



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60423 (13) U  
(51) МПК (2011.01)  
C12N 1/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ M.PARATUBERCULOSIS

1

2

(21) u2010111061

(22) 14.09.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) ЗАВГОРОДНІЙ АНДРІЙ ІВАНОВИЧ, ПОЗМО-  
ГОВА СВІТЛАНА АРКАДІЇВНА, КАЛАШНИК НАТА-  
ЛІЯ ВАСИЛІВНА(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-  
ТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕ-  
РИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"(57) Живильне середовище для культивування  
M.paratuberculosis, що містить L-аспарагін, калій  
фосфорнокислий 1-заміщений, сульфат магнію,  
гліцерин, малахітовий зелений та дистильовану  
воду, яке **відрізняється** тим, що додатково міс-  
тить нікотинову кислоту, лимонну кислоту, лимон-  
нокисле аміачне залізо, піруват натрію, картопля-ний екстракт - як фактори росту, та агар Діфко, при  
наступному співвідношенні компонентів г/л:

L-аспарагін	1,0-3,0
калій фосфорнокислий 1- заміщений	0,2-0,3
сульфат магнію	0,2-0,3
гліцерин	30,0-30,0
малахітовий зелений 2 % вод- ний розчин	0,5-1,0
лимонна кислота	0,5-1,5
лимоннокисле аміачне залізо	0,02-0,03
піруват натрію	0,4-0,6
нікотинова кислота	0,005-0,02
картопляний екстракт	
агар Діфко	
вода дистильована pH 5,5-6,0	до 1000,0.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології для виготовлення живильних середовищ з метою культивування збудника паратуберкульозу і може використовуватися в ветеринарній, гуманній медицині та біологічній промисловості для культивування референтних та епізоотичних штамів M.paratuberculosis.

Культивувати збудник паратуберкульозу дуже складно із-за його залежності від мікобактину та тривалого часу появи перших видимих колоній. Всі готові живильні середовища для культивування збудника паратуберкульозу імпортовані виробництва в своєму складі містять мусобактін J, який вітчизняна промисловість не випускає.

Для вирощування збудника паратуберкульозу існує стандартизоване живильне середовище Herrold, яке містить пептон, хлорид натрію, м'ясний екстракт, гліцерин, піруват натрію, агар, мусобактін J та яєчні жовтки (Merkal R.S. Diagnostic methods for the detection of paratuberculosis (Johnes disease). In. Proceedings of the 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the US Animal Health Association, 620-623, 1970). Недоліком цього середовища є його непрозорість, що ускладнює раннє виявлення колоній, а також недостатньо інтенсивний ріст.

У ветеринарній практиці використовують казеїнове живильне середовище Дюбо-Сміта в моди-

фікації А.П.Алікаєвої, в склад якого входять: L-аспарагін, натрій фосфорнокислий 2-заміщений, калій фосфорнокислий 1-заміщений, сульфат магнію, хлористий кальцій, сульфат цинку, сульфат міді, лимоннокисле амонійне залізо, гідролізат казеїну, агар Діфко, спиртовий екстракт мікобактерій тимофєєвої трави по Сміту, інактивована сироватка великої рогатої худоби (Справочник «Лабораторные исследования в ветеринарии», М. - 1986, С. 90-92). Недоліком цього середовища є достатньо складна рецептура та технологія виготовлення.

Найбільш близьким до об'єкту, що заявляється є середовище Левенштейна-Іенсена, до складу якого входить L-аспарагін, калій фосфорнокислий 1-заміщений, цитрат натрію, сульфат магнію, гліцерин, мусобактін J, яєчна маса, малахітовий зелений, вода дистильована. (Jorgesen J.B. An improved medium for the culture of M.paratuberculosis from faeces. Acta Vet. Scad., 23. 325-335, 1982). Це рішення може бути прототипом. Недоліком середовища є його невисокі ростові властивості.

Аналіз відомих стандартизованих імпортованих та інших живильних середовищ для культивування M.paratuberculosis показав, незалежно від складу хімічних компонентів в середовища обов'язково входять мусобактін J, а також такі органічні речо-

(13) U  
(11) 60423  
(19) UA

вини природного походження, як курячі яйця, м'ясний екстракт, сироватка великої рогатої худоби або гідролізат казеїну, вилучення цих компонентів не забезпечує ростових властивостей середовища.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити живильне середовище для культивування *M.paratuberculosis*, що містить L-аспарагін, калій фосфорнокислий 1-заміщений, сульфат магнію, гліцерин, малахітовий зелений та дистильовану воду шляхом вилучення імпортованого мусобастін J, яєчної маси та додаткового введення нікотинової кислоти, лимонної кислоти, лимоннокислого аміачного заліза, пірувату натрію, картопляного екстракту - як факторів росту та агару Діфко, при наступному співвідношенні компонентів г/л:

L-аспарагін	1,0 - 3,0
Калій фосфорнокислий 1 - замінений	0,2-0,3
Сульфат магнію	0,2-0,3
Гліцерин	29,0-31,0
Малахітовий зелений 2 % водний розчин	0,5- 1,0
Лимонна кислота	0,5- 1,5
Лимоннокисле аміачне залізо	0,02 - 0,03
Піруват натрію	0,4- 0,6
Нікотинова кислота	0,005 - 0,02
Картопляний екстракт	495,0-510,0
Агар Діфко	25,0- 35,0
Вода дистильована pH 5,5-6,0	до 1000,0.

