



УКРАЇНА

(19) UA (11) 28293 (13) U  
(51) МПК (2006)  
C12N 1/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКОБАКТЕРІЙ

1

2

(21) u200703306

(22) 27.03.2007

(24) 10.12.2007

(72) ТКАЧЕНКО ОЛЕКСІЙ АНДРІЙОВИЧ, UA,  
КУЛІШЕНКО ОЛЕГ МИКОЛАЙОВИЧ, UA(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ  
АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, UA

(56)

(57) Живильне середовище для культивування мікобактерій, яке складається з живильного середовища Мордовського, яке містить калій фосфорнокислий однозаміщений, натрій лимоннокислий, магній сірчанокислий, глікокол, гліцерин, воду дистильовану, жовткову масу та розчин малахітового зеленого 2 %, яке

відрізняється тим, що додатково містить 0,125 % розчин гідрогумату (ТУ 205 УССР-614-88) при такому співвідношенні компонентів:

калій фосфорнокислий	1000 мг
однозаміщений	
натрій лимоннокислий	1000 мг
магній сірчанокислий	1000 мг
глікокол	4000 мг
гліцерин	70 мл
розчин гідрогумату 0,125 %	100 мл
вода дистильована	до 1000 мл
жовткова маса	1000 мл
водний розчин малахітового	30-50 мл.
зеленого 2 %	

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології і може бути використана для покращення якості бактеріологічної діагностики туберкульозу тварин.

Відомо, що на сухому живильному середовищі для культивування мікобактерій "ДП Ветеринарна медицина рН 7,1 м. Харків" (ТУ У 24.6-00497087-006-2004), яке у своєму складі містить мінеральні солі, глікокол, гліцерин, воду дистильовану, яєчну масу, водний розчин малахітового зеленого 2%, мікобактерії штаму *M.bovis* ростуть на 30-32 день, що досить уповільнює виділення культури мікобактерій з патологічного матеріалу та постановку кінцевого діагнозу на туберкульоз. (Туберкулёз животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский и др; Под ред. Ю.Я. Кассича. // -К.: Урожай, 1990. -340с.).

Відомо, що на середовищі Мордовського, яке у своєму складі містить мінеральні солі, глікокол, гліцерин, воду дистильовану, жовткову масу, водний розчин малахітового зеленого 2%, мікобактерії штаму *M.bovis* ростуть на 25-28 день. (Туберкулёз сельскохозяйственных животных / Под ред. В.П. Шишкова, В.П. Урбана. - М.: Агропромиздат, 1991. -255с.).

Відомо, що препарати гумінової природи посилюють ріст, розвиток та розмноження окремих видів мікроорганізмів, а ступінь стимуляції може бути достатньо високим в залежності від дози

препарату, живильного середовища та умов навколишнього середовища. (Effect of humates on microbial activity. Huck, T.A.; Porter, N.; Bushel, M. E. J.Gen. Microbiol.,1991; Vol.137; Issue 10; Pages 2321-2329. ).

З літературних джерел відома їх антиоксидантна дія, здатність до хелатоутворення та пришвидшення окисного фосфорилування, посилення клітинного дихання та активності ферментативних систем. Дослідженнями мембранної активності гідрогумату і можливості його переносу через мембрани рослинних клітин встановлено, що він не проникає в клітину, а здійснює пряму мембранотропну дію. За дії препарату відбувається перебудова мембрани, що обумовлює зміни в ланцюзі метаболічних реакцій. (Нове середовище для виділення та культивування мікобактерій. Р.А. Нуратінов, З.К. Казіахмедов. Проблеми туберкульозу та хвороб легенів. -2004, №6; -С.34-37 ). Відома також антимікробна дія гумінових речовин у відношенні мікроорганізмів виду *C. albican*, *Ent. cloacae*, *Prot. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *Str. pyogenes*, *S. epidermidis*. (Humate induced activation of human granulocytes. Riede, U.N.; Zeck-Kapp, G.; Freudenberg, N.; Keller, H.U.; Seubert, B. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1991; Vol. 60; Issue 1; Pages 27-34.).

