



УКРАЇНА

(19) UA (11) 34711 (13) U

(51) МПК (2006)

C12N 1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ "АКВАМЕДІА" ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

1

2

(21) u200800653

(22) 21.01.2008

(24) 26.08.2008

(46) 26.08.2008, Бюл.№ 16, 2008 р.

(72) ЄРЕМЕЄВ ВАЛЕРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, UA,
РЯБУШКО ВІТАЛІЙ ІВАНОВИЧ, UA, ГОЛУБ МИ-
КОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, UA, ЄРОХІН ВЛАДИСЛАВ
ЄВСТАФІЙОВИЧ, UA, ПАРХОМЕНКО НАТАЛІЯ
АДОЛЬФІВНА, UA, КИСЕЛЬОВА ТЕТЯНА ФЕДО-
РІВНА, UA, СКРИПНИК ВАЛЕРІЙ ГРИГОРОВИЧ,
UA(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРІВ ІМ.
О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, UA, ТО-
ВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІС-
ТЮ "МЕРІКОН", UA(57) 1. Поживне середовище для культивування
мікроорганізмів, що містить поживну основу, вуг-
леводи і воду дистильовану, яке **відрізняється**
тим, що рідке, тверде та напіврідке середовища як
поживну основу містять суміш лужного гідролізату
з моллюсків з кислотним гідролізатом з рибної си-
ровини у співвідношенні 3:1-1:3 з кінцевою концен-
трацією необхідного вмісту амінного азоту 60-
120мг %, як вуглеводи містять глюкозу або маль-
тозу, а також пептон, агар, при наступному спів-
відношенні компонентів, г/л:

поживна основа (суміш лужного гідро- лізату з моллюсків з кислотним гідролі- затом з рибної сировини у співвідно- шенні 3:1-1:3) з кінцевою концентрацією необхідного вмісту амінного азоту 60-120мг %	0,6-1,2
глюкоза або мальтоза	30-50
пептон	8-12
агар	3-20
вода дистильована	решта.

2. Поживне середовище для культивування мікро-
організмів за п. 1, яке **відрізняється** тим, що рідке
поживне середовище для культивування бактерій
містить поживну основу з кінцевою концентрацією
необхідного вмісту амінного азоту 100-120мг % та
пептон.3. Поживне середовище для культивування мікро-
організмів за п. 1, яке **відрізняється** тим, що рідке
поживне середовище для культивування грибів
містить поживну основу з кінцевою концентрацією
необхідного вмісту амінного азоту 60-80мг % та
глюкозу або мальтозу.4. Поживне середовище для культивування мікро-
організмів за пп. 2, 3, яке **відрізняється** тим, що
тверде поживне середовище містить агар у кілько-
сті 13-20г/л.5. Поживне середовище для культивування мікро-
організмів за пп. 2, 3, яке **відрізняється** тим, що у
напіврідкому поживному середовищі вміст агару
складає 3-7г/л.

Корисна модель відноситься до біотехнології і
може бути використана в медичній і технічній мік-
робиології, у науково-дослідній і практичній роботі
для культивування мікроорганізмів.

Для культивування мікроорганізмів використо-
вують поживні середовища на основі м'ясних пеп-
тонів, які, в основному, готують з високоякісного
м'яса. Гідролізати з морепродуктів, наприклад гід-
ролізати з рибної сировини, відносяться до альте-
ративних джерел сировини, що не використовую-
ють важливі для людини продукти харчування.
Виходячи з цього, проблема пошуку субстратів із
сировини морського генеза, придатних для виго-

товлення мікробіологічних поживних середовищ, є
актуальною, а ефективні рішення цієї проблеми
набувають використання для біотехнологічного
виробництва вакцин, сироваток й ін. медичних і
ветеринарних препаратів.

