



УКРАЇНА

(19) UA (11) 91133 (13) C2
(51) МПК (2009)
C12N 1/20
A61K 39/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ ЗБУДНИКА БЕШИХИ СВИНЕЙ
ERYSIPELOTHRIX RHUSIPATHIE

1

(21) a200813010

(22) 10.11.2008

(24) 25.06.2010

(46) 25.06.2010, Бюл. № 12, 2010 р.

(72) РЯБУШКО ВІТАЛІЙ ІВАНОВИЧ, ПАРХОМЕНКО НАТАЛІЯ АДOLFІВНА, ЄРОХІН ВЛАДИСЛАВ ЄВСТАФІЙОВИЧ, ГОЛУБ МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, КОЛЕСНИКОВА КАТЕРИНА ЮРІЇВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРИВ ІМ. О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA 10833 U, 15.11.05.

RU 2089609 C1, 10.09.97.

UA 34711 U, 26.08.08.

Крутченский Г. В., Кулясова В. Е. К вопросу получения белковых гидролизатов из моллюска леды //Известия ТИПРО. - 1976. - 99. - С.102-104.

UA 69001 A, 16.08.04.

UA 31080 U, 23.03.08.

UA U 22110 U, 10.04.07.

Rowell H.C. A cultural and biochemical study of strains of Erysipelothrix rhusiopathie with special

2

reference to the carrier pig. Canadien Journal of Comparative Medicine, 1958, V/XXII, N3, P.82-86.

Harrington R., Hulse D.C. Comparison of two plating media for the isolation of Erysipelothrix rhusiopathie from enrichment broth culture. Applied Microbiology, 1971, V.22, N 1, P.141-142.

(57) Поживне середовище для культивування штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie*, до складу якого входять пептон ферментативний, калій фосфорнокислий, натрій фосфорнокислий, а також гідролізат з морської сировини, яке відрізняється тим, що як джерело азотного живлення використовують суміш рибного автолізу та лужного мідійного гідролізату при наступному співвідношенні компонентів:

лужний мідійний гідролізат	20-50 %
пептон ферментативний	1 %
калій фосфорнокислий	0,3 %
натрій фосфорнокислий	1,8 %
рибний автолізат	решта.

Передбачуваний винахід відноситься до загальної біотехнології та ветеринарної мікробіології і може бути використаний для готування мікробіологічних поживних середовищ для нарощування біомаси штаму збудника бешихи свиней.

Збудник бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* є культурою, вимогливою до умов живлення. При активації штаму після тривалого зберігання велике значення має швидкість нарощування біомаси. Як правило, для наукових і комерційних цілей застосовують традиційні поживні середовища на основі м'ясної сировини. М'ясопептонний бульйон (МПБ) і м'ясопептонний агар (МПА) з переварення Хоттінгера забезпечують хороший ріст мікроорганізмів без зміни їх культуральних і біологічних властивостей. Гідролізати кільки і рибного борошна також широко застосовуються при виробництві сухих поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, оскільки

білки риби за своєю будовою та амінокислотному складу найбільш подібні до білків м'яса і здатні задовольнити потреби мікроорганізмів в органічних сполуках азоту. Проте, пошук високоякісних і недорогих поживних середовищ є актуальним завданням.

Відомий Штам бактерій *Erysipelothrix rhusiopathie* M2-ВК для виготовлення інактивованої вакцини проти бешихи свиней [див. Пат. №10833 U, Україна, C12N1/20, A61K39/02]. Як поживне середовище використовують МПБ Хоттінгера. Відомо, що м'ясні середовища мають недоліки, обумовлені їхньою нестандартністю, низьким коефіцієнтом використання продукту, тривалістю виготовлення, також необхідністю додавання до них інших інгредієнтів: пептону, печінкових та дріжджових екстрактів, глюкози, сироватки крові тощо.

Відоме Поживне середовище для вирощуван-

(13) C2

(11) 91133

(19) UA

ня мікроорганізмів [див. П. №2089609, А, С12N1/20, RU], що містить джерело азотного живлення, хлористий натрій, агар. Як джерело азоту використовують панкреатичний гідролізат кормового рибного борошна із вмістом амінного азоту $4,4\pm 0,2\%$, загального азоту $12\pm 0,5\%$. Істотним недоліком є те, що цей гідролізат має високу вартість через необхідність ввезення із-за кордону.

Найбільш близьким за сукупністю ознак до заявленого винаходу є Поживне середовище "Аквamedia" для культивування мікроорганізмів [див. Пат. №34711 U, С12N1/20, UA], в якому поживною основою є суміш лужного гідролізату з моллюсків з кислотним гідролізатом з рибної сировини у співвідношенні 3:1-1:3. Кінцева концентрація вмісту амінного азоту складає 60-120мг%. До складу середовища також входять глюкоза або мальтоза, пептон та агар. Недоліком відомого середовища є недостатня для культивування штаму збудника бешихи свиней кінцева концентрація вмісту амінного азоту.

Ознаками, що є спільними з суттєвими ознаками винаходу Поживне середовище для культивування штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie*, є такі, що до складу середовища входять пептон ферментативний, а та-

кож лужний гідролізат з морської сировини.

В основу винаходу поставлена задача шляхом використання продуктів морського ґенезу сконструювати поживне середовище, яке забезпечить ріст штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* для готування ефективної вакцини.

Поставлене завдання досягається тим, що для культивування вакцинного штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* готують поживне середовище, що складається з рибного автолізу, в який додатково вводять 20-50% лужного мідійного гідролізату.

Мідійний гідролізат і автолізат кільки отримують відповідно до відомих технологій [див. Крутченский Г.В., Кулясова В.Е. К вопросу получения белковых гидролизатов из моллюска леды // Известия ТИНРО. - 1976. - 99. - С.102-104; Лихварь Н.А. Сухие питательные среды из свежих и замороженных отходов рыбной промышленности. Ученые записки ДагНИВИ по производству питательных сред. - Махачкала, 1956, 2.].

Автори досліджували рівень формування біомаси промислового штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* №286 на різних середовищах (Табл. 1).

Таблиця 1

Оцінка інтенсивності росту промислового штаму збудника бешихи свиней *E. rhusiopathie* №286 (за 5-бальною шкалою)

Поживні середовища	Інтенсивність росту в залежності від форми середовища		
	тверда	рідка	напіврідка
М'ясопептонний агар Хоттінгера (еталон)	5	5	2
Гідролізат №1 кільки лужний	3	0	1
Гідролізат №2 кільки лужний	4	2	2
Гідролізат кільки кислотний	4	1	2
Автолізат кільки	3	1	2
Мідійний гідролізат	3	3	2

Як видно з Табл. 1, культура проявляла на всіх середовищах, крім еталонного, невисоку інтенсивність росту, що свідчить про її вимогливість до умов живлення. На деяких середовищах до того ж відзначали поліморфізм паличок збудника бешихи свиней: з'являлися подовжені ланцюжки *E. rhusiopathie*, що є ознакою несприятливих умов культивування, зокрема із-за незбалансованого елементів живлення.

Надалі досліджували середовища, які крім гідролізату кільки містили гідролізат мідій в об'ємі від 0 до 50% (Табл. 2). Культивували штаму за стандартними температурними умовами протягом 48 годин. Оптичну щільність вимірювали на фотоелектрокалориметрі при довжині хвилі 545nm і товщині кювети 5мм. Контрольним зразком при вимірюванні було незасіяне середовище такого ж складу.