(13) U  
28293  
(11) UA  
(19) UA

Гідрогумат (ТУ 205 УССР-614-88) - це розчин натрієвих солей гумусових кислот, які отримують шляхом кислотно-лужної екстракції низинного осокового, дерев'янистого та тростинового торфу із ступенем розкладення не менше 20%, зольністю не більше 20%. Препарат не леткий, стійкий, містить не менше 10% сухих речовин.

Найбільш близьким за біологічним рішенням до передбачуваної корисної моделі є середовище Мордовського яке при застосуванні його у діагностиці туберкульозу, не завжди дає очікуваний результат, а встановлення кінцевого діагнозу на туберкульоз утруднюється через повільний ріст мікобактерій на ньому.

Задачею корисної моделі є удосконалення живильного для культивування мікобактерій шляхом додавання в живильне середовище Мордовського 0,125% розчину гідрогумату для стимуляції росту мікобактерій.

Поставлена задача досягається тим, що в середовище Мордовського, яке містить в своєму складі калій фосфорнокислий однозаміщений, натрій лимоннокислий, магній сірчанокислий, глікокол, гліцерин, воду дистильовану, жовткову масу та водний розчин малахітового зеленого 2%, додають 0,125% розчин гідрогумату, для стимуляції росту мікобактерій, при такому співвідношенні компонентів:

калій фосфорнокислий	
однозаміщений	1000мг
натрій лимоннокислий	1000мг
магній сірчанокислий	1000мг
Глікокол	4000мг
Гліцерин	70мл
вода дистильована	до 1000мл
жовточна маса	1000мл
водний розчин малахітового	
зеленого 2%	30-50мл
розчин гідрогумату 0,125%	100мл

#### Приклад 1

Готують стандартне середовище Мордовського в об'ємі 200мл та послідовні розведення гідрогумату по 2мл в концентрації 0,25%; 0,125%; 0,06%; 0,03%; 0,015%; 0,008%; 0,004%; 0,002%; 0,001%. Додають в кожні чотири пробірки по 0,5мл кожного розведення гідрогумату та розливають в пробірки середовище Мордовського по 5мл. Отримують 36 пробірок з розведеннями гідрогумату та 4 пробірки з стандартним середовищем Мордовського в якості контролю. Далі пробірки з розведеннями поміщують в сушильну шафу та коагулюють за температури +90°C.

Потім готують завесь *M. bovis* штаму «Шахтар», 1мг культури на 1см<sup>3</sup> фізіологічного розчину і засівають отримане середовище. Далі посіви поміщують в термостат для культивування за температури +37°C з наступним обліком початку росту протягом 90 днів. Кожного дня перші 10 днів і через 5 днів наступні 80 днів згідно настанови по діагностиці туберкульозу тварин. (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. - Київ, 1994. -39с).

Показники інтенсивності росту *M. bovis* на передбачуваному винаході наведено в таблиці 1.

Інтенсивності росту *M. bovis* на середовищі Мордовського з доданою концентрацією

Концентрація гідрогумату в середовищі Мордовського	Термін появи перших колоній (Дні)	Середня кількість колоній у 4-х пробірках на 10 <sup>-й</sup> день після початку росту
0,25%	13	7,0±2,27
0,125%	13	8,5±2,10
0,06%	16	6,5±2,02
0,03%	17	3,75±0,85
0,015%	21	3,75±1,03
0,008%	24	2,07±0,40
0,004%	23	2,25±0,25
0,002%	22	2,25±0,52
0,001%	27	1,75±0,47
*	32	3,0±0,40

