



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 45999

(13) C2

(51) 6 C 12N1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СИНТЕТИЧНЕ ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКОБАКТЕРІЙ

1

2

(21) 97084135

(22) 06 08 1997

(24) 15 05 2002

(46) 15 05 2002, Бюл. № 5, 2002 р.

(72) Кассіч Юрій Якович, Бабкін Валерій Федорович, Завгородній Андрій Іванович, Ніконенко Павло Володимирович

(73) Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини

(56)

(57) Синтетичне живильне середовище для культивування мікобактерій, що містить калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокислий семиводний, натрій лимоннокислий, залізо лимоннокисле аміачне, гліцерин і дистильовану воду, яке

відрізняється тим, що воно додатково містить амоній щавелевокислий і стимулятор росту мікобактерій - натрій янтарнокислий, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %

Амоній щавелевокислий	0,3-0,5
Калій фосфорнокислий двозаміщений	0,4-0,8
Магній сірчанокислий семиводний	0,04-0,06
Натрій лимоннокислий	0,04-0,06
Залізо лимоннокисле аміачне	0,002-0,004
Натрій янтарнокислий	0,001-0,005
Гліцерин	3,0-4,0
Вода дистильована pH - 7,0-7,2	решта

Передбачений винахід відноситься до ветеринарної мікробіології для виготовлення живильних середовищ з метою культивування збудників туберкульозу та атипичних мікобактерій і може використовуватися з ветеринарної медицини та біологічної промисловості для вирощування і накопичення бактерійної маси мікобактерій.

Відоме синтетичне живильне середовище Курської біофабрики для вирощування збудника туберкульозу бичачого виду, яке містить Л-аспарагін, амоній лимоннокислий двозаміщений, калій фосфорно - кислий двозаміщений, магній сірчанокислим, залізо сірчанокисле закисне, гліцерин, лимонну кислоту, сірчанокислий цинк (Автореферат дис. А. А. Звєглевського на здобуття док. вет. наук, 1990 р.).

Розроблено також живильне середовище для вирощування мікобактерії туберкульозу, що містить калій фосфорнокислий однозаміщений, натрій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокислий, залізо лимоннокисле аміачне, Л-аспарагін, гліцерин, твін-80, сироваточний бичачий альбумін, ДЛ-метионін, натрій лимоннокислий (А. с. № 1473313, С12N1/20).

Найбільш близьким не технічною суттю до заявляемого об'єкту є синтетичне живильне середовище Сотона, яке використовують у біологічній промисловості для вирощування збудника тубер-

кульозу бичачого виду, до складу якого входить Л-аспарагін, лимонна кислота, магній сірчанокислий, калій фосфорнокислий двозаміщений, залізо лимоннокисле аміачне, гліцерин.

Недоліком цього середовища є висока собівартість пов'язана з тим, що до складу його сходять Л-аспарагін, який промисловість України не виготовляє.

Крім того, на цьому середовищі не в усіх випадках пишно виростають культури мікобактерій в першій генерації.

Задачею передбаченого винаходу є вишукування компонентів для синтетичного живильного середовища, що готує вітчизняна промисловість для вилучення з її складу імпортного Л-аспарагину, підвищення його елективності і зменшення собівартості.

Вирішення цієї задачі знайдено шляхом вилучення Л-аспарагину та зведенням до складу синтетичного живильного середовища - амонія щавелевокислого і натрія янтарнокислого при такому співвідношенні компонентів мас. %

Амоній щавелевокислий	0,3 - 0,5
Калій фосфорнокислий двозаміщений	0,4 - 0,8
Магній сірчанокислий семиводний	0,04 - 0,06
Натрій лимоннокислий	0,04 - 0,06

(13) C2

(11) 45999

(19) UA

Залізо лимоннокисле аміачне	0,002 - 0,004
Натрій янтарнокислий	0,001 - 0,003
Гліцерин	3,0 - 4,0
Вода дистильована	100см <sup>3</sup>
pH - 7,0 - 7,2	

Аналіз відомих синтетичних живильних середовищ для дорощування мікобактерій показав, що солі амонія щавлевокислого і натрія янтарнокислого використовують і в інших відомих середовищах. Однак використання їх в цих середовищах разом з іншими компонентами не забезпечувало тих властивостей, які вони виявляють в заявляемому рішенні, а саме поліпшення ростових властивостей живильного середовища при виключенні із середовища компонента Л-аспарагіна.

Порівняння заявленого живильного середовища з прототипом свідчить про те, що заявлений склад синтетичного живильного середовища відрізняється від відомого виключенням Л-аспарагіну та введенням до його складу нових компонентів, а саме - солі амонія щавлевокислого, натрія янтарнокислого.

Таким чином, цей склад компонентів надає живильному середовищу високі ростові властивості та забезпечує більше накопичення бактерійної маси.

Синтетичне живильне середовище виготовляють так в колбу ємністю один літр наливають 100см<sup>3</sup> дистильованої води, яку підігрівають до 40 - 45°C. В указаній послідовності в ній розчиняють такі компоненти (мг) залізо лимоннокисле аміачне - 0,002 - 0,004, амоній щавлевокислий - 0,3 - 0,5, калій фосфорнокислий двозаміщений - 0,4 - 0,8, магній сірчанокислий семиводний - 0,04 - 0,08, натрій лимоннокислий - 0,04 - 0,03, натрій янтарнокислий - 0,001 - 0,003, гліцерин - 4,0 - 4,0. Після розчинення компонентів розчин (змістимо колби) охолоджують до кімнатної температури і 25% розчином аміаку доводять pH до 7,0 - 7,2.

