

УДК 637.5:574.2

**\*Власенко В.В.**, д. б. н., професор,**\*\*Власенко І.Г.**, к. б. н., доцент**\*Семко Т.В.**, ст. викладач ©*\*Вінницький національний аграрний університет**\*\*Вінницький торговельно-економічний інститут КНТЕУ*

## **ВИКОРИСТАННЯ НОВИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ МОЛОКА**

*В роботі розкрито законодавча база нормативно-правових актів щодо якості та безпеки молока. Показана можливість використання поживного середовища для виявлення біологічної безпеки молока. Доведено, що отримані культури з туберкулінів аналогічні отриманим культурам з молока дослідних тварин, яким проводили туберкулінодіагностику.*

**Ключеві слова:** вплив іонізуючої та неіонізуючої радіації, поживне середовище, молоко, збудник туберкульозу, туберкулін.

В Україні законодавча база нормативно-правових актів щодо якості та безпеки молока врегульована недостатньо, а введений ДСТУ 3662—97 розрахований в основному на молоко, яке заготовлялося у колективних сільськогосподарських підприємствах. Відповідно до сучасних міжнародних вимог, щодо якості продукції лише якісний контроль є вже недостатнім тому, що він не може гарантувати повну безпеку. Окремі аспекти контролю якості продукції розглядалися у багатьох працях вітчизняних та зарубіжних авторів [1-4].

Тому однією з актуальних проблем безпеки продуктів харчування є виявлення нових адаптаційних можливостей збудників захворювань до тих умов середовища, які формувались в останні десятиріччя [2]. Щорічно від туберкульозу помирає 10-12 тисяч співвітчизників [3].

До цього часу для виділення культур збудників туберкульозу з продуктів харчування використовують золотий стандарт - яєчне живильне середовище Левенштейна-Йенсена. Крім цього використовують інші середовища, такі як: Петраняні, Гельбера, Фінн-2, ФАСТЛ-3Л та інші.

Однак, ці середовища дають можливість виявляти збудників туберкульозу лише у 40% випадків, крім того, не вдається виявити мікобактерії, які знаходяться у досліджуваних зразках у невеликій кількості, а також з ослабленою життєздатністю та пониженою ферментативною активністю. Дослідження на цих середовищах довготривалі та висококошторисні.

Метою нашої роботи було створення живильного середовища САМСУМ для виділення збудника туберкульозу з молока і скорочення періоду діагностики туберкульозу бактеріологічним методом у 6-18 разів.

### Матеріал та методи досліджень

Робота проводилась на території забрудненій радіонуклідами від 015 до 3 Кі/км. кв., в селі Бушинка, Вінницької області, де були сформовані дві групи корів по 10 голів 6-7 літнього віку, одна з яких була контрольна, а друга піддослідна, що утримувались в однакових умовах.

Бактеріологічне дослідження проходило за загальноприйнятою схемою, тобто готували живильне середовище, здійснювали підготовку досліджуваного матеріалу для його подальшого висіву, при цьому посівний матеріал обробляли запропонованим антисептиком-стимулятором з подальшим електромагнітним опроміненням і посівом на запропоноване живильне середовище для прискореного виділення збудника туберкульозу. Контролем служили живильне середовище ВКГ, Левенштейна - Йенсена та тест-культури мікроорганізмів: *Mycobacterium tuberculosis* H37 RV - збудник туберкульозу людей, *Mycobacterium tuberculosis* - клінічний штам, резистентний до всіх протитуберкульозних препаратів, *Mycobacterium tuberculosis* - клінічний штам, чутливий до всіх протитуберкульозних препаратів, *Mycobacterium bovis* - збудник туберкульозу великої рогатої худоби, лімфовузли хворих на туберкульоз корів. Як супутню мікрофлору використовували тест-культури *E. coli* (K 12), *B. subtilis*.

В дослідній групі була проведена туберкулінодіагностика згідно існуючої інструкції препаратом "туберкулін РРД для савців", виготовлений ЗАТ "Біолік" серія 43, (туберкулін в стандартному розчині), Сумської біофабрики. Після 10 діб після туберкулінізації відбирали молоко для досліджень в контрольній та дослідній групах.

Запропоноване живильне середовище готували наступним чином: брали 15г середовища САМСУМ розмішуючи компоненти в 100 мл очищеної води і кип'ятили 3-5 хвилин до повного розплавлення агару, фільтрували через ватно-марлевий фільтр, розливали у відповідний посуд, стерилізували при температурі  $120 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 15 хвилин в автоклаві і після охолодження при кімнатній температурі до  $40 - 50^\circ\text{C}$  живильне середовище розливали в асептичних умовах в стерильні чашки Петрі по 20 мл. Через 7-10 хвилин, як правило, проходило застигання середовища, на яке проводили посів. Готове живильне середовище мало білувате забарвлення з рН  $7,2 \pm 0,2$ .