\* Контроль стандартне середовище Мордовського

#### Приклад 2.

Готують стандартне середовище Мордовського в об'ємі 200мл та послідовні розведення гідрогумату по 2мл в концентрації 0,25%; 0,125%; 0,06%; 0,03%; 0,015%; 0,008%; 0,004%; 0,002%; 0,001%. Додають в кожні чотири пробірки по 0,5мл кожного розведення гідрогумату та розливають в пробірки середовище Мордовського по 5мл. Отримують 36 пробірок з розведеннями гідрогумату та 4 пробірки з стандартним середовищем Мордовського в якості контролю. Далі пробірки з розведеннями поміщують в сушильну шафу та коагулюють за температури +90°C. Потім готують завесь штаму швидкорослих атипичних мікобактерій №1, 1мг культури на 10см<sup>3</sup> фізіологічного розчину і засівають отримане середовище. Далі посіви поміщують в термостат для культивування за температури +37°C з наступним обліком початку росту протягом 90 днів. Кожного дня перші 10 днів і через 5 днів наступні 80 днів згідно настанови по діагностиці туберкульозу тварин. (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. - Київ, 1994.-39с).

Показники інтенсивності росту швидкорослих атипичних мікобактерій №1 на передбачуваному винаході наведено в таблиці 2.

Показники інтенсивності росту швидкорослих атипичних

Концентрація гідрогумату в середовищі Мордовського	Термін появи перших колоній (дні)	Середня кількість колоній у 4-х пробірках на 1-й день після початку росту	Середня кількість колоній у 4-х пробірках на 5-й день після початку росту	M
0,25%	5	2±0,70	17,25±2,65	R

0,125%	5	7±1,08	38,2±	*Контроль стандартне середовище Мордовського
0,06%	5	3±0,90	33,5±6,23	R-форма, дрібні, жовтуватого кольору
0,03%	5	4,25±1,37	21,5±4,09	Аналіз результатів дослідження інтенсивності
0,015%	5	2,75±0,85	14,0±0,41	мікобактерій, дрібні, жовтуватого кольору
0,008%	5	1,5±0,28	21,5±8,05	у до складу середовища Мордовського
0,004%	6	1,75±0,75	18,75±10,52	залежно від концентрації гідрогумату показав, що
0,002%	6	1,25±0,25	19,5±6,93	найбільша інтенсивність росту спостерігається на
0,001%	6	1,25±0,25	18,75±8,1	середовищі з концентрацією 0,125%, воно
*	7	2±0,7	24,5±1,35	ефективніше в 1,5-2 рази у порівнянні зі
				стандартними середовищами.

\* Контроль стандартне середовище Мордовського

#### Приклад 3

Готують стандартне середовище Мордовського в об'ємі 200мл та послідовні розведення гідрогумату по 2мл в концентрації 0,25%; 0,125%; 0,06%; 0,03%; 0,015%; 0,008%; 0,004%; 0,002%; 0,001%. Додають в кожні чотири пробірки по 0,5мл кожного розведення гідрогумату та розливають в пробірки середовище Мордовського по 5мл. Отримують 36 пробірок з розведеннями гідрогумату та 4 пробірки з стандартним середовищем Мордовського в якості контролю. Далі пробірки з розведеннями поміщують в сушильну шафу та коагулюють за температури +90°C. Потім готують завись штаму швидкорослих атипичних мікобактерій №2, 1мг культури на 10см<sup>3</sup> фізіологічного розчину і засівають отримане середовище. Далі посіви поміщують в термостат для культивування за температури +37°C з наступним обліком початку росту протягом 90 днів. Кожного дня перші 10 днів і через 5 днів наступні 80 днів згідно настанови по діагностиці туберкульозу тварин. (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М.Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. -Київ, 1994.-39с.).

Показники інтенсивності росту швидкорослих атипичних мікобактерій №2 на передбачуваному винаході наведено в таблиці 3.

#### Приклад 4

Готують удосконалене живильне середовище Мордовського з додаванням 0,125% гідрогумату та два стандартні живильні середовища, що використовують в умовах бактеріологічних відділів ветеринарних лабораторій: Мордовського та сухе живильне середовище для культивування мікобактерій «ДП Ветеринарна медицина рН 7,1 м. Харків» (ТУ У 24.6-00497087-006-2004).