Таблиця 2

Залежність рівня накопичення біомаси бактерій *E. rhusiopathie* від вмісту мідійного гідролізату в поживному середовищі

Поживне середовище	Оптична щільність суспензії мікробних клітин залежно від змісту мідійного гідролізату			
	0%	20%	30%	50%
Комерційний гідролізат кільки + мідійний гідролізат +1% глюкози (еталон)	0,081±0,001	0,163±0,002	0,180±0,01	0,233±0,01
Автолізат кільки власного виготовлення + мідійний гідролізат (дослід)	0,063±0,007	0,130±0,005	0,155±0,01	0,238±0,001
Різниця % до еталону	-22	-20	-14	-2

HCP₀₅=0,006

Як видно з Табл. 2, додавання в поживне середовище мідійного гідролізату в кількості 20% від об'єму забезпечувало подвоєння біомаси як в еталонному середовищі (0,163 проти 0,081), так і в досліді (0,130 проти 0,063), а внесення 50% мідійного гідролізату в середовище потроювало приріст. При цьому різниця між дослідним і еталонним середовищами, незважаючи на відсутність в дослідному середовищі глюкози, із збільшенням вмісту мідійного гідролізату поступово зменшувалась.

Завдяки високому вмісту амінного азоту (показник поживності середовищ для вирощування мікроорганізмів) гідролізат з морепродуктів є цінною сировиною для біотехнологічних виробництв. Автолізат рибний містить в 4-10 разів більше амінного азоту, ніж необхідно для продуктивного росту промислових штамів. Мідійний гідролізат при вмісті в середовищі 20%, подвоює бактерійну масу. Таким чином поєднання рибного автолізату і лужного мідійного гідролізату дозволяє одержувати збалансоване поживне середовище для культивування збудника бешихи свиней.

Приклад реалізації способу

Виготовляли дослідну серію вакцини проти бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* №286 в об'ємі 3дм³. Попередньо визначили, що рН рибного гідролізату складав 6,0, а вміст амінного азоту - 740мг%. У мідійному гідролізаті рН складав 7,7, а вміст амінного азоту - 247мг%. З цих компонентів готували рідкі та тверді поживні середовища за стандартним прописом для МПБ. У склад середовища для культивування промислового штаму на пропонованому поживному середовищі входила суміш рибного автолізату і 20% за об'ємом лужного мідійного гідролізату, пептон ферментативний - 1% до загального об'єму, калій фосфорнокислий - 0,3%, натрій фосфорнокислий - 1,8%, рН середовища становив 7,3-7,4. Штам висівали в пробірки з рідким середовищем, потім пересівали у флакони з таким самим середовищем і культивували у відповідних умовах. По закінченні культивування ви-

значали типовість та чистоту культури мікроскопією мазків з середовищ та встановлювали концентрацію мікробних клітин.

Культура промислового штаму збудника бешихи свиней, що отримана на середовищах з гідролізатів, у порівнянні із середовищами, отриманими з м'ясної сировини, не відрізнялись за культурно-морфологічними властивостями і відповідала вимогам паспортних даних на штам. Концентрація мікробних клітин у 1см³ повинна скласти не нижче 50млн. Авторами отримані наступні дані: на поживних середовищах з морепродуктів концентрація мікробних клітин складала 50млн., а на середовищах, виготовлених з переварення Хоттінгера - 70млн.

Інактивацію мікробних культур проводили з використанням формальдегіду в концентрації 0,4%. Перевірку повноти інактивації проводили шляхом посівів одержаної вакцини на поживні середовища, мікроскопією пофарбованих за Грамом мазків. Контроль на нешкідливість вакцини проводили на 5 білих мишах масою 18-20г, вводячи їм внутрішньочеревно по 0,3см³. Спостереження за тваринами терміном 16 діб показали, що вакцина є нешкідлива: піддослідні тварини залишалися живими, нормально харчувалися, змін у поведінці не відмічено.

Контроль імуногенної активності проводили на тихий же білих мишах після щеплення вакциною. Мишей заражали контрольним штамом збудника бешихи свиней у смертельній дозі. Всі контрольні миші (10 голів), що не були щеплені, загинули впродовж 4-6 діб, всі вакциновані вижили протягом 10 діб. Виходячи з результатів цих досліджень, зроблено висновок, що виготовлена вакцина є імуногенно-активною.

Таким чином, поживне середовище з використанням продуктів морського ґенезу, що сконструйовано, забезпечує ріст штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie*, придатного для готування ефективної вакцини.