Виготовлене живильне середовище фільтрують через паперовий фільтр, стерилізують в автоклаві при 120°C протягом 20 хвилин і зберігають при температурі 4°C не більше 30 діб. Перед висівом культур мікобактерій на живильне середовище його перевіряють на стерильність шляхом витримання в термостаті при 37 - 38°C протягом трьох діб.

Вихід бактерійної маси на вивчаємому елективному живильному середовищі і середовищі Сотона в мг сухої речовини (CP)

Штам мікобактерій	Кількість бак маси з мг (CP)			
	Визначає середовище, що містить компоненти			Середовище Сотона
	Приклад № 1	Приклад № 2	Приклад № 3	
Шт М бовінус-8	191	242	228	225
Шт М бовіс / епізотична культура	220	240	220	230
шт Н <sub>37</sub> RV	229	249	238	241
шт М авіум-780	2320	255	233	232
шт М скрофуляцеум	242	253	249	248
шт М фортуітум	280	329	318	325

З матеріалів таблиці видно, що при вирощуванні культур мікобактерій на вивчаємому

В колбі з стерильним живильним середовищем роздільно висівають бактеріологічною петлею (3 - 5 бак петлі) плівку культур збудника туберкульозу і атипівих мікобактерій, які вирости на живильному середовищі Павловського Колби з посівами закривають ватно - марлевими пробками, які накривають целофаном або пергаментною бумагою і розміщують в термостаті при температурі 37,5 - 38,0°C. За посівами ведуть спостереження протягом 60 діб.

Приклад № 1 Живильне середовище готують як вказано вище, при такому співвідношенні компонентів, мас %

Амоній щавелевокислий	0,3
Калій фосфорнокислий двозаміщений	0,4
Магній сірчанокислий семиводний	0,04
Натрій лимоннокислий	0,04
Залізо лимоннокисле аміачне	0,02
Натрій янтарнокислий	0,001
Гліцерин	3,0
Вода дистильована	решта
pH - 7,0 - 7,2	

Приклад № 2 Теж, що і в прикладі № 1 при слідує чому співвідношенні компонентів, мас %

Амоній щавелевокислий	0,4
Калій щавелевокислий двозаміщений	0,6
Калій сірчанокислий семиводний	0,05
Натрій лимоннокислий	0,05
Залізо лимоннокисле аміачне	0,003
Натрій янтарнокислий	0,003
Гліцерин	3,5
Вода дистильована	решта
pH 7,0 - 7,2	

Приклад № 3 Теж, що і в прикладі № 1 та № 2 при слідує чому співвідношенні компонентів мас %

Амоній щавелевокислий	0,5
Калій фосфорнокислий двозаміщений	0,8
Магній сірчанокислий семиводний	0,06
Натрій лимоннокислий	0,06
Залізо лимоннокисле аміачне	0,003
Натрій янтарнокислий	0,003
Гліцерин	4,0
Вода дистильована	решта
pH 7,0 - 7,2	

Елективні властивості синтетичного живильного середовища визначають через 60 діб після висіву культур мікобактерій по виходу сухої бактерійної маси.

середовищі із щавлевокислим амонієм і натрієм янтарнокислим при мінімальному співвідношенні

компонентів (Приклад № 1), вихід бактеріальної маси у шт М бовінус-8 був 191мг, епізоотичної культури мікобактерій бичачого виду - 220, шт Н<sub>37</sub> RV- 229, шт М авіум - 230, шт М скрофуляцеум - 242, шт М фортутум - 280мг СР. При оптимальному співвідношенні компонентів в живильному середовищі (Приклад № 2) накопичення бактерійної маси становило у шт М бовінус-8 - 242мг, епізоотичної культури М бовіс - 240, шт Н<sub>37</sub> RV - 249, шт М авіум - 255, шт М скрофуляцеум - 253, шт М фортутум - 329мг СР.

При вирощуванні культур мікобактерій на середовищі до склад якого входило максимальне співвідношення компонентів (Приклад № 3) накопичення бактерійної маси становило у шт М бовінус-8 - 228мг, епізоотичної культури М бовіс - 230, шт Н<sub>37</sub> RV - 238, шт М авіум - 233, шт М скрофуляцеум - 249, шт М фортутум - 318 мг СР.

При вирощуванні цих культур мікобактерій на живильному середовищі Сотона (прототип),

кількість бактерійної маси становила у шт М бовінус-8 - 225мг, епізоотичної культури М бовіс - 230, шт Н<sub>37</sub> RV – 241, шт М авіум - 230, шт М скрофуляцеум - 248, шт М фортутум - 325 мг СР.

Результати проведених досліджень свідчать про те, що при вирощуванні культур мікобактерій на розробленому синтетичному живильному середовищі з щавлевокислим амонієм і натрієм янтарнокислим при оптимальному вмісті компонентів вихід сухої бактерійної маси був більше у збудника туберкульозу бичачого виду на 10 - 17мг, людського - 8мг, пташиного - 32мг і атипівих мікобактерій - на 15 - 16мг СР в порівнянні з прототипом /середовище Сотона/

Крім нього, запропоноване рідке синтетичне живильне середовище має високі ефективні (ростові) властивості, в 15 разів дешевше відомого і не потребує для його виготовлення закордонних компонентів

---

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сім'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

---

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71