Відома "Питательная среда "Автофизат" для
культивирования микроорганизмов" [див. патент
RU №2001101, МПК C12N1/20, публікація 15.10.93,
Бюл. №37-38]. Вона містить поживну основу, вуг-
леводи і водну основу. Як поживну основу викорис-
товують гідролізат внутрішніх органів промисло-
вих риб, а також лактозу, натрій хлористий і агар
при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

(13) U

(11) 34711

(19) UA

гідролізат внутрішніх органів	
промислових риб з кінцевою кон- центрацією амінного азоту 100- 140мг%	20,0-25,0
лактоза	9,5-10,0
натрій хлористий	4,5-5,0
агар	0,65-0,70
вода дистильована	інше

Недоліком відомого середовища є те, що при його виготовленні використовують тільки нехарчові відходи рибальських промислів, що обмежує сировинну базу. Крім того відомо, що рибні гідролізати недостатньо збалансовані по ряду поживних елементів, наприклад, амінокислотам.

В основу корисної моделі "Поживне середовище "Аквамедіа" для культивування мікроорганізмів" поставлено задачу шляхом розширення сировинної бази забезпечити користувачів економічним та ефективним середовищем для культивування мікроорганізмів.

Поставлена задача вирішується тим, що "Поживне середовище "Аквамедіа" для культивування мікроорганізмів" містить поживну основу, вуглеводи і воду. Як поживну основу використовують суміш лужного гідролізату з моллюсків з кислотним гідролізатом з рибної сировини у співвідношенні 3:1-1:3. Така поживна основа містить аміний азот не менш 600мг %, і може бути розведена водою до вмісту амінного азоту в поживному середовищі, необхідного для культивування тих або інших груп мікроорганізмів наприклад, до 60-120мг %.

Поживне середовище "Аквамедіа" для культивування мікроорганізмів готують при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

Поживна основа з кінцевою кон- центрацією необхідного вмісту амінного азоту, наприклад, 60- 120мг %	0,6-1,2
Глюкоза або мальтоза	30-50
Вода	інше
Поживне середовище "Аквамедіа" для культи- вування мікроорганізмів характеризується тим, що:	
додатково містить пептон у кіль- кості	8-12г/л;
додатково містить агар у кількос- ті	13-20г/л.

Поживна основа для середовища "Аквамедіа" готується із сировини морського генеза. Спосіб отримання поживної основи для мікробіологічних середовищ [див. матеріали заявки на корисна модель №а200713086 від 26.11.2007р. «Спосіб отримання поживної основи мікробіологічних середовищ»] включає здрібнювання рибної сировини, готування гомогенату рибної сировини для гідролізу шляхом розведення здрібненої рибної сировини водою, гідроліз гомогенату рибної сировини при нагріванні, прогрівання гідролізату з рибної сировини і відділення неразгідролізованих білків. При цьому гідроліз гомогенату рибної сировини здійснюють у кислотному середовищі й отриманий кислотний гідролізат змішують з виготовленим лужним гідролізатом з моллюсків у співвідношенні 3:1-1:3 об'єму лужного гідролізату з моллюсків до кислотного гідролізату з рибної сировини. При готуванні кислотного гідролізату з рибної сировини до

гомогенату рибної сировини додають 18-20% розчин соляної кислоти до рН 4,5-5,0, після чого гомогенат рибної сировини нагрівають до 45-50°C протягом 22-26 годин. Потім додають концентровану ортофосфорну кислоту до залишкової концентрації кислоти на рівні 2% і здійснюють прогрівання гомогенату рибної сировини при 100°C протягом 22-26 годин. Гідролізат з рибної сировини нейтралізують додаванням 40% розчину їдкого натру до рН 6,8-7,4. При готуванні лужного гідролізату з моллюсків до здрібненої сировини з моллюсків додають 1,0% розчин їдкого натру в співвідношенні 1:1, після чого здійснюють гідроліз при 80°C протягом 20-24 годин. Потім гідролізат з моллюсків нейтралізують додаванням концