



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **41971** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
C12N 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СЕРЕДОВИЩЕ ПОЖИВНЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКОПЛАЗМ ТА АХОЛЕПЛАЗМ

1

(21) u200809276

(22) 16.07.2008

(24) 25.06.2009

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) УШКАЛОВ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, АНДРУЩЕНКО ВІТАЛІЙ ВІКТОРОВИЧ, ТИНДИК ВОЛОДИМИР СЕРГІЙОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Середовище поживне для культивування мікоплазм і ахолеплазм, що містить панкреатичний гідролізат рибного борошна, сухий дріжджовий

2

екстракт, L-аргінін моногідрохлорид, натрій бікарбонат, глюкозу, агар мікробіологічний, яке **відрізняється** тим, що додатково містить феноловий червоний водорозчинний при наступному співвідношенні компонентів, г/ дм<sup>3</sup> дистильованої води: панкреатичний гідролізат рибного борошна 18,0 сухий дріжджовий екстракт 5,0 глюкоза 1,0 L-аргінін моногідрохлорид 0,1 натрій бікарбонат 0,8 феноловий червоний водорозчинний 0,015 агар мікробіологічний 11,2.

Поживні середовища - біологічні препарати, що використовуються для культивування мікроорганізмів. Середовища необхідні для накопичення, виділення і зберігання мікроорганізмів, а також з метою отримання чистих культур та вивчення їх культуральних, біохімічних, антигенних властивостей, чутливості до антибактеріальних препаратів, або виготовлення біопрепаратів.

Поживні середовища широко використовуються в лабораторній практиці при діагностичних дослідженнях інфекційних захворювань, а також для визначення бактеріальної і грибної контамінації лікарських засобів.

Присутність живих мікроорганізмів визначають використовуючи загальноприйнятий метод інкубування досліджуваного зразку на класичних поживних середовищах таких як МПБ, МПА, ТГС і ін.. [Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибної контамінації. ДСТУ 4483]. Разом з тим, деякі мікроорганізми, зокрема мікоплазми, не культивуються на класичних поживних середовищах. Для їх культивування необхідно виготовляти спеціальні поживні середовища які містять повноцінний білок, вітаміни, нуклеїнові кислоти, холестерин і його похідні. Тому, до складу поживних середовищ ставляться жорсткі умови щодо бактеріологічного контролю якості їх ростових властивостей. [Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення контамінації мікоплазмами. ДСТУ 4613].

В наш час існують середовища такі як Едварда, ВІЕВ, УЩЦЕВ, Хайфлика та комерційні поживні

середовища для культивування мікоплазм під час виготовлення яких використовують дорожчокоштуючу, здебільшого не стандартизовану сировину тваринного походження.

Актуальним залишається питання виготовлення вітчизняного поживного середовища з сертифікованої сировини, легкого в приготуванні, яке б забезпечувало ріст мікоплазм та ахолеплазм.

Згідно вимог Європейської фармакопеї поживне середовище для культивування мікоплазм повинно забезпечувати ріст тест-культур мікоплазм за умови їх висівання в концентрації 10-100 КУО. Для бактеріологічного контролю якості поживних середовищ згідно рекомендацій Європейської Фармакопеї використовують наступні тест-культури: *Mycoplasma orale* ATCC 23714, *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206, *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610, *Mycoplasma synoviae* ATCC 25204, *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 17981 та *Mycoplasma arginini* G 230.

Прототипом об'єкту, що заявляється, може бути середовище «Мікоплаза-агар», що призначене для виділення і культивування мікоплазм, яке розроблено ФГУП НПО «Питательные среды» (Махачкала). До його складу входять наступні компоненти: бульйон поживний сухий, еритрит, тіраміна бромід, аргінін, цистин, екстракт кормових дріжджів, натрію карбонат, глюкоза та агар мікробіологічний.

Недоліком цього середовища є низька здатність накопичувати достатню кількість бактеріальної маси мікоплазм, та неможливість візуально

(13) **U**  
(11) **41971**  
(19) **UA**

виявляти ріст тих видів мікоплазм, що ростуть на рідкому культуральному середовищі без опалесценції та помутніння.

Середовище поживне, що пропонується, виготовляється з сертифікованої сировини і забезпечує ріст мікоплазм та ахолеплазм. Окрім того, переваги запропонованого середовища в тому, що воно швидко готується, складається з невеликої кількості сертифікованих компонентів та містить в своєму складі реверсний індикатор феноловий червоний водорозчинний. Завдяки індикатору середовище набуває червоно-рожевого кольору.

Мікоплазми розподіляються на дві групи одна з яких ферментує глюкозу, в результаті чого рН середовища зміщується в кислу сторону і колір середовища змінюється на жовтий. Інша група мікоплазм гідролізує аргінін в результаті чого рН середовища зміщується в лужну сторону і колір середовища змінюється на малиновий. Цей факт дає змогу візуально за короткий термін дослідження виявляти ріст даних мікроорганізмів і зокрема тих видів, ріст яких візуально без індикатора виявити не можливо.

Складовими цього середовища (г/дм<sup>3</sup>) є:

панкреатичний гідролізат рибного борошна	18,0
глюкоза	1,0
L- аргініну моногідрохлорид	0,1
сухий дріжджовий екстракт	5,0
натрію бікарбонат	0,8
феноловий червоний водорозчинний	0,015

При виготовленні напіврідкого та щільного поживного середовища додають агар мікробіологічний відповідно 3,0 г/л і 11,2 г/л.

Під час виготовлення поживного середовища для культивування мікоплазм та ахолеплазм передбачає по чергове додавання та розчинення всіх компонентів в дистильованій воді, кип'ятіння протягом 1,5-2 хвилин і фільтрування через ватний фільтр у скляні флакони. Стерилізують поживне середовище в автоклаві за температури 115 °С протягом 30 хвилин. Кінцева концентрація аміноного азоту поживного середовища повинна становити 120-140 мг %, рН - 7,4-8,0. Перед використанням до поживного середовища додають 20 % сироватки крові коня нормальної інактивованої для бактеріологічних поживних середовищ, що обумовлює його достатню поживність для культивування мікоплазм. Напіврідке та щільне поживне середовище спочатку розплавляють на водяній бані, а після його охолодження до температури 45-56 °С в стерильних умовах додають 20 % сироватки крові коня нормальної інактивованої для бактеріологічних поживних середовищ. Якщо середовище використовують для ізоляції мікоплазм та ахолеплазм із патологічного матеріалу, то одночасно з сироваткою крові коня у флакон з середови-

щем додають пеніцилін 10000 ОД/см<sup>3</sup> і 1 %- вий розчин ацетату талія 10см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>.

#### Приклад 1

У пробірці та на чашки Петрі із запропонованим поживним середовищем висівали по 0,25 см<sup>3</sup> (10-100 КУО) суспензії тест-культур *Mycoplasma orale* ATCC 23714, *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206, *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610, *Mycoplasma synoviae* ATCC 25204, *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 17981 та *Mycoplasma arginini* G 230. Поживне середовище до виконання дослідів мало рожевий колір. В якості контролю залишали незасіяні пробірки з рідким, напіврідким та чашку Петрі з щільним поживним середовищем. Інкубували дослідні і контрольні пробірки і чашки Петрі в термостаті за температури 37°C.

Через 24-72 год інкубації в пробірках з рідким і напіврідким поживним середовищем засіяних тест-культурами *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206 *Mycoplasma synoviae* ATCC 25204, *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 17981 і *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610 спостерігали зміну кольору поживного середовища з рожевого на жовтий. В пробірках з культурами *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206 та *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610 окрім того відмічали його помутніння. В пробірках з напіврідким середовищем по ходу уколу спостерігали утворення димчастої доріжки. На чашках Петрі спостерігали формування дрібних характерних колоній у вигляді не збитого «зажареного яйця» та зміну кольору поживного середовища з рожевого на жовтий на місці формування колоній. Контрольні пробірки та чашка Петрі з поживним середовищем залишились без змін його кольору.

Через 24-48 год інкубації в пробірках з рідким і напіврідким поживним середовищем засіяних тест-культурами *Mycoplasma orale* ATCC 23714 і *Mycoplasma arginini* G 230 відмічали зміну кольору поживного середовища з рожевого на яскраво-малиновий. В пробірках з напіврідким середовищем по ходу уколу спостерігали утворення димчастої доріжки. На чашках Петрі спостерігали формування дрібних характерних колоній у вигляді «соски» та зміну кольору поживного середовища з рожевого на яскраво-малиновий на місці формування колоній. Контрольні пробірки та чашка Петрі з поживним середовищем залишились без змін його кольору.

Середовище поживне для культивування мікоплазм та ахолеплазм може знайти застосування в лабораторіях ветеринарної медицини при діагностичних дослідженнях, а також на біологічних підприємствах, які виготовляють імунобіологічні препарати та для контролю якості біологічних препаратів за показником «Контамінація мікоплазмами».