Порівняльний аналіз запропонованого живильного середовища з прототипом дозволяє зробити висновок, що заявлений склад живильного середовища відрізняється введенням до його складу нових компонентів, які надають живильному середовищу високі ростові властивості, дозволяють раніше виявити ріст колоній та забезпечують більше накопичення бактеріальної маси, що відповідає критерію «новизна». Живильне середовище готують таким чином:

В колбу ємністю один літр наливають 400,0 см<sup>3</sup> дистильованої води, підігрівають до 40-45 °С. Указаній послідовності у воді розчиняють такі компоненти: (г) лимоннокисле аміачне залізо, L-аспарагін, калій фосфорнокислий 1-заміщений, сульфат магнію, лимонну кислоту, піруват натрію, нікотинову кислоту, гліцерин, агар Діфко. Об'єм суміші доводять дистильованою водою до 500,0 см<sup>3</sup>, додають рівну кількість стерильного картопляного екстракту (500,0 см<sup>3</sup>) та 2 % водного розчину малахітового зеленого. Охолоджують до кімнатної температури і 5 % розчином NaOH доводять pH до 5,5 - 6,0. Розливають в бактеріологічні пробірки по 5 см<sup>3</sup> і закривають ватно-марлевими пробками. Після чого середовище стерилізують за температури 120 °С протягом 15 хвилин. Виготовлене середовище викладають на скошені штативи, охолоджують до застигання агару і зберігають за температури 4 °С не більше 10 діб. Перед висівом тест-культури *M.paratuberculosis* на живильне середовище його перевіряють на стерильність шляхом витримування в термостаті за температури (37,5±0,5) °С протягом трьох діб.

Приклад № 1. Живильне середовище готують як вказано вище, при наступному співвідношенні компонентів г/л.

L-аспарагін	1,0
Калій фосфорнокислий 1-замінений	0,2
Сульфат магнію	0,2
Лимонна кислота	0,5
Лимоннокисле аміачне залізо	0,02
Піруват натрію	0,4
Нікотинова кислота	0,005
Картопляний екстракт	495,0
Агар Діфко	25,0
Малахітовий зелений 2% водний розчин	0,5
Вода дистильована pH 5,5-6,0	до 1000,0.

Приклад № 2. Теж, що і в прикладі № 1 при наступному співвідношенні компонентів г/л.

L-аспарагін	2,0
Калійфосфорнокислий 1 - замінений	0,25
Сульфат магнію	0,25
Лимонна кислота	1,0
Лимоннокисле аміачне залізо	0,025
Піруватнатрію	0,5
Гліцерин	30,0
Нікотинова кислота	0,01
Картопляний екстракт	500,0
Агар Діфко	30,0
Малахітовий зелений 2 % водний розчин	0,9
Вода дистильована pH 5,5-6,0	до 1000,0.

Приклад № 3. Теж, що і в прикладі № 1 та № 2 при наступному співвідношенні компонентів г/л.

L-аспарагін	3,0
Калій фосфорнокислий 1 - замінений	0,3
Сульфатмагнію	0,3
Лимонна кислота	1,5
Лимоннокисле аміачне залізо	0,03
Піруват натрію	0,6
Гліцерин	31,0
Нікотинова кислота	0,02
Картопляний екстракт	510,0
АгарДіфко	35,0
Малахітовий зелений 2% водний розчин	1,0
Вода дистильована pH 5,5-6,0	до 1000,0.

Елективні властивості живильного середовища визначають за часом появи перших колоній, швидкості та інтенсивності росту. Швидкість (доб.) та інтенсивність (+) росту *M.paratuberculosis* на середовищі, що заявляється і середовищі Левенштейна-Ієнсена з мікобактерієм наведені в таблиці.

Примітка: - росту колоній немає; + - від 1 до 10 колоній; ++ - від 10 до 20 колоній; +++ - від 20 до 50 колоній; ++++ - ріст по всій поверхні середовища.

З матеріалів таблиці видно, що на запропонованому середовищі з оптимальним (приклад № 2) та максимальним (приклад №3) вмістом компонентів ріст перших колоній *M.paratuberculosis* спостерігали на 15 добу. Колоній на середовищах (прикладі № 2 і № 3) було не багато (від 1 до 3), однак на 30 добу вони розросталися по поверхні

середовища у вигляді великих, зморщених, бугристих колоній, що забезпечує велике накопичення бактеріальної маси.

На середовищі з мінімальних вмістом компонентів (приклад №1) та на середовищі Левенштейна-Ієнсена з мікобактином ріст перших одиничних колоній спостерігали на 20 добу. На 30 добу на середовищі (приклад №1) ріст *M.paratuberculosis* був не стабільним, колонії були малі та дрібні. На середовищі Левенштейна-

Ієнсена з мікобактином на 30 добу колонії розрослися по поверхні середовища, однак були дрібними у вигляді зморщеного нальоту.

Таким чином, запропоноване живильне середовище (приклад №2) є оптимальним для культивування субкультур *M.paratuberculosis*, має високі елективні ростові властивості, його виготовлення не потребує імпортного мусобactin J, інших дорогих біологічних компонентів.

Таблиця

Живильне середовище для культивування *M.paratuberculosis*

Запропоноване середовище						Середовище	
Приклад №1 (min)		Приклад №2 (optim)		Приклад №3 (max)		Левенштейна-Ієнсена	
Шв.(доб.) росту	Інт-ть росту (+)	Шв.(доб.) росту	Інт-ть росту (+)	Шв.(доб.) росту	Інт-ть росту (+)	Шв.(доб.) росту	Інт-ть росту (+)
15	-	15	+	15	+	15	
20	+	20	+++	20	++	20	+
30	++	30	++++	30	+++	30	+++