

УКРАЇНА

UKRAINE



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 63246

СИНТЕТИЧНЕ ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ (СОТОНА КФ)
ДЛЯ ПРИСКОРЕННОГО НАКОПИЧЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ
МАСИ МІКОБАКТЕРІЙ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **10.10.2011.**

Голова Державної служби
інтелектуальної власності України

М.В. Паладій



(11) 63246

(19) UA

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/32 (2006.01)

(21) Номер заявки: и 2010 14606
(22) Дата подання заявки: 06.12.2010
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2011
(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюллетеня: 10.10.2011, Бюл. № 19

(72) Винахідники:
Кассіч Володимир Юрійович, UA,
Фотіна Тетяна Іванівна, UA,
Фотіна Ганна Анатоліївна,
UA,
Дзюба Володимир Миколайович, UA,
Кассіч Олексій Володимирович, IN,
Полоз Ірина Миколаївна, IN

(73) Власник:
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Кірова, 160, м. Суми,
40021, UA

(54) Назва корисної моделі:

СИНТЕТИЧНЕ ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ (СОТОНА КФ) ДЛЯ ПРИСКОРЕННОГО НАКОПИЧЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ МАСИ МІКОБАКТЕРІЙ

(57) Формула корисної моделі:

Синтетичне живильне середовище для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій, яке містить: L-аспарагін ($C_4H_3NO_3 \cdot H_2O$), калій фосфорнокислий двозаміщений (K_2HPO_4), магній сірчанокислий ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), лимонну кислоту ($C_6H_5O_7 \cdot H_2O$), гліцерин ($C_3H_8O_3$), воду дистильовану, підігріту до температури 70 °C, яке відрізняється тим, що додатково містить залізо сірчанокисле ($FeSO_4$), амоній лимоннокислий двозаміщений ($C_6H_{14}O_7N_2$), харчову яблучну кислоту ($C_4H_6O_5$) та цинк сірчанокислий ($ZnSO_4$), у такому співвідношенні компонентів, (г):

L-аспарагін ($C_4H_3NO_3 \cdot H_2O$)	5,0
калій фосфорнокислий двозаміщений (K_2HPO_4)	0,5
магній сірчанокислий ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,5
лимонна кислота ($C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	2,0
харчова яблучна кислота ($C_4H_6O_5$)	1,0
цинк сірчанокислий ($ZnSO_4$)	0,1
амоній лимоннокислий двозаміщений ($C_6H_{14}O_7N_2$)	2,0
залізо сірчанокисле ($FeSO_4$)	0,05
гліцерин ($C_3H_8O_3$)	50,0
вода дистильована підігріта до температури 70 °C	до 1 л.



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63246 (13) U

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛІКУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

відається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СИНТЕТИЧНЕ ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ (СОТОНА КФ) ДЛЯ ПРИСКОРЕННОГО НАКОПИЧЕННЯ
БАКТЕРІАЛЬНОЇ МАСИ МІКОБАКТЕРІЙ

1

2

(21) u201014606

(22) 06.12.2010

(24) 10.10.2011

(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.

(72) КАССІЧ ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ, ФОТИНА ТЕТЯНА ІВАНІВНА, ФОТИНА ГАННА АНАТОЛІЇВНА, ДЗЮБА ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, КАССІЧ ОЛЕКСІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ІН, ПОЛОЗ ІРИНА МИКОЛАЇВНА, ІН

(73) СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Синтетичне живильне середовище для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій, яке містить: L-аспарагін ($C_4H_9NO_3 \cdot H_2O$), калій фосфорнокислий двозаміщений (K_2HPO_4), магній сірчанокислий ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), лимонну кислоту ($C_6H_5O_7 \cdot H_2O$), гліцерин ($C_3H_8O_3$), воду дистильовану, підігріту до температури 70 °C, яке

відрізняється тим, що додатково містить залізо сірчанокисле ($FeSO_4$), амоній лимоннокислий двозаміщений ($C_6H_{14}O_7N_2$), харчову яблучну кислоту ($C_4H_6O_5$) та цинк сірчанокислий ($ZnSO_4$), у такому співвідношенні компонентів, (г):

L-аспарагін ($C_4H_9NO_3 \cdot H_2O$)	5,0
калій фосфорнокислий двозаміщений (K_2HPO_4)	0,5
магній сірчанокислий ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,5
лимонна кислота ($C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	2,0
харчова яблучна кислота ($C_4H_6O_5$)	1,0
цинк сірчанокислий ($ZnSO_4$)	0,1
амоній лимоннокислий двозаміщений ($C_6H_{14}O_7N_2$)	2,0
залізо сірчанокисле ($FeSO_4$)	0,05
гліцерин ($C_3H_8O_3$)	50,0
вода дистильована підігріта до температури 70 °C	до 1 л

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології і біотехнології, зокрема до засобів та способів виготовлення алергенів для діагностики туберкульозу тварин та птиці, а саме до живильних середовищ для накопичення бактеріальної маси мікобактерій, що є необхідною умовою та складовою частиною технологічного процесу виготовлення згаданих препаратів.

