



ЗАЛЕЖНІСТЬ АДАПТИВНОЇ ЗДАТНОСТІ *M. BOVIS* ВІД ВПЛИВУ ГІДРОГУМАТУ

Олег КУЛІШЕНКО, аспірант

Марина ЗЕЛЕНЬКА, кандидат ветеринарних наук

Олексій ТКАЧЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор

Дніпропетровський державний аграрний університет

Питання оптимального живильного середовища для культивування мікобактерій є досить актуальною проблемою сучасної ветеринарної мікробіології, причому ця проблема постійно існує з часів Коха. Збудники туберкульозу є досить вибагливі до складу живильних середовищ, умов культивування і належать до збудників, які важко піддаються виділенню на живильних середовищах [1, 3, 8].

Дехто з дослідників [5, 6] вважає, що деякі речовини гумінової природи при внесенні їх у живильні середовища можуть дещо пришвидшити розмноження мікобактерій і покращити якість лабораторної діагностики туберкульозу [7, 6].

Ряд інших учених указують на те, що препарати гумінової природи посилюють розмноження та розвиток окремих видів мікроорганізмів і ступінь стимуляції може бути достатньо високим залежно від дози

препарату, живильного середовища й умов довкілля [9]. Активна речовина препаратів, проникаючи в клітину, здійснює пряму мембранотропну дію, сприяючи перебудові мембрани та зміні в ланцюзі метаболічних реакцій [5].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ – вивчити ступінь залежності адаптивної здатності *M.bovis* від впливу гідрогумату.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. В роботі використано *M.bovis* музейного повільнорослого штаму «Шахтар» і такі, що виділені з біологічного матеріалу (лімфатичні вузли) реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців великої рогатої худоби з неблагополучних щодо туберкульозу господарств за методом А.П. Алікаєвої [4]. Для визначення бакте-

ріологічної ефективності використали середовище Мордовського з гідрогуматом різної концентрації. Контролем слугувало стандартне середовище Мордовського з рН 6,5 та сухе живильне середовище для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків, рН 7,1.

Для визначення впливу гідрогумату на швидкість росту мікобактерій приготували дев'ять варіантів середовища Мордовського із поступовим зниженням концентрації досліджуваного препарату шляхом послідовних розведень. На початку готували робочі розведення препарату для додавання до се-

редовища Мордовського. Як відправну точку розведення гідрогумату використовували концентрацію 0,25%. Розведення проводили за наступною схемою:

1. Стерильний робочий розчин гідрогумату 0,25% 4 мл, з нього додавали по 0,5 мл у 4 пробірки з некоагульованим середовищем Мордовського з рН 6,5;

2. До залишку розчину додавали 2 мл стерильної дистильованої води й отримували 4 мл 0,125% розчину гідрогумату, з нього теж додавали по 0,5 мл в 4 пробірки з некоагульованим середовищем Мордовського з рН 6,5 і т. д., а саме:

2 мл 0,125%	розчину	гідрогумату	+ 2 мл	дистильованої	води	= 4 мл 0,06%
2 мл 0,06%	« »	« »	+ 2 мл	« »	« »	= 4 мл 0,03%
2 мл 0,03%	« »	« »	+ 2 мл	« »	« »	= 4 мл 0,015%
2 мл 0,015%	« »	« »	+ 2 мл	« »	« »	= 4 мл 0,008%
2 мл 0,008%	« »	« »	+ 2 мл	« »	« »	= 4 мл 0,004%
2 мл 0,004%	« »	« »	+ 2 мл	« »	« »	= 4 мл 0,002%
2 мл 0,002%	« »	« »	+ 2 мл	« »	« »	= 4 мл 0,001%

