ґрунті.

Матеріал і методи досліджень

Для виділення спор збудника сибірки ми використали таку методіку: від кожної проби відбирали 2,5 г стерильного ґрунту. Визначали потенційну кислотність (рН) та вміст ґрунту в лабораторії агрохімії Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків Національної академії аграрних наук України. Проби ґрунту розміщували у скляній колбі, додавали спорову завись і заливали 15 см³ розчину для екстракції (100 см³ дистильованої води, 1,22 г сахарози, 1,0 см³ тритону X–80). Після ручного струшування протягом 1 хв, витримували 40 хв у стані спокою. Відбирали

3 см³ рідини з поверхні надосадової рідини, додавали 6–8 см³ БСА/ФСБ (фільтрованого 1% бичачого сироваткового альбуміну у 0,01 моль/см³ фосфатно-сольовому буфері, рН 7,0). Зразки центрифугували за 5000 об/хв протягом 10 хв. Надосадову рідину зливали та знищували, а до осаду додавали 1,0 см³ БСА/ФСБ. Очищення спор в осаді виконували шляхом використання 100% етилового спирту протягом 1 год за кімнатної температури (Rublenko et al., 2015; Skripnik et al., 2015).

Результати та їх обговорення

Результати досліджень свідчать, що найвищі показники виділення збудника сибірки з ґрунту за різної потенціальної кислотності ми отримали при рН – 7,0 (рис. 1). При використанні проб ґрунту із потенційною кислотністю – 6,5 та внесенні 20,32 спор/грам ґрунту встановили, що кількість спор, що виділяється – 17,8%. Це була найменша кількість спор, що виділялася протягом всього досліджу. При додаванні до 2,5 грам ґрунту 25,4 спори – кількість їх виділялася 18,3%.

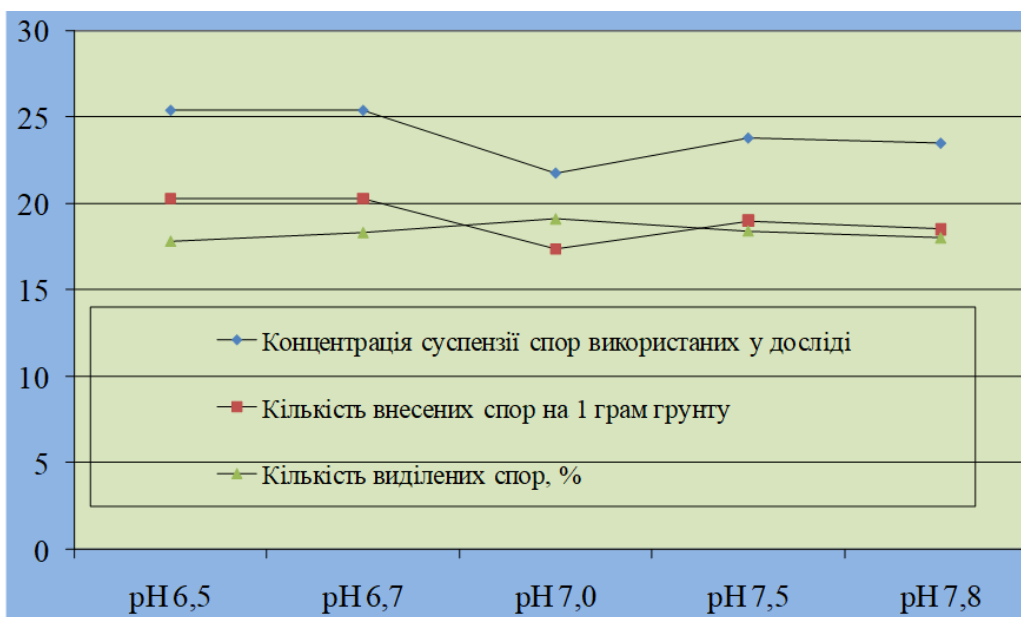


Рис. 1. Виділення спор *Bacillus anthracis* з ґрунту, при вмісті гумусу 3,67%

Оскільки при внесенні 21,76±0,94 спор до стерильного ґрунту (що становило 17,41 ± 0,75 спор/грам) кількість виділених спор була 3,33 ± 0,27 спор/грам (19,13%). При внесенні спор у ґрунт 20,32 ± 0,87, при рН – 6,5 – кількість виділених спор сягала 3,61 ± 0,16 спор/1 грам ґрунту, що складало 17,8% від внесених. Підвищення потенціальної кислотності ґрунту 6,7 викликало виділення не вірогідно більшої на 0,5% кількості спор із ґрунту (3,71 ± 0,25 спор/1 грам ґрунту, 18,3%). Виділення спор із потенціальною кислотністю ґрунту 7,0 призвело до виділення більшої кількості спор *Bacillus anthracis*. Варто зазначити, що кількість внесених спор у дослідний ґрунт була нижчою (17,41 ± 0,75), у порівнянні із кількістю внесених спор до ґрунту з рН 6,5 (P < 0,05), 6,7 (P < 0,05), 7,5, та 7,8, проте кількість виділених – вища – 3,33 ± 0,27 (19,1%). Одночасно з цим, потенційна кислотність ґрунту 7,5 призвела до нижчої кількості виділених спор з ґрунту на 0,7%, що складало 3,50 ± 0,07 спор, при внесенні 19,04 ± 1,36 спор/грам ґрунту.

Підвищення потенційної кислотності ґрунту в подальшому призвело до ще нижчих показників виділення спор *Bacillus anthracis*. При внесенні 18,54 ± 1,29 спор/грам стерильного ґрунту, за 3,67% вмісту гумусу – кількість ізольованих спор склала 3,34 ± 0,09 (18% виділених від внесених). Слід відмітити, що

ізоляція збудника *Bac. anthracis* з різною потенціальною кислотністю, свідчить, що найбільше спор збудника виділяється в межах рН 6,7–7,5, а оптимальним є 7,0. Тож на виділення спор впливає потенційна кислотність ґрунту. Найнижчий відсоток виділених спор із ґрунту отримали при рН 6,5, а найвищий – при 7,0.

Окрім потенційної кислотності для розвитку збудника сибірки у ґрунті важливе значення відіграє вміст гумусу. Дослідження проводили у зв'язку з тим, що територія України має велику кількість чорноземів з великою кількістю гумусу. Результати досліджень наведені на рис. 2.

Нами було встановлено, що кількість гумусу впливає на відсоток виділення спор із ґрунту. При найменшій кількості гумусу у ґрунті (2,67%) і внесенні 18,98 ± 0,57 спор/1 г ґрунту виділявся найвищий відсоток спор – 20,2 ± 0,66%. Збільшення кількості гумусу у ґрунті на 0,7% призвело до виділення не вірогідно меншої кількості спор 3,63 ± 0,15 спор/1 грам ґрунту, що склало – 19,1 ± 0,49%. За вмісту гумусу 3,67%, при внесенні 19,11 ± 0,66 спор/1грам, виділили ще менший відсоток спор – 18,0 ± 0,65%. Слід відмітити, що використання ґрунту з найвищим відсотком гумусу (4,4%) у дослідних зразках викликало найвищий відсоток виділення спор – 17,8 ± 0,91.

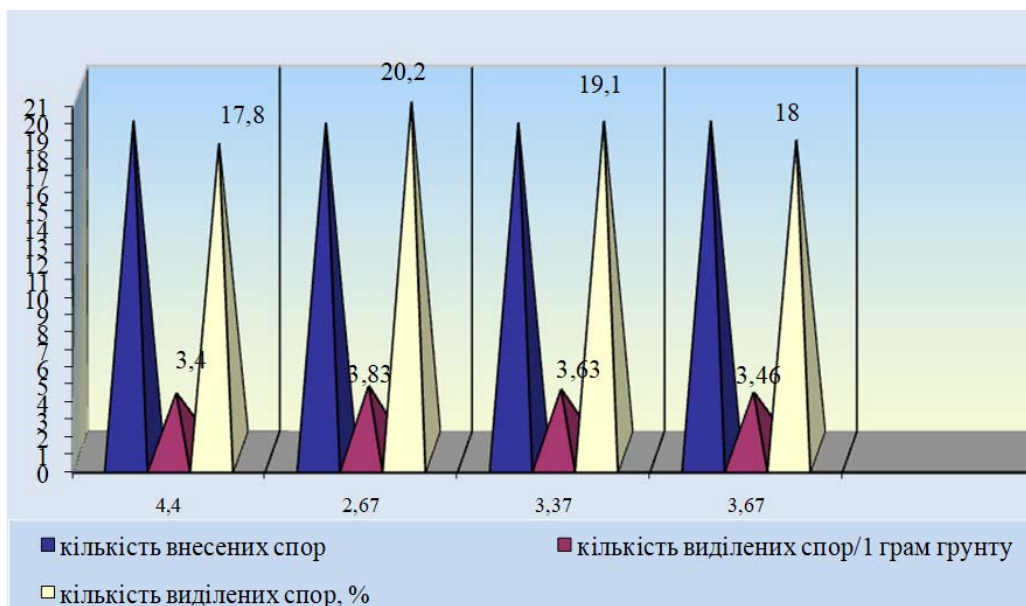


Рис. 2. Кількість виділених спор *Bacillus anthracis* при різному вмісті гумусу, рН – 6,7

Ймовірно, низька кількість виділення спор пов'язана з тим, що спори прилипають до гумусу і погано відмиваються хімічними детергентами. Оскільки гумусу менше у пробах – детергенти краще відмивають спори сибірки. Тож використання ґрунту із найменшим вмістом гумусу (2,67%) у досліді призвело до виділення найвищого відсотка спор (20,2 ± 0,66%). Тобто з більш родючого ґрунту виділяється менша кількість спор *Bac. anthracis*, ніж з ґрунту, який складається із більшої кількості неорганічних речовин.

Висновки

В Україні існують місця захоронення тварин, що загинули від сибірки. Зареєстровані методи виділення спор сибірки із ґрунту застарілі й виникає необхідність їх удосконалення. Удосконалена нами методика дозволяє виділити спори сибірки із ґрунтів із різним рН та вмістом гумусу. Вміст гумусу та рН у ґрунті впливають на кількість виділених спор. При більшому вмісті гумусу виділяється менша кількість спор *Bac. anthracis*, оптимальне рН для виділення спор – 7,0 та 3,67% гумусу.

Перспективи подальших досліджень. Провести дослідження щодо виділення спор із ґрунту, використовуючи різні детергенти.

References

Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D., & Fischetti, V.A. (2006). PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*. *Journal bacteriology*, 4, 188, doi: 10.1128/JB.188.7.2711-2714.2006.

Rouli, L., Bengue, V.V., Robert, C., Ndiaye, M., Seola, B.La, & Raouf, D. (2014). Genomic analysis of three African strains of *Bacillus anthracis* demonstrates that they are part of the clonal expansion of an exclusively

pathogenic bacterium. *New microbes infect.*, 2(6), 161–169. doi: 10.1002/nmi2.62.

Kammanadiminti, S., Patnaikuni, R.K., Comer, J., Kodihalli, S. et al. (2014). Combination therapy with Antibiotics and Anthrax Immune Globulin Intravenous (AIGIV) Is Potentially More effective than antibiotics Alone in Rabbit Model of Inhalational Anthrax. *Journal PloS one.*, 9(9), e106393. doi: 10.1371/journal.pone.0106393.

Kasradze, A., Echeverria, D., Zakhshvili, K. et al. (2018). Rates and risk factors for human cutaneous anthrax in the country of Georgia: National surveillance data, 2008–2015. *Journal One a peer-reviewed, open access*, 13(2), e0192031. doi: 10.1371/journal.pone.0192031.

Cieslac, T.J., & Eitzen, E.M. (1999). Clinical and epidemiological principles of anthrax. *Emerg infect dis.*, 5, 552–555. doi: 10.3201/eid0504.990418.

Creel, S., Creel, N.M., Matovelo, J., Mtambo, M., Batamuzi, E., & Cooper, J. (1995). The effects of anthrax on endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*). *Journal of Zoology*, 236(2), 199–209. doi: 10.1111/j.1469-7998.1995.tb04488.x.

Mongoh, M.N., Dyer, N.W., Stoltenow, C.L., & Khaitsa, M.L. (2005). Risk factors associated with anthrax outbreak in animals in North Dakota, 2005: A retrospective case-control study. *Public Health Rep.*, 123(3), 352–359. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006977>.

Bellan, S.E., Cizauskas, C.A., Miyen, J., Ebersohn, K., Küsters, M., & Prager, K. (2012). Black-backed jackal exposure to rabies virus, canine distemper virus, and bacillus anthracis in etosha national park, namibia. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(2), 371–381. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493112>.

Rublenko, I.O., & Skrypnyk, V.G. (2016). Analysis of the data of epizootic outbreaks of anthrax on the territory of Ukraine (1994–2016). *Scientific Herald of*

- Veterinary Medicine. Collection of scientific works, 1(127), 87–95 (in Ukrainian).
- Derzhprodsposivsluzhba (2017). Derzhprodsposivsluzhba vzhivae zahodi shhodo nedopushhennja rozpovsjudzhennja spalakhiv sibirki. 05.07.2017 15:29 http://www.consumer.gov.ua/News/2280/Derzhprodspozhivsluzhba_vzhivae_zakhodi_shhodo_nedopushchennya_rozpovsyudzhennya_spalakhiv_sibirki (in Ukrainian).
- Rublenko, I.O., Skripnik, V.G., & Machuskiy, O.V. (2015). Improvement chniques vidilennya dispute anthrax from the soil bacteriological using method. Science. collection of veterinary medicine collection of veterinary medicine: sciences. prac. Bila Tserkva, 2 (122), 89–95 (in Ukrainian).
- Skripnik, V.G. Rublenko, I.O., Garkavenko, T.O. et al. (2015). Laboratory dignostika sibirki anthrax tvarin, indication of the pathogen from pathologichnogo and biological material, raw material of animal origin and objects of the environment), Kiev, 78 (in Ukrainian).