

БИОИНДИКАЦИЯ *BACILLUS ANTHRACIS* В ПРОБАХ ПОЧВЫ

Климушкин Евгений Иванович, соискатель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: бактерии, *Bacillus anthracis*, почва, водородный показатель, реакция, бактериофаги, сибирская язва.

В статье представлены результаты биоиндикации *Bacillus anthracis* в пробах почв различных типов методом постановки реакции нарастания титра без выделения чистой культуры. Определено, что проба почвы Оренбургской области относится к черноземам – рН 6,3; проба почвы из Астраханской области – это светло-каштановые почвы с рН -7,4; проба почвы Ульяновской области – это серые лесные почвы, водородный показатель которых составил 5,2. Установлено, что изменение водородного показателя среды не влияет на выход свободного внеклеточного фага. Временной интервал, затрачиваемый на постановку реакции нарастания титра фага, составляет 24 часа = 30 мин (закладка опыта) + 5 часов (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грациа) + 18 часов (время культивирования посевов). Чувствительность реакции – обнаружение в 1 грамме почвы 10^3 м.к./г. *Bacillus anthracis* при соблюдении параметров постановки реакции.

Введение

Общеизвестно, что бактерии *Bacillus anthracis* могут попадать в почву с экскрементами животных, больных сибирской язвой, с их трупами, а также со сточными водами кожевенных заводов и шерстомоек. Споры сибиреязвенных бактерий выживают в почве десятки лет. Заражение скота происходит при поедании им травы, загрязненной спорами. Наблюдались случаи заражения людей, ходивших босыми при наличии повреждений кожи по зараженной почве [1].

На практике методы детекции патогенов сложны в исполнении. Во-первых, это связано с относительно низкой концентрацией обнаруживаемых бактерий в анализируемой пробе. Вторым фактором, затрудняющим детекцию инфекционных агентов, является наличие посторонней микрофлоры, в том числе и близкородственной, обладающей значительным уровнем антигенного родства. Так, например, межвидовые антигенные различия *Bacillus anthracis* и других

представителей этого рода (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*) минимальны [2-3].

Усовершенствование многократно апробированных и разработка новых методов индикации *Bacillus anthracis* в пробах почвы являются актуальной темой исследований.

С учетом вышеуказанных трудностей индикации патогенов в объектах санитарного надзора в 1955 году был предложен В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом метод, названный «реакция нарастания титра фага» [2]. Он основан на том, что искусственно введенный в исследуемый субстрат гомологичный бактериофаг в определенной концентрации с коротким циклом внутриклеточного развития адсорбируется и размножается. Последующее увеличение концентрации (повышение титра) свободного внеклеточного фага, по сравнению с контролем, указывает на присутствие в исследуемом материале гомологичного возбудителя [4-5].

Целью наших исследований была постановка реакции нарастания титра фага с сибиреязвенным бактериофагом на пробах почвы различных типов.

Задачи исследований:

- определить водородный показатель почв – объектов исследований;
- определить уровень влияния водородного показателя (рН) почвы на цикл развития сибиреязвенного бактериофага;
- провести индикацию *Bacillus anthracis* в пробах почвы методом постановки реакции нарастания титра фага.

Объекты и методы исследований

Авирулентный штамм *Bacillus anthracis* 34 F₂, полученный из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

Сибиреязвенный бактериофаг, выделенный и селекционированный авторами в 2015 году [6-8].

Определение рН почвы проводили по ГОСТ 26423-85 «Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки» [9]. Использовали рН-метр ТМ «Рометер» РН-009(1).

Постановка реакции нарастания титра фага проводилась с использованием методик, апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [10-15].

Пробы почвы №1 –Ульяновской области (Ульяновский район, р.п. Ишеевка), №2 – Астраханская область (Икрянинский район, р.п. Красные Баррикады), №3 – Оренбургская область (Первомайский район, с. Мирошкино).

Результаты исследований

Первоначально нами был определен водородный показатель исследуемых проб, который составил - 5,5 у объекта исследований №1, рН 7,3 – объекта №2, рН 6,4 – объекта №3.