Існує чимало прописів синтетичних живильних середовищ для культивування мікобактерій, зокрема середовища Моделя, Сотона, "Синтетичне живильне середовище для культивування туберкуліногенних штамів мікобактерій" [Патент України № 55922 A від 15.04.2003 р., розробники: Кассіч Ю. Я. з співав.] та інші.

Найбільш близьким за суттю та результатами використання до запропонованого нами є середовище Сотона за класичним медичним прописом, яке має такий склад: аспарагін 4,0 г, лимонна кислота - 2 г, магній сірчанокислий - 0,5 г, калій фосфорнокислий двозаміщений - 0,5 г, залізо лимон-

нокисле аміачне (двовалентне (зелене) або тривалентне (коричневе) - 0,05 г, гліцерин - 60 мл, вода дистильована - 940 мл.

Недоліками всіх згаданих середовищ є повільній ріст на них збудників туберкульозу (первинний ріст референтних штамів відзначається через 10-21 добу) та висока собівартість.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити синтетичне живильне середовище для культивування мікобактерій, склад якого дозволить прискорити ріст мікобактерій туберкульозу та накопичення їх бактеріальної маси.

Поставлена задача вирішується шляхом заміни у складі середовища Сотона (класичний медичний пропис) заліза лимоннокислого аміачного двовалентного (зеленого) або тривалентного (коричневого) на залізо сірчанокисле ($FeSO_4$) та додавання амонію лимоннокислого двозаміщеного ($C_6H_{14}O_7N_2$), харчової яблучної кислоти та цинку сірчанокислого ($ZnSO_4$), при співвідношенні компонентів, що наведено у таблиці 1.

(19) U

(11) 63246

(19) UA

Таблиця 1

Склад та співвідношення компонентів живильного середовища Сотона-КФ для прискореного культивування мікобактерій

Склад компонентів	співвідношення компонентів у трьох варіантах дослідного середовища (мас. %)		
	варіант 1	варіант 2	варіант 3
L-аспартам (C ₄ H ₉ NO ₃ · H ₂ O)	3,0	4,0	5,0
Калій фосфорнокислий двозаміщений (K ₂ HPO ₄)	0,3	0,4	0,5
Магній сірчанокислий (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0,3	0,4	0,5
Лимонна кислота (C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O)	0,5	1,0	2,0
Харчова яблучна кислота	0,25	0,5	1,0
Залізо сірчанокисле (FeSO ₄)	0,01	0,02	0,05
Цинк сірчанокислий (ZnSO ₄)	0,05	0,08	0,1
Амоній лимоннокислий двозаміщений (C ₆ H ₁₄ O ₇ N ₂)	0,5	1,0	2,0
Гліцерин (C ₃ H ₈ O ₃)	30,0	40,0	50,0
Вода дистильзована, підігріта до температури 70 °C.	до 1 л	до 1 л	до 1 л
pH - 7,0±0,2 (доводили 10 % розчином аміаку)			

Дослідне живильне середовище готували таким чином. Наважки солей розчиняли у дистильзованій воді, в наведений в таблиці 1 послідовності, фільтрували, розливали у флакони по 200 мл. Стерилізували автоклавуванням при 110 °C 10 хв. або кип'ятінням впродовж 1 години, pH після стерилізації 6,9-7,2. Підлужували 25 % розчином водного аміаку.

Цинк сірчанокислий та лимонну кислоту і гліцерин, стерильно додавали після автоклавування.

Останнім додавали аспартам, який попередньо розчиняли в невеликій кількості дистильзованої води на водяній бані за температури 100 °C.

pH середовища доводили до 7,0±0,2. Середовище розливали у стерильні флакони ємністю 0,5 літру по 350-400 мл закривали стерильними ватними пробками і стерилізували. Для перевірки якості стерилізації колби з середовищем ставили в термостат на три доби при 37-38 °C. Середовище, на якому виявляли ріст неспецифічної мікрофлори, вібрали та знешкоджували автоклавуванням. Готове до використання живильне середовище зберігали у рефрижераторі при 4 °C 30 діб.

Випробовували три варіанти дослідного середовища з різними співвідношенні компонентів, наведеними у таблиці 1. Ростові властивості середовища визначали шляхом висіву збудника туберкульозу бичачого (штам Valle) та пташиного видів.

Культивування мікобактерій на синтетичному живильному середовищі проводили таким чином. На щільних живильних середовищах (Левештейн-Іенсена або живильному середовищі для культивування мікобактерій (ТУУ 46.15.063.95) вирощували культури збудника туберкульозу бичачого та пташиного видів за температури 37-38 °C. Кожною культурою мікобактерій засівали не менше 50 пробірок живильного середовища. Через 35-60 діб, в залежності від виду мікобактерій, відбирали пробірки з інтенсивним ростом культур, 5-10 % з них досліджували мікроскопічним методом. При цьому

мазки з культур фарбували за методом Ціля-Нільсена. При наявності бактеріального забруднення навіть в одній пробірці культивування починали знову з музеїчних культур, а одержану партію забруднених культур знищували.

Чисті культури першої генерації зберігали в холодильнику (15-20 пробірок), а з інших проводили пересів на середовище Павловського (гліцеринове картопляне середовище). На кожну культуру використовували не менше 25 пробірок середовища Павловського. Культивування проводили в терmostаті за температури 37-38 °C протягом 40-60 діб. Для подальшої роботи відбирали пробірки на яких культури мікобактерії дали інтенсивний ріст на картоплі та поверхні рідкої складової частини середовища Павловського у вигляді плівки. Контроль за якістю культивування проводили мікроскопією. Партию пробірок з чистими культурами кожного виду зберігали в холодильнику.

Пересів мікобактерій з середовища Павловського на середовище Сотона-КФ проводили таким чином. Фрагменти плівки з рідкої складової частини середовища Павловського за допомогою бактеріологічної петлі стерильно переносили на поверхню синтетичного середовища Сотона-КФ. В наших дослідах при переносі плівки мікобактерій з середовища Павловського на синтетичне середовище вона часто опускалася на дно флакону і не давала росту. Для запобігання цього були використані коркові диски або кільца товщиною 2,0 мм, які стерилізували разом з середовищем Сотона-КФ. При пересіві культур плівку мікобактерій з середовища Павловського наносили на поверхню пробкового диску або кільца на середовищі Сотона-КФ. Товщина диску або кільца дозволяє змочувати його поверхню середовищем, на якому культивуються мікобактерії. Ріст культури у вигляді плівки з пробкового кільца розповсюджувається на поверхню середовища Сотона-КФ. Після пересіву флакони з середовищем Сотона-КФ закривали ватно-марлевими пробками і зверху звязували поліетиленовою плівкою. Культивували посіви в

термостаті при 37-38 °C впродовж 6-8 тижнів. Чез 1-2 тижні після пересіву культур середовища перевіряли на чистоту росту мікобактерій візуально за характером росту та мікроскопічним методом. При рості у флаконах сторонньої мікрофлори середовище знищували. Флакони з характерним для даного виду ростом мікобактерій далі культивували в термостаті при 37-38 °C. Коли плівка мікобактерій покривала всю поверхню середовища культивування припиняли і одержаний продукт використовували для виготовлення туберкулопротеїну ППД-туберкуліну. Після закінчення терміну культивування мікобактерій флакони з культурами піддавали автоклавуванню при 1,5 атм. впродовж 20 хвилин.

Відділення бактеріальної маси мікобактерій від культуральної рідини проводили в умовах боксу центрифугуванням впродовж 20 хвилин при 3 тис. об./хв. Одержану бактеріальну масу відмивали стерильно дистильованою водою (рН 7,0-7,1), просушували на паперовому фільтрі та зважували.

Результати проведених досліджень наведені у таблиці 2.

Матеріали таблиці 2 свідчать про те, що ріст збудників туберкульозу на запропонованому середовищі починається раніше: бічачого виду на 2-4 доби, пташиного - на 3-5 діб, а накопичення бактеріальної маси на ньому більше, у порівнянні з контролем (Середовище Сотона - медичний проліс).

Кращі показники щодо термінів початку росту при висіві культур збудників туберкульозу бічачого та пташиного видів відзначали на живильному середовищі із співвідношенням компонентів "варіант 3" (початок росту при висіві культур у порівнянні з базовим середовищем раніше на 4 та 5 діб, відповідно, а вихід бактеріальної більше - на 7,9 та 16,4 мг, відповідно).

Тобто на середовищі із співвідношенням компонентів "варіант 3" інтенсивність росту і накопичення бактеріальної маси за період культивування була вищою: у мікобактерій бічачого виду на 7,9 мг, пташиного - на 16,4 мг, у порівнянні з базовим живильним середовищем (Середовище Сотона - медичний пропис).

Таким чином, новий склад компонентів синтетичного живильного середовища Сотона-КФ дозволяє підвищити ростові якості середовища, що пропонується за рахунок прискорення росту культур збудника туберкульозу й накопичення бактеріальної маси мікобактерій.

Таблиця 2

Результати дослідження ростових властивостей і синтетичних живильних середовищ

Показники	Живильне середовище 1							
	дослідне живильне середовище Сотона СБ для прискореного культивування мікобактерій							
	Дослід 1 (варіант середовища 1)		Дослід 2 (варіант середовища 2)		Дослід 3 (варіант середовища 3)		Середовище Сотона (медичний пропис)	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Поява первинного росту, дні	9,0	7,0	10,0	8,0	7,0	5,0	11,0	10,0
Поява суцільного росту у вигляді плівки на поверхні середовища, дні	18,0	13,0	19,0	14,0	13,0	12,0	21,0	24,0
Вихід бактеріальної маси на середовищі, мг	55,0	54,0	59,4	61,1	63,5	64,4	55,6	48,0

Примітка: I - штам *Valle*; II - штам *M. avium*.