



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58450 (13) U
(51) МПК (2011.01)
C12N 3/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОМАСИ *Bacillus anthracis* З ВИКОРИСТАННЯМ НАНОЧАСТИНОК
ЗОЛОТА

1

2

(21) u2010111927

(22) 08.10.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ГОЛОВКО АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ,
УШКАЛОВ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, МАЧУ-
СЬКИЙ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ, РЕЗНИЧЕНКО
ЛЮДМИЛА СЕРГІЙВНА, РОМАНЬКО МАРИНА ЄВ-
ГЕНІЙВНА, ДИБКОВА СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА,
БАБКІН МИХАЙЛО ВАЛЕРІЙОВИЧ(73) ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІН-
СТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ШТАМІВ МІКРООР-
ГАНІЗМІВ(57) Спосіб отримання біомаси *Bacillus anthracis* в
середовищах з використанням наночастинок золо-
та, який **відрізняється** тим, що за рахунок дода-
вання нанозолота в співвідношеннях від 1:8 до
1:10 з концентрацією золота 15 ± 5 - 30 ± 5 мкг/мл
підвищується рівень накопичення бактеріальної
маси сибіркового мікроба на 2-6 \log_2 , що дає мож-
ливість розмноження *Bacillus anthracis* до 10^{15} ко-
лоній утворюючих одиниць (КУО) в 1 см³ залежно
від поживного середовища, що було взято за ос-
нову, враховуючи, що в середовищах без дода-
вання частинок нанозолота рівень накопичення
сибіркового мікроба не більше ніж 10^9 КУО в 1 см³.

Передбачувана корисна модель відноситься до ветеринарії, а саме до ветеринарної мікробіології і біотехнології, зокрема до способів підвищення рівня накопичення бактеріальної маси *Bacillus anthracis* в порівнянні з загальноприйнятими способами. Даний спосіб може бути використаний при виготовленні будь-яких імунобіологічних засобів, що потребують використання біомаси *Bacillus anthracis*, в тому числі при виготовленні вакцини для імунопрофілактики сибірки тварин і людей.

Загальновідомим та широко вживаним є спосіб отримання біологічної маси *Bacillus anthracis* шляхом висіву та культивування в рідких живильних середовищах.

Існує «Спосіб виготовлення вакцини живої спорової проти сибірки тварин концентрованої» (Деклараційний патент України на корисну модель 46896, А61К 39/00, С12N 3/00, опубл. 11.01.2010, бюл.№1), що включає підготовку посівного матеріалу штаму, його культивування у рідкому живильному середовищі, яке містить джерело азоту, дріжджовий екстракт, з регуляцією в ньому рН і аерацією, як джерело азоту використовують пептон ферментативний і живильне середовище додатково містить: калій фосфорнокислий двозаміщений, кальцій хлористий, магній сірчаноокислий, цинк сірчаноокислий, мідь сірчаноокислу, залізо сірчаноокисле, амоній сірчаноокислий, антиспінувач.

Накопичення складає 110-140 млн., що дорівнює $1,1-1,4 \times 10^8$ колоній утворюючих одиниць (КУО). Також існує «Способ изготовления вакцины против сибирской язвы животных» (Авторское свидетельство СССР №980431, кл. С12N 3/00, 1981), спосіб включає одностадійне культивування вакцинного штаму в рідкому поживному середовищі, що містить 77-82% панкреатичного гідролізату казеїну та 18-23% дріжджового екстракту. Культивування проводять на протязі 41-48 годин при 30-33°. При цьому спостерігається накопичення мікроба сибірки 500-600 млн. в 1 см³, що дорівнює $5-6 \times 10^8$ КУО.