Следующий этап исследований - определение влияния водородного показателя (рН) почвы на цикл развития сибиреязвенного бактериофага. Предварительно нами был подготовлен мясо-пептонный бульон (МПБ), в котором был искусственно изменен показатель рН (таблица 1). Затем в пробирки с измененным рН МПБ был произведен посев сибиреязвенного бактериофага и суточной культуры *Bacillus anthracis* 34 F₂ (соотношение 1:1 – 0,2 мл:0,2 мл на 4,5 мл МПА). Режим культивирования – (36±1) °С в течение 18±2 часов.

Далее был произведен «слепой» пассаж на газоне культуры на мясо-пептонном агаре (МПА) методом «стекающая капля» (газон готовили за 30 минут до посева, подсушивали в термостате в течение 30 минут). Режим культивирования – (36±1) °С в течение 18±2 часов. За положительный результат принимали наличие прозрачной зоны на газоне культуры. Результаты исследований отражены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение водородного показателя среды, где культивируется бактериофаг, не влияет на цикл развития сибиреязвенного бактериофага. Таким образом, можно утверждать, что применение сибиреязвенного бактериофага в реакции нарастания титра фага (РНФ) для индикации *Bacillus anthracis* возможно в почвах с различным водородным показателем (разных типах почв).

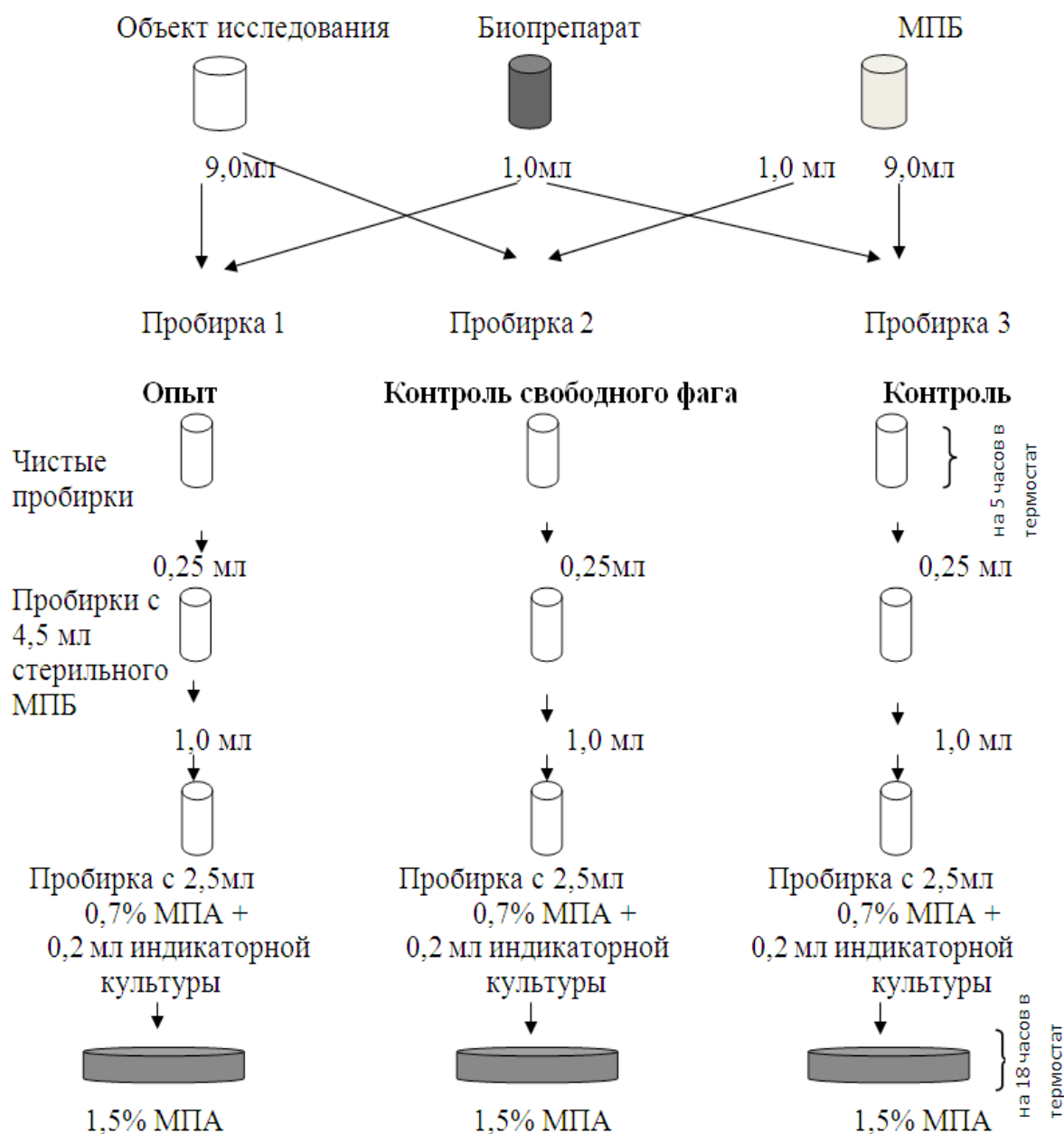
Третьим этапом исследований была отработка методики постановки РНФ с целью индикации возбудителя сибирской язвы в пробах почвы.