Далі проводять обробку проб патологічного матеріалу доставленого з господарств неблагополучних по туберкульозу за методом Алікаєвої згідно настанови по діагностиці туберкульозу (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. - Київ, 1994.-39с.).

Потім проводять паралельний висів суспензії патологічного матеріалу одночасно на три вищезгадані середовища по сім пробірок кожного для кожної проби. Посіви поміщують в термостат і культивують за температури +37°C з наступним обліком початку росту протягом 90 днів, згідно настанови по діагностиці туберкульозу, кожний день перші 10 днів і через 5 днів протягом наступних 80 днів. Таким чином оброблюють 8 проб патологічного матеріалу.

Показники інтенсивності росту мікобактерій, з проб патологічного матеріалу, на середовищі Мордовського, сухому живильному середовищі для культивування мікобактерій «ДП Ветеринарна медицина 7,1 м. Харків» (ТУ У 24.6-00497087-006-2004) та удосконаленому середовищі Мордовського з додаванням 0,125% розчину гідрогумату наведено в таблиці 4.

Показники інтенсивності росту швидкорослих атипичних мікобактерій №2 на передбачуваному винаході наведено в таблиці 3.

Концентрація гідрогумату в середовищі Мордовського	Термін появи перших колоній (дні)	Середня кількість колоній у 4-х пробірках на 1-й день після початку росту	Сер. кількість у 4-х пробірках на 5-й день після початку росту	Показники росту культури мікобактерій на різних середовищах		
				Кількість проб	Живильне середовище	Поява перших колоній змін (дні)
0,25%	4	23±6,28	36,75±	5 (з патологічними зміними)	Мордовського	15,75±2,09
					ДП«Ветеринарна медицина»	18,0±2,44
					Мордовського (удоск.)	12,5±0,64
0,125%	4	25±0,27	39,2	3 (без патологічних змін)	Мордовського	6±0
0,06%	4	15,25±1,93	34,7		ДП«Ветеринарна медицина»	6,5±0,5
0,03%	4	9,5±1,32	28±		Мордовського(удоск.)	5±0
0,015%	4	22,25±4,19	28,7	S-форма, дрібні, матового кольору	Аналіз результатів дослідження інтенсивності росту мікобактерій на удосконаленому середовищі Мордовського та сухим живильним середовищем Мордовського	
0,008%	4	15±1,22	25,75			
0,004%	5	11±1,47	23±2,34			
0,002%	5	12,25±8,35	17,73±5,7	S-форма, дрібні, матового кольору	Аналіз результатів дослідження інтенсивності росту мікобактерій на удосконаленому середовищі Мордовського та сухим живильним середовищем Мордовського	
0,001%	5	15,25±6,15	26±12,6			
*	5	3,25±1,31	16,5±			

для культивування мікобактерій «ДП Ветеринарна медицина 7,1 м. Харків» (ТУ У 24.6-00497087-006-2004 показав, що найбільша інтенсивність росту спостерігається на удосконаленому середовищі Мордовського з додаванням 0,125% розчину гідрогумату. Показник появи перших колоній склав відповідно  $12,5 \pm 0,64$  та  $6,0 \pm 0$  в пробах зі змінами та без змін, а середній показник кількості колоній на 10 день після початку росту склав відповідно  $24,5 \pm 9,4$  та  $27,5 \pm 17,25$ , що в 1,3-2 рази перевищує показники інтенсивності росту на середовищі Мордовського та сухого живильного середовища для культивування мікобактерій «ДП Ветеринарна медицина 7,1 м. Харків» (ТУ У 24.6-00497087- 006-2004). Ефект пришвидшення інтенсивності росту колоній мікобактерій на удосконаленому середовищі може бути використаний окрім лабораторій ветеринарної медицини і в біологічній промисловості, зокрема при виготовленні ППД-туберкуліну.