Найближчим аналогом корисної моделі, що реєструється, може бути «Питательная среда для накопления сибиреязвенного микроба» (патент Росії RU 2214453 C2, опубл. 20.10.2003), середовище містить в якості стимулятора росту вітамінний препарат «екд», в якості джерела азоту - поживний бульйон для культивування мікроорганізмів, для отримання ізотонічних властивостей середовища - динатрій фосфат та натрій вуглекислий ex tempore. Середовище містить інгібітори росту сторонньої мікрофлори (триметоприм та поліміксин М сульфат). Таке середовище має високу чутливість та ефект накопичення біомаси.

В основу корисної моделі, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб підвищення рівня накопичення бактеріальної маси сибіркового мікроба шляхом культивування *Bacillus anthracis* в

(13) U
(11) 58450
(19) UA

середовищах з наночастинками золота, котрі додаються в середовища в якості стимулятора росту. Присутність в поживному середовищі часток нанозолота стимулює розмноження мікробу сибірки. Так, в звичайних поживних середовищах *Bacillus anthracis* дає накопичення не більше ніж 10^9 колоній утворюючих одиниць (КУО) в 1 см^3 , при додаванні до середовища наночасток золота накопичення *Bacillus anthracis* підвищується і може досягати 10^{15} КУО в 1 см^3 в залежності від поживного середовища, що було взято за основу.

Приклад 1

Виготовлення поживного середовища

В якості джерела азоту використовують будь-яке рідке поживне середовище, що підходить для культивування й накопичення біомаси *Bacillus anthracis*. До середовища додають наночастинки

золота в співвідношенні 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 та 1:20. Стерилізацію проводять автоклавуванням при 0,7 атм. Після автоклавування ємності з середовищем витримують при 37°C протягом 48 годин для перевірки на стерильність. За основу ми використовували комерційне стандартизоване середовище бульйон з гідролізату рибного борошна та бульйон Хоттінгера (рН=7,2-7,6; аміний азот 100-120 мг%).

Приклад 2

Засівання рідкого поживного середовища з частками нанозолота культурою *Bacillus anthracis*

Після перевірки на стерильність в ємності з середовищем засівають по 1 см культури *Bacillus anthracis* з відомою концентрацією та залишають для культивування при 37°C протягом 20-24 годин.

Таблиця 1

Результати накопичення біомаси *Bacillus anthracis* в середовищі з частинками нанозолота

№ п/п	Розведення	Концентрація частинок нанозолота							прототипне середовище
		1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:20	
1.	10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+
5.	10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	+
6.	10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	+
7.	10^{-7}	+	+	+	+	+	+	+	+
8.	10^{-8}	+	+	+	+	+	+	+	+
9.	10^{-9}		+	+	+	+	+	+	+
10.	10^{-10}	-	-	-	+	+	-	-	-
11.	10^{-11}	-	-	-	+	+	-	-	-
12.	10^{-12}	-	-	-	-	+	-	-	-
13.	10^{-13}	-	-	-	-	+	-	-	-
14.	10^{-14}	-	-	-	-	+	-	-	-
15.	10^{-15}	-	-	-	-	+	-	-	-
16.	10^{-16}	-	-	-	-	-	-	-	-

+ - спостерігається ріст *Bacillus anthracis*

- - відсутній ріст будь-якої мікрофлори

прототипне середовище - середовище без частинок нанозолота

Приклад 3

Визначення КУО *Bacillus anthracis* після інкубації в рідкому поживному середовищі з частками нанозолота

Після інкубації *Bacillus anthracis* в рідкому поживному середовищі з частками нанозолота відбирають 1 см^3 поживного середовища та визначають КУО шляхом десятичних граничних розведень до 10^{-15} . Після серійних розведень пробірки зали-

шають для інкубації при 37°C протягом 20-24 годин (Таблиця 1).

Даний спосіб знайде широке використання в біотехнологічній промисловості де необхідне використання біомаси сибірського мікробу, таке як виготовлення вакцин проти сибірки, виготовлення сибіркових антигенів, діагностичних наборів, протисибіркових, гіперімунних та преципітуючих сироваток тощо.