Ранее нами экспериментальным путем было установлено, что рабочее разведение бактериофага - 10⁵ БОЕ/мл, оптимальное время экспозиции, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие исследуемого бактериофага с индикаторной культурой, - это 5 часов культивирования без предваритель-

Таблица 1

Наличие зон лизиса на газоне культуры при различных показателях рН

Сибиреязвенный бактериофаг	Водородный показатель											
	3,4	4,0	4,4	4,8	5,5	5,8	6,4	6,8	7,4	7,8	8,2	
Наличие роста	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



**Рис. 1 - Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием сибирез-
венного бактериофага**

ного подраживания исследуемого материала [10]. Эти данные позволяют утверждать, что при заданных параметрах происходит увеличение количества бляшкообразующих единиц в 5 и более раз, что имеет диагностическое значение при индикации *Bacillus anthracis* методом РНФ.

Методика постановки эксперимента: в опытные колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили по 5 граммов почвы и индикаторную культуру в концентрации $10^3 - 10^5$ м.к./

мл. Содержимое колб встряхивали в шутель-аппарате в течение 15 минут, затем отстаивали 5 минут. Следующий этап - это 5 часов культивирования без предварительного подраживания исследуемого материала при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ (экспериментальным образом установлено оптимальное время экспозиции, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие исследуемого бактериофага с индикаторной культурой) [10].

После проведения подготовки мате-

Таблица 2

Результаты постановки реакции нарастания титра фага (тест-объект - проба почвы № 1 + *Bacillus anthracis*) с сибиреязвенным с бактериофагом

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>Bacillus anthracis</i> проба почвы №1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	21,2±3,1	-	136,2±5,1	6,4
10 ⁴			269,4±8,2	12,8
10 ⁵			лизис	-

Таблица 3

Результаты постановки реакции нарастания титра фага (тест-объект - проба почвы № 2 + *Bacillus anthracis*) с сибиреязвенным с бактериофагом

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>Bacillus anthracis</i> проба почвы №2 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	16,3±1,2	-	105,1±3,3	6,5
10 ⁴			210,4±4,7	13,1
10 ⁵			лизис	-

Таблица 4

Результаты постановки реакции нарастания титра фага (тест-объект - проба почвы № 3 + *Bacillus anthracis*) с сибиреязвенным с бактериофагом

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>Bacillus anthracis</i> проба почвы в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опытной пробирке по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	27,3±5,1	-	192,2±3,4	7,1
10 ⁴			299,1±8,3	11,0
10 ⁵			лизис	-

риала для исследований с учетом вышеописанных параметров осуществляли работу по следующему алгоритму: готовили 3 широких пробирки (диаметр 20 мм) и нумеровали их (1, 2, 3 – для каждого разведения культуры). Аналогично готовили еще два комплекта для трехкратного повторения эксперимента с целью статистической проверки полученных результатов. В пробирки № 1, 2 вносили по 9 мл субстрата из почвы, искусствен-

но контаминированной *Bacillus anthracis*, в пробирку № 3 – 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1 и 3 добавляли 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении - 10⁵ БОЕ/мл, а в пробирку № 2 - 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага).

Посевы ставили в термостат при температуре (36±1) °С на 5 часов.

