



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 119282

(13) U

(51) МПК

G01N 33/24 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 00974**

(22) Дата подання заявки: **03.02.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.09.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.09.2017, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):

**Скрипник Валерій Григорович (UA),
Головко Анатолій Миколайович (UA),
Рубленко Наталія Михайлівна (UA),
Рубленко Сергій Васильович (UA),
Рубленко Ірина Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

Рубленко Ірина Олександрівна,
прос. Олександрійський, 20, кв. 34, м. Біла
Церква, Київська обл., 09100 (UA),
Скрипник Валерій Григорович,
вул. Васильківська, 16, кв. 225, м. Київ,
03040 (UA),
Головко Анатолій Миколайович,
пров. Жуковського, 6, м. Київ, 03022 (UA),
Рубленко Наталія Михайлівна,
вул. Академіка Кримського, 4, кв. 24, м. Біла
Церква, Київська обл., 09100 (UA),
Рубленко Сергій Васильович,
прос. Олександрійський, 20, кв. 34, м. Біла
Церква, Київська обл., 09100 (UA)

(54) СПОСІБ УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ ВІЯВЛЕННЯ СПОР ЗБУДНИКА BACILLUS ANTHRACIS У ҐРУНТІ

(57) Реферат:

Спосіб удосконалення методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті шляхом приготування суспензії з ґрунту. При цьому ґрунт беруть у кількості 2,5 г, додають сахарозу-трисон X-80 та БСА/ФСБ (1 % бичачий сироватковий альбумін у фосфатно-сольовому буфері).

UA 119282 U

Корисна модель належить до сільського господарства, зокрема до ветеринарної медицини, і може бути використана для удосконалення методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті при встановленні його безпечності за лабораторної діагностики сибірки тварин, індикації збудника з біологічного матеріалу та об'єктів навколишнього середовища у бактеріологічних відділах державних лабораторіях ветеринарної медицини. За результатами цього методу можна отримати якісні та кількісні показники для удосконалення методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті.

Аналогом корисної моделі є спосіб виявлення чисельності мікроорганізмів у ґрунті методом посіву на тверде (агаризоване) живильне середовище згідно з ДСТУ 7847:2015 [1], який базується на особливості приготування розведень суспензії (1:10). Із кожної проби ґрунту проводять посів не менше двох об'ємів по 0,1 чи 0,2 см³ на поверхню живильного середовища у бактеріологічні чашки. Шпателем розтирають по всій поверхні середовища. Культивують чашки з посівами за температури 28-30 °С протягом 72 год. Результати отримують шляхом підрахунку колоній на чашках, враховуючи розведення суспензії ґрунту. Недоліком даного методу є те, що він довготривалий, громіздкий, дозволяє виявити малу кількість спор, має значні затрати на живильне середовище, посіви містять велику кількість спор сторонньої мікрофлори. Крім цього, даний метод дає похибку від 15 до 25 %.

Прототипом корисної моделі є метод виявлення збудника *Bacillus anthracis* у об'єктах навколишнього середовища, ґрунті [2], у якому застосовують великий об'єм ґрунту (50-70 г) для приготування вихідної суспензії (15-20 см), яка готується з додаванням фізіологічного розчину, дистильованої води чи пірофосфату натрію. Недоліком даного методу є те, що він громіздкий, потребує проведення декількох послідовностей досліджень, має недостатнє збагачення досліджуваної суспензії, проби містять велику кількість сторонньої спорової сапрофітної мікрофлори, потребує велику кількість живильного середовища. Крім цього, даний метод дає похибку у 35-40 %.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб удосконалення методу виявлення спор збудника *Bac. anthracis* у ґрунті шляхом приготування суспензії з використанням ґрунту, сахарози-тритону Х-80, БСА/ФСБ (1 % бичачого сироваткового альбуміну), що забезпечить очищення спор в осаді, їх кількість, скорочення часу виявлення.

Спосіб полягає у наступному: беруть 2,5 г ґрунту і заливають розчином для екстракції (100 см³ дистильованої води, 1,22 г/см³ сахарози-тритону Х-80). Потім струшують протягом 1 хв., після чого збовтують на шейкері протягом 15 хв. за 75 об./хв. для осадження піни з поверхні суспензії.

Відбирають 3 см³ рідини з поверхні надосадової рідини у стерильну пробірку, додають 6 см³ БСА/ФСБ (фільтрованого 1 % бичачого сироваткового альбуміну у 0,01 моль/см³ фосфатно-сольовому буфері, рН 7,2) - для забезпечення осадження спор шляхом центрифугуванням. Зразки відцентрифугують за 5100 об./хв. протягом 10 хв.

Надосадову рідину зливають та знищують, а до осаду додають 1 см³ БСА/ФСБ.

Інкубують на водяній бані за температури 63 °С протягом 20 хв. Потім проводять посів на середовище PLET (polymyxin, lysozyme, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), tallous acetate) чи диференційно-діагностичне середовище з 0,01 % фенолфталеїнфосфатом натрію.

Посіви розміщують у термостаті за температури 36±1 °С протягом 18-20 год. Ріст на бактеріологічних чашках із PLET-агаром враховують через 48 год.

Етапи вирішення даної задачі наведено у нижче зазначених прикладах.

Приклад 1. Для розробки методу використовували дослідну суспензію із 30,0 г ґрунту, яку поміщали у скляну колбу і заливали 20 см³ розчину натрію хлориду з масовою концентрацією 0,85 %. Потім струшували зразок протягом 10 хв. та відстоювали 3 хв. Відбирали 10 см рідини з поверхні надосадової рідини у стерильну пробірку, для забезпечення осадження спор проводили центрифугування. Зразки центрифугували за 4000 об./хв. протягом 5 хв. Надосадову рідину зливали та знищували. Інкубували осад на водяній бані за температури 70 °С протягом 40 хв. У подальшому проводили посів на 5 чашок (у трьох послідовностях) методом Дригальського на середовище МПА з 0,01 % фенолфталеїнфосфатом натрію. Посіви розміщували у термостаті за температури 38 °С на 18 год.

Приклад 2. Для розробки методу використовували дослідну суспензію із 15,0 г ґрунту, який поміщали у скляну колбу і заливали 15 см³ розчину для екстракції (100 см³ дистильованої води, 1,22 г/см³ сахарози-тритону Х-80). Потім струшували зразок протягом 5 хв., після чого збовтували на шейкері протягом 10 хв. за 75 об./хв. для осадження піни з поверхні суспензії. Відбирали 7 см³ рідини з поверхні надосадової рідини у стерильну пробірку, додавали 10 см³ БСА/ФСБ (фільтрованого 1 % бичачого сироваткового альбуміну у 0,01 моль/см³ фосфатно-сольовому буфері, рН 7,2) - для забезпечення осадження спор шляхом центрифугуванням.

Зразки центрифугували за 4500 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину зливали та знищували, а до осаду додавали 1 см БСА/ФСБ. Інкубували на водяній бані за температури 60 °С протягом 30 хв. Потім проводили посів на середовище МПА з 0,01 % фенолфталеїнфосфатом натрію і PLET (polymyxin, lysozyme, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), tallous acetate). Посіви культивували у термостаті за температури 36±1 °С протягом 20 год. Ріст на бактеріологічних чашках із PLET-агаром враховували через 48 год.

Приклад 3. В основу даної корисної моделі поставлено задачу - розробити спосіб удосконалення методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті шляхом зміни кількості досліджуваної проби (2,5 г ґрунту), яку поміщали у скляну колбу і заливали 12 см³ розчину для екстракції (100 см³ дистильованої води, 1,22 г/см³ сахарози-тритону Х-80. Потім струшували зразок протягом 1 хв., після чого збовтували на шейкері протягом 15 хв. за 75 об./хв. для осадження піни з поверхні суспензії. Відбирають 3 см³ рідини з поверхні надосадової рідини у стерильну пробірку, додають 6 см БСА/ФСБ (фільтрованого 1 % бичачого сироваткового альбуміну у 0,01 моль/см³ фосфатно-сольовому буфері, рН 7,2) - для забезпечення осадження спор шляхом центрифугуванням.

Зразки центрифугують за 5100 об./хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину зливають та знищують, а до осаду додають 1 см³ БСА/ФСБ. Інкубують на водяній бані за температури 60 °С протягом 20 хв.

Потім проводять посів на середовище PLET (polymyxin, lysozyme, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), tallous acetate), диференційно-діагностичне середовище з 0,01 % фенолфталеїнфосфатом натрію.

Посіви культивують у термостаті за температури 36±1 °С протягом 18-20 год. Ріст на бактеріологічних чашках із PLET-агаром враховують через 48 год.

Порівняльна оцінка результатів випробування вищезазначених способів удосконалення методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті до прототипу наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння способів удосконаленого методу виявлення спор збудника *Bac. anthracis* у до прототипу

№ п/п	Показники, що порівнюються	Прототип	Приклади		
			1	2	3
1.	Приготування дослідної суспензії:				
	1.1 Кількість ґрунту, г	50-70	30	15	2,5
	1.2 Розчин для отримання	0,9 %-ний розчин натрію хлориду, дистильована вода або 0,5 %-ний розчин пірофосфату натрію	0,85 %-ний розчин натрію хлориду	розчин для екстракції	розчин для екстракції
	1.3 Кількість розчину, см ³	-	20	15	12
2.	Час струшування, хв.	25	10	5	1
3.	Час відстоювання, хв.	5-8	3	10 (шейкер)	15 (шейкер)
4.	Кількість суспензії для дослідження, см ³	15-20	10	7	3
5.	Додаткове підвищення ефективності	фільтрування через марлевий фільтр	-	10см ³ БСА/ФСБ	6 см ³ БСА/ФСБ
6.	Час центрифугування, хв.	15	5	10	10
7.	Центрифугування, об./хв.	3000	4000	4500	5100
8.	Матеріал для посіву	осад	осад	осад із додаванням 1 см ³ БСА/ФСБ	осад із додаванням 1 см ³ БСА/ФСБ
9.	Очищення проби: - прогрівання на водяній бані за температури, °С - час прогрівання, хв.	65 80	70 40	60 30	60 20

Продовження таблиці 1

Порівняння способів удосконаленого методу виявлення спор збудника *Bac. anthracis* у до прототипу

№ п/п	Показники, що порівнюються	Прототип	Приклади		
			1	2	3
10.	Кількість бактеріологічних чашок із середовищем для посіву, шт.	3-4	5×3	4×3	3×3
11.	Середовище для культивування	МПА, Хоттінгера, МПА з 0,01 % фенолфталеїн-фосфатом натрію	МПА з 0,01 % фенолфталеїн-фосфатом натрію	МПА з 0,01 % фенолфталеїн-фосфатом натрію і PLET	МПА з 0,01 % фенолфталеїн-фосфатом натрію, PLET
12.	Температура культивування, °С	37±1	38	36±1	36±1
13.	Час культивування, год.	18-24	18	20/48	20/48
14.	Концентрація спор, при якій виділяється спори <i>Bacillus anthracis</i> із 1 г ґрунту	35	50	15	5,7
15.	Ідентифікація: 15.1. Кількість відібраних колоній із МПА, шт.	не менше 10 колоній: матово-сірих, шорстких, R-форми	-	-	-
	15.2. Кількість типових відібраних колоній із МПА із 0,01 % фенолфталеїнфосфатом натрію	колонії білого кольору, що не змінили колір після обробки парами аміаку	колонії білого, сіро-білого кольору, що не змінили колір після обробки парами аміаку	колонії білого, сіро-білого кольору, що не змінили колір після обробки парами аміаку	колонії білого, сіро-білого кольору, що не змінили колір після обробки парами аміаку
16.	Швидкість проведення дослідів, год.	21-26	19±2	21±1	21±1
17.	Стабільність показників по удосконаленому методу виявлення спор збудника <i>Bac. anthracis</i> у ґрунті, %	93,7	75,0	84,5	99,9
18.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності патогенних ентеробактерій у ґрунті, у %	87,0-93,6	85,4-87,0	76,3-80,2	98,9-99,5
19.	Співвідношення результатів досліджень щодо визначення наявності нітрофікуючих бактерій у ґрунті, у %	84,9-87,8	87,3-89,8	83,7-85,1	98,2-99,6

Дані табл. 1 свідчать, що більш достовірні дані у порівнянні з результатами досліджень щодо визначення наявності способів удосконалення методу виявлення ентеробактерій у ґрунті - у 98,9-99,5 % [3] та до результатів досліджень щодо визначення наявності нітрофікуючих бактерій у ґрунті - у 98,2-99,6 % [4] були отримані при застосуванні методу за прикладом № 3. Також найвища стабільність показників по удосконаленню методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті була за прикладом № 3-99,9 %.