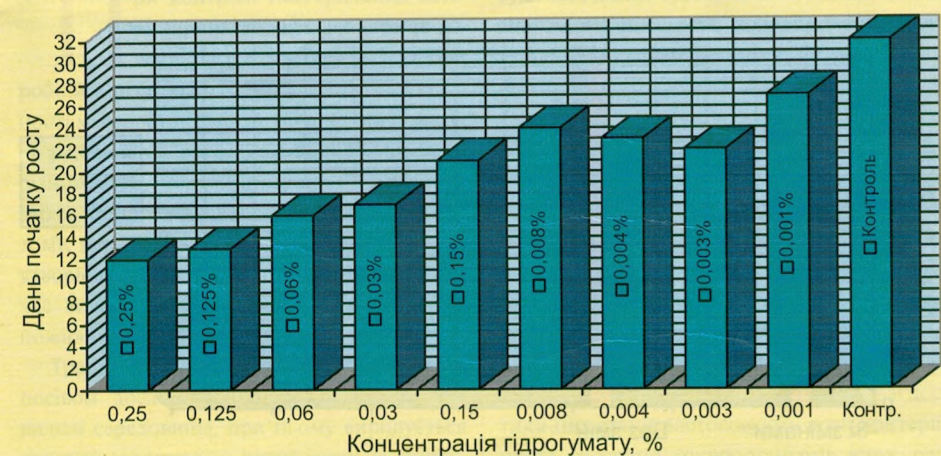
Пробірки з певною концентрацією розчину гідрогумату коагулювали в кошеному положенні при температурі +90°C протягом 60 хв. Далі готували завись *M. bovis* штаму «Шахтар» – 1 мг культури на 1 см³ фізіологічного розчину та проводили мікроскопію. Потім робили посів завись на середовище Мордовського з різною концентрацією гідрогумату, а як контроль використовували стандартне живильне середовище Мордовського. Облік росту колоній проводили через 2–3 дні протягом перших 10 та кожні 5 днів упродовж наступних 80 з описом їх кількості, вивченням морфологічних і тинкторіальних властивостей мікобактерій [4]. Розмір колоній визначали за критеріями: дрібні колонії – 1–2 мм; середні – 2–4 мм і великі – до 4 мм [2].

Наступним етапом було дослідження ефективності середовища для виділення збудника із проб патологічного матеріалу (лімфатичні вузли) великої рогатої худоби із неблагополучних щодо туберкульозу господарств.

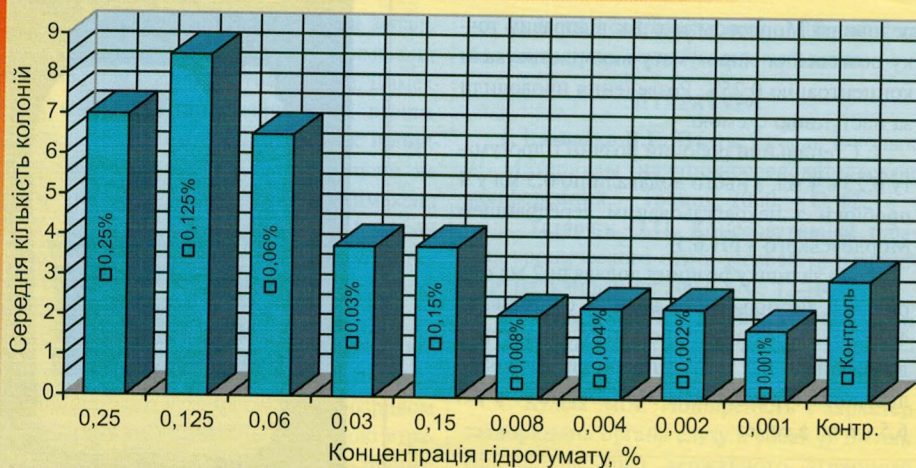
Схема досліду полягала у препаруванні 8 проб патологічного матеріалу з метою виявлення та опису змін, властивих туберкульозу: п'ять проб із характерними вогнищами запаленого некрозу, три – без змін.

Суспензію патологічного матеріалу висівали на середовище Мордовського, Мордовського з додаванням гідрогумату та сухе живильне середовище для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків, рН 7,1. Вивчали культуральні й морфологічні властивості мікобактерій [4].

Для визначення впливу досліджуваного препарату на інтенсивність розмноження *M. bovis* було проведено порівняльне дослідження кількості накопиченої біомаси *M. bovis* епізоотичного штаму на середовищі з гідрогуматом та середовищі Мордовського. Для цього підготовлену завись висівали із розрахунку 1 мг на 1 см³ фізіологічного розчину на 120 пробірок середовища Мордовського і на 120 пробірок такого з гідрогуматом у концентрації 0,125%. Зняття культури проводили на 30-й день із часу появи колоній.



1. Ріст культури *M. bovis* штаму «Шахтар» на середовищі з гідрогуматом



2. Кількість колоній *M. bovis* штаму «Шахтар» на 10-й день від початку росту на середовищі з гідрогуматом

Статистичну обробку отриманих даних виконували за допомогою прикладної програми Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Встановлено (рис. 1 та 2.), що перші колонії з'явилися на 13-й день на середовищах із концентрацією гідрогумату 0,25 і 0,125%. Ріст колоній мікобактерій на середовищах із нижчою концентрацією гідрогумату спостерігався у більш віддалений строк. Мікроскопія культур – короткі, червоні, зернисті палички із заокругленими кінцями. В контролі ріст колоній було зареєстровано на 32-й день. Найбільша середня кількість колоній – $8,5 \pm 2,10$ на 10-й день від початку росту виявлялася на середовищі з розведенням гідрогумату 0,125%, у контролі – $3,0 \pm 0,40$, що в 2,83 раза ($P > 0,95$) менше, ніж на дослідному середовищі.

Колонії на середовищах із різним розведенням гідрогумату морфологічно відрізнялись від вихідної культури *M. bovis* штаму «Шахтар». Вони були більшими за розміром (середні та великі), окрім S-форм колоній вихідного штаму, відмічалась поява і R-форм.

Отже, із вищезазначеного можна зробити висновок, що середовище Мордовського з додаванням 0,125% розчину гідрогумату в 2,83 раза ефективніше порівняно зі звичайним середовищем Мордовського ($P > 0,95$).

Виділення культури збудника туберкульозу з патологічного матеріалу на середовищах із різним рН та розчином гідрогумату 0,125% наведено на рис. 3, 4.

Аналізуючи дані, видно, що середній показник початку росту колоній у пробах зі змінами на середовищі Мордовського становить $15,75 \pm 2,09$ днів, на сухому живильному середовищі для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина» – $18,0 \pm 2,44$ днів, а на середовищі Мордовського, рН 6,5, з розчином гідрогумату 0,125% – $12,5 \pm 0,64$. Різниця в початку росту колоній між стандартним середовищем Мордовського та середовищем з гідрогуматом стано-

вила 1,26 раза, ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків, рН 7,1 – 1,44 раза.

Середній показник початку росту колоній у пробах без змін на середовищі Мордовського становить $6,0 \pm 0$, на середовищі Мордовського із розчином гідрогумату – $5,0 \pm 0$, ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків, із рН 7,1 – $6,5 \pm 0,5$. Різниця між початком росту колоній на стандартному середовищі Мордовського та середовищі з гідрогуматом становить 1,2 раза, а в ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків, із рН 7,1 – 1,3 раза.

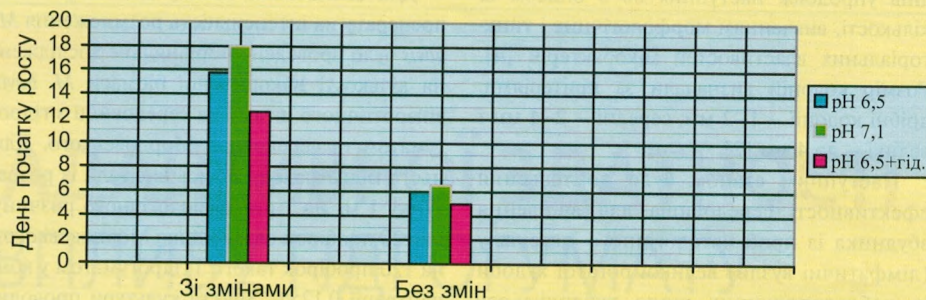
Середня кількість колоній на 10-й день від початку росту в посівах із проб патологічного матеріалу зі змінами на середовищі Мордовського із розчином гідрогумату в

1,64–2,15 раза вища від середовища Мордовського та сухого живильного середовища для культивування мікобактерій ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків.

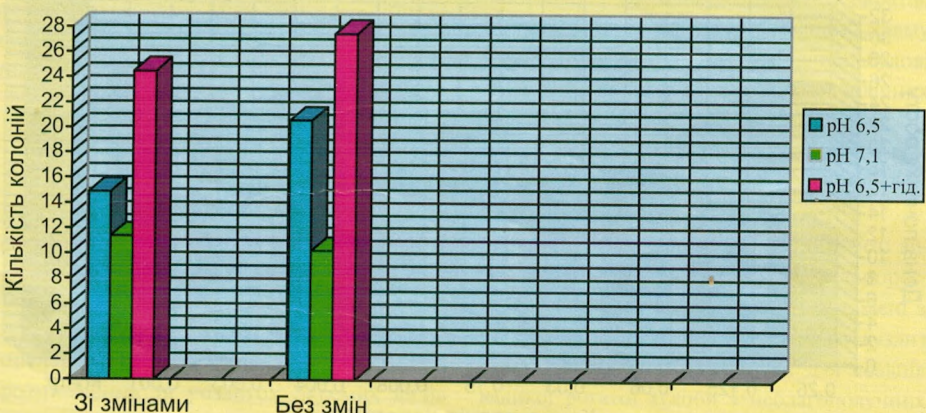
Середній показник кількості колоній на 10-й день від початку росту в пробах без змін на середовищі Мордовського становив $20,6 \pm 12,8$, на середовищі Мордовського із розчином гідрогумату – $27,5 \pm 17,25$, а на середовищі ДП «Ветеринарна медицина» – $10,25 \pm 4,0$, що в 1,33–2,68 раза менше, ніж на першому середовищі.

За морфологією колоній мікобактерій, виділені з проб патологічного матеріалу зі змінами, були S-форми, дрібні та середні, кольору слонової кістки, вологі. Морфологічні характеристики колоній мікобактерій, виділених із проб без змін, – R- та S-форми, дрібні та середні, жовтого і білого кольору, вологі. Мікроскопія мікобактерій, виділених із проб зі змінами, – короткі, червоні, зернисті палички із заокругленими кінцями. Мікроскопія штамів проб без змін – червоні палички, короткі та довгі, із заокругленими кінцями, кокоподібні й сегментовані, зернисті.

Як засвідчили дослідження, гідрогумат при оптимальній концентрації в середовищі та однакових умовах культивування суттєво впливає на інтенсивність накопичення епізоотичного штаму *M. bovis*. На 30-й день від початку росту колоній на середовищі із гідрогуматом об'єм знятої культури був у 18,6 раза більший за масою, ніж за аналогічний термін на середовищі Мордовського.



3. Ріст культур мікобактерій на середовищах



4. Кількість колоній мікобактерій на 10-й день від початку росту

ВИСНОВКИ

1. Гідрогумат суттєво впливає на інтенсивність розмноження *M. bovis* музейних та епізоотичних штамів.

2. Внесення гідрогумату в штучне живильне середовище в концентрації 0,125% підвищує термін появи перших колоній (в 1,2–1,44 раза) та їх кількість (в 1,33–2,68 раза).

3. На 30-й день від початку росту колоній на середовищі з гідрогуматом об'єм знятої культури був у 18,6 раза більший за масою, ніж за аналогічний термін на середовищі Мордовського.

4. Вдосконалене середовище обґрунтовано може бути застосовано у ветеринарній медицині з метою покращення лабораторної діагностики туберкульозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Хільченко Г., Зеленська М., Ковальова Л. та ін. Адаптивна здатність *M. bovis* на щільних яєчних середовищах з різним рН // Ветеринарна медицина України. – 2004. – №7. – С. 18–21.

2. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н.А. Радчук, Г.В. Дунаев, Н.М. Колычев и др.; Под ред. Н.А. Радчука. – М.: Агропромиздат, 1991. – С. 52.

3. Кассіч Ю., Завгородній А., Тихонов П. та ін. Епізоотологічне значення видів мікобактерій, виділених у господарствах України // Ветеринарна медицина України. – 1996. – №9. – С. 24–25.

4. Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. – Київ, 1994. – 39 с.

5. Нуралинов Р.А., Казиахмедов З.К. Новая среда для выделения и культивирования микобактерий // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2004. – №6. – С.34–37.

6. Нуралинов Р.А. Питательные среды для индукции и культивирования микобактерий // Ветеринария. – 2004. – №3. – С.24–27.

7. Павлов Н.Г. Совершенствование диагностики и комплексных мер профилактики туберкулёза КРС: Дис. канд. вет. наук. – Якутск, 2006. – 170 с.

8. Ткаченко О.А. Ефективність методу збагачення передпосівного матеріалу та епізоотологічна доцільність його використання при діагностиці туберкульозу // Ветеринарна медицина України. – 2002. – №6. – С. 9–12.

9. Huck T.A., Porter N., Bushel M. E. Effect of humates on microbial activity // J.Gen. Microbiol. – 1991. – V. 137; Issue 10. – P. 2321–2329.

РЕЗЮМЕ

Зависимость адаптационной способности *M.bovis* от влияния гидрогумата. О.М. Кулишенко, М.В. Зеленская, А.А. Ткаченко.

Обоснована необходимость применения питательной среды с гидрогуматом для производственных и научных целей. Поскольку интенсивность размножения микобактерий непосредственно связана с обменными процессами микробной клетки, оправданы последующие исследования химического строения и вирулентности микобактерий, культивированных на среде с гидрогуматом.

The Dependency adaptive abilities *M. bovis* from influence hydrohumates. O.M. Kulishenko, M.V. Zelenskaya, O.A. Tkachenko.

Motivated need of the using the nourishing ambience with hydrohumates production and scientific purpose. Since intensity duplication mycobacterium is directly connected with fraudulent processes microbial hutch, justified following studies of the chemical construction and virulence mycobacterium, cultivated on ambience with hydrohumates.