С целью получения в контроле легко сосчитываемого количества бляшкообразу-

ющих единиц (БОЕ) фага было необходимо развести содержимое пробирок примерно в 20 раз. Для этого 0,25 мл из каждой пробирки вносили в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ, активно перемешивали вращательным движением в ладонях.

Далее содержимое пробирок исследовали на определение числа бляшкообразующих единиц методом агаровых слоев по Грациа [6]. Учет результатов проводили через 18 ± 2 часов инкубирования в условиях термостата при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Для этого подсчитывали количество бляшкообразующих единиц, выросших на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага).

Результаты исследований оценивали согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным и апробированной Юдиной М.А., Петруковой Н.А. [4, 11].

Полученные результаты представлены в таблицах 2-4.

Анализируя данные таблиц 2-4, можно свидетельствовать, что максимальная чувствительность реакции составляет 10^3 м.к./г. почвы. Этот показатель при индикации возбудителя сибирской язвы в объектах санитарного надзора является диагностическим. Данное утверждение не расходится с данными других исследователей [1].

Выводы

Экспериментальным образом нами была доказана эффективность применения реакции нарастания титра фага с целью индикации возбудителя сибирской язвы в пробах почв, принадлежащих к различным типам, которые имеют соответственно разные водородные показатели. Нами определено, что проба почвы Оренбургской области (Первомайский район, с. Мирошкино) относится к черноземам – рН 6,3; проба почвы из Астраханской области (Икрянинский район, р.п. Красные Баррикады) – это светло-каштановые почвы с рН -7,4; проба почвы Ульяновской области (Ульяновский район, р.п. Ишеевка) – это серые лесные почвы, водородный показатель которых составил 5,2. Установлено, что сибиреязвенный бактериофаг способен к циклу внутриклеточного развития в ранее определенных авторским

коллективом параметрах при изменении водородного показателя в довольно широком диапазоне – рН 3,4-8,2. Полученные нами данные не противоречат результатам исследований Э. Каттер и А. Сулаквелидзе, которые указывают, что изменение водородного показателя среды не влияет на выход свободного внеклеточного фага [16]. Эмпирически нами была доказана возможность постановки реакции нарастания титра фага с целью индикации 10^3 м.к./г возбудителя сибирской язвы в пробах почв, принадлежащих к различным типам, без выделения чистой культуры возбудителя. Временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ, составляет 24 часа = 30 мин (закладка опыта) + 5 часов (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грациа) + 18 часов (время культивирования посевов).

Данный метод, на наш взгляд, является перспективным и расширяет арсенал методик, которые могут быть применены в лабораториях, недостаточно оснащенных современным сложным техническим оборудованием.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

Библиографический список

1. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении «старой» болезни / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. – Владимир: Изд-во «Посад», 2001. - С. 79-82.
2. Бактериофаги рода *Bacillus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин. - Ульяновск: ООО «Колор-Принт», 2013. - С. 69-70.
3. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Киров, 2014. - С. 375-377.

4. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. - С. 197-211.

5. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. - С. 186-197.

6. Биологические свойства сибиреязвенного бактериофага / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. - 2015. - № 3 (74). - С. 46-49.

7. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* [Электронный ресурс] / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Сборник материалов III Международного форума. БиоКиров, 2015. - 2015. - С. 10-12.

8. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.

9. ГОСТ 26423-85. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки [Электронный ресурс]. - URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-26423-85> - (дата обращения 27.01.2016).

10 Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2006. - С. 17-18.

11. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молоч-

ных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Экология родного края: проблемы и пути их решения. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Киров, 2014. - С. 375-377.

12. Параметры реакции нарастания титра фага с сибиреязвенным бактериофагом / Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. - 2015. - № 4 (75). - С. 47-51.

13. Феоктистова, Н.А. Реакция нарастания титра фага для индикации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарно-санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы III Международной научно-практической конференции. - Ульяновск, 2012. - Том 1. - С. 327-333.

14. Фагоиндикация бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье растительного происхождения / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. - 2016. - С. 240-246.

15. Определение временных параметров постановки реакции нарастания титра фага с фагами ВР-10 и ВБ-13 серии УГСХА / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. - 2016. - С. 224-233.

16. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. - М.: Научный мир, 2012. - С. 63.