Використовуючи метод за прикладом № 3, ми провели виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті удосконаленим методом на 70 пробах: ґрунт стерильний із додаванням спор - 30 проб; ґрунт не стерильний - 40 проб. Результати наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Показники виявлення удосконаленого методу виявлення спор збудника
Bacillus anthracis у ґрунті за прикладом № 3

№ п/п	Перелік видів досліджуваних проб ґрунту	Виявлення спор збудника <i>Bacillus anthracis</i> у ґрунті за забарвленням колоній за прикладом №3			
		Кількість проб	Наявність колоній збудника <i>Bacillus anthracis</i>	Кількість проб	Відсутність колоній збудника <i>Bacillus anthracis</i>
1	ґрунт стерильний із додаванням спор <i>Bacillus anthracis</i> , n=30	n=15	через 20 год. до обробки парами 25 % аміаку білі, сіро-білі, випуклі, R-форми; через 20 год. після обробки параами 25 % аміаку - білі, сіро-білі, випуклі, R-форми.	n=15	відсутність росту
2	ґрунт не стерильний, n=40	n=20	через 20 год. до обробки парами 25 % аміаку всі колонії білі, сіро-білі, випуклі, R-форми; через 20 год. після обробки параами 25 % аміаку колонії <i>Bacillus anthracis</i> білі, сіро-білі, випуклі, R-форми.	n=20	всі колонії рожеві.

5

Встановлено типові колонії збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті через 20 годин за температури 36 °С.

Ці дані були стабільними та достовірними, отже, ці показники можна використовувати при оцінюванні безпечності ґрунту.

Крім того, слід зазначити, що метод є економним, простим у виконанні, а його результати дають конкретні якісні показники по забарвленню типових колоній білі, сіро-білі, випуклі, R-форми.

Метод за прикладом № 3 нами пропонується як якісний та кількісний спосіб удосконалення методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті поряд з іншими методами визначення їх безпечності (визначення загальної кількості мікроорганізмів (КМАФАнМ), визначення бактерій групи кишкової палички (БГКП), визначення перфрингенс-титру, нітрофікуючих бактерій та ін.) [5].

Метод має перевагу перед існуючими якісними методами визначення безпечності ґрунту тому, що результати мають достовірні показники за не забарвленням типових колоній *Bacillus anthracis*.

Джерела інформації:

1. ДСТУ 7847:2015 Якість ґрунту. Визначення чисельності мікроорганізмів у ґрунті методом посіву на тверде (агаризоване) живильне середовище [Текст]. Чинний від 2016-07-01. - Київ: УкрНДНЦ, 2016. - III, 12 с. - (Національний стандарт України). - Бібліогр.: с. 11.

2. Інструкції з лабораторної діагностики сибірки у людей, в сировині тваринного походження та об'єктах довкілля: Наказ МОЗ України від 21.08.2002, № 321.

3. Ветеринарна санітарна мікробіологія / А.М. Головка, І.О. Рубленко. - Київ, 2010. - 67-68 с.

4. Г.Г. Жарикова Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена / Г.Г. Жарикова. - 2-е изд., М.: "Академия". - 2007. - С. 173-176.

5. Кочермасова З.Н. Санитарная микробиология и вирусология / З.Н. Кочермасова, С.А. Ефремова, А.М. Рыбакова. - М., Медицина. - 1987. - С. 118-134.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5 Спосіб удосконалення методу виявлення спор збудника *Bacillus anthracis* у ґрунті, що полягає у приготуванні суспензії з ґрунту, який **відрізняється** тим, що ґрунт беруть у кількості 2,5 г, додають сахарозу-третон Х-80 та БСА/ФСБ (1 % бичачий сироватковий альбумін у фосфатно-сольовому буфері).

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601