Підготовлений антисептик-стимулятор також автоклаували при температурі  $120 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 15 хвилин.

Підготовленим стерильним антисептиком обробляли тест-культури мікроорганізмів чи досліджуваний матеріал в тому числі і молоко у співвідношенні 1:1 з подальшою обробкою електромагнітним опроміненням потужністю 8 герц, 50 Вт. протягом 40 хвилин, після чого термостатували 24 години при температурі  $36^\circ\text{C}$  і висівали отриману посівну суспензію в чашки Петрі на живильне середовище у дозі 1 мл.

Засіяні чашки не перевертали і ставили в термостат при температурі  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  на 10 діб. Облік результатів проводили після 24 годин інкубування в термостаті, а в подальшому щоденно до закінчення терміну.

**Результати досліджень** В процесі апробації встановлено, що ріст тест-штамів був отриманий як на контрольному, так і на дослідному середовищах. Результати досліджень приведені в таблиці 1.

Таблиця. 1.

**Результати досліджень якості сухого поживного середовища САМСУМ для експрес-виділення збудника туберкульозу**

Назва культур	К-ть дослідж	Назва середовища		
		Левенш.-Йенс. (контрольне)	ВКГ з стимулят. росту(контр.)	САМСУМ
<i>M. bovis</i>	25	5/ 42	10/2-5	10/1-3
<i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> R <sub>V</sub>	25	5/40-42	10/1-4	10/1-3
<i>M. tuberculosis</i>	30	10/41	10/1-3	10/1-3
<i>E. coli</i> (K 12)	30	7\2	10\1	-
<i>B. subtilis</i>	30	-	10\1	-
Лімфовузли тубкорів	15	5\39-42	5\1-3	5\1-3

Примітка: чисельник- кількість проб, а знаменник -через який період (діб) отримано ріст на всіх пробірках

Як видно з табл. 1, на контрольному середовищі Левенштейна – Йенсена ріст культури *M. bovis* в усіх пробірках появився на 42 добу, на ВКГ зі стимулятором - на 2-5 добу, а на середовищі САМСУМ через 1-3 доби. Аналогічна закономірність спостерігалась і на інших тест-штамах та дослідному патматеріалі. Слід зазначити, що супутня мікрофлора *E. coli* (K 12), *B. subtilis*, проявляла активний ріст на середовищі ВКГ з стимулятором росту. Отже, запропоноване середовище по ростовим якостям не уступало контрольному середовищу ВКГ з стимулятором росту, а мало навіть перевагу, оскільки не допускало ріст супутньої мікрофлори.

Сукупність усіх складових середовища САМСУМ, які об'єднані єдиним творчим задумом, дозволяє одержати технічний результат, а саме скоротити бактеріологічні дослідження, підвищити чутливість методу. За рахунок нових ознак у способі виділення збудника туберкульозу: попередньої обробки підготовленого патматеріалу антисептиком-стимулятором та електромагнітним опроміненням, нового складу живильного середовища для виділення збудника туберкульозу створюється синергічний ефект, який обумовлює скорочення тривалості інкубування матеріалу з одночасним підвищенням чутливості методу, і як результат - значне скорочення тривалості бактеріологічних досліджень.

Результати мікробіологічного дослідження молока корів через 10 днів після проведеної туберкулінодіагностики показали, що на середовищі „САМСУМ ” виявились характерні морфологічні ознаки колонії збудника туберкульозу в молоці дослідної групи, тоді як в контрольній групі такі мікроорганізми були відсутні.

Отримані результати спонукали нас провести мікробіологічні дослідження вищезгаданих туберкулінів на середовищі ВКГ, САМСУМ.

В результаті проведеного дослідження туберкулінів виявили, що проявляється ріст вегетативних клітин збудника туберкульозу. Отримані

культури з туберкулінів були аналогічні отриманим культурам з молока дослідних тварин.

При пересіві колоній із середовища ВКГ та САМСУМ на середовища Левенштейна-Йенсена без малахітового зеленого, культури набували паличковидної форми, а в мазках збільшувалась кількість рубіново-червоних форм. Посів на середовище ВКГ та САМСУМ показав наявність життєздатних форм збудника туберкульозу в автоклавованих препаратах (туберкулін ППД для савців) в тому числі консервованих фенолом, а при пересіві на середовище Левенштейна-Йенсона без малахітового зеленого ізоляти поновлювали кислотну стійкість.

Ідентифікація отриманих культур з молока та туберкулінів проводилась культурально – морфологічним методом і полімеразно – ланцюговою реакцією.

Результати досліджень показали, що молоко корів, яким проводили туберкулінізацію може мати збудник туберкульозу і в санітарному відношенні воно є небезпечним. Без сумнівів, що досліджувані туберкуліни, які виробляють з високо вірулентних штамів збудника туберкульозу, ретельно контролюються. Однак застосування нового поживного середовища (САМСУМ) довело наявність в ньому життєздатних структур, що мають генетичний зв'язок із збудником туберкульозу ( табл. 2 ). Наші дослідження дещо співпадають з повідомленнями ряду авторів [3], які зазначають, що в туберкуліні повинні бути фільтруючі форми збудника туберкульозу.

Таблиця 2.

**Результати ідентифікації отриманих культур з молока та туберкуліну ППД на середовищі САМСУМ**

Назва проб	Ріст на середовищі САМСУМ КП/НР*	Мазки по Ціль-Нільсену	РА** з анти-сировоткою M. bovis	ПЦР*** «Біоком» комплекс tuberculosis bovis
Молоко контрольних корів	-	-	-	-
Молоко дослідних корів	10/10	Голубі палички, опалесцентні коки	++++	+
ППД для савців, с.43, Сумська біофабрика	6/6	Голубі палички, опалесцентні коки	++++	+
Контроль: стимулятор росту	немає	-	-	-

Примітка: 1. \* - КП (кількість посівів, чашок) – чисельник, НР (наявність росту на засіяній чашці) – знаменник;

2. \*\* - РА - реакція аглютинації; 3. \*\*\* - ПЛР – полімеразно ланцюгова реакція.

Якщо вивільнити його від фільтруючих форм, то він втратить свою специфічність і буде непридатний до використання, але незначна кількість інфікованого туберкуліну, що потрапляє в організм тварин не в змозі викликати захворювання. З цією думкою ми незгодні, так як в організмі тварини фільтруючі форми можуть розмножуватись і попадати в організм людини з м'ясом та молоком. Відомо, що пасажування збудника туберкульозу приводить до підвищення патогенності. Отже туберкулін є препаратом, який вводиться

парентерально і тому він має бути вільним від мікроорганізмів в тому числі і збудника туберкульозу незалежно від його адаптивних форм.

Враховуючи, що смертність наших співвітчизників від туберкульозу на 100 тис. населення в 1999р. становила 8,1, але цей показник значно збільшився і становив в 2005р.-23,1, то необхідно підвищити вимоги до заходів в боротьбі з поширенням епідемії туберкульозу в Україні. Думається, що необхідно відмовитись від використання біологічного препарату (туберкуліну ППД для ссавців) в якому знаходяться фільтруючі форми збудника туберкульозу, так як ці форми, потрапивши в організм тварин з туберкуліном, розносяться кров'ю і виділяються з молоком корів. Важливо пам'ятати, що туберкульоз надзвичайно небезпечна інфекційна хвороба. За даними ряду авторів [4] людина може заразитись при вживанні інфікованого м'яса, молока, сметани, масла, кисломолочних продуктів. А тому вивчення біології розвитку збудника туберкульозу з врахуванням екологічного моніторингу необхідно використовувати в сучасних підходах оцінки якості та безпеки тубінфікованої тваринницької сировини харчових продуктів.

**Висновки.** Розробка нового способу мікробіологічного виділення збудника туберкульозу з молока забезпечує виключно високу чутливість при вирощуванні збудника туберкульозу, з використанням антисептика - стимулятора та поживного середовища САМСУМ, суттєво розширює можливості вивчення біології збудника туберкульозу і його стійкості до різних факторів зовнішнього середовища.

#### Література

1.Фролов В.М., Пересадим Н.А., Петруня А.М. Влияние экологически вредных факторов крупного промышленного региона на иммунологическую реактивность населения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.- 1995,-№2.- С. 119-123

2.Сутокская И.В. О фундаментальных исследованиях в гигиене //Довкілля та здоров'я , - 1996.-№1.- С.22-24.

3. Колос Ю., Стець В., Титаренко В., Зелінський М., Якубчак О., Хоменко В. До питання діагностики туберкульозу в тварин// Ветеринарна медицина України - 2006- №11-С. 10-12. ]

4.Бусол В.А., Коваленко Л.В., Ситник В.А., Шевчук В.Н. 125 лет со времени открытия возбудителя туберкулеза. Киев. 2006-С.14.

#### Summary

#### METHOD OF THE ECOLOGICAL MONITORING OF PATHOGEN OF TUBERCULOSIS IN MILK

*In work the intercommunication of stimulant reproduction activity of pathogen of tuberculosis with the radioactive irradiation is exposed and the stages of development of pathogenic micobacteries in milk.*

*Стаття надійшла до редакції 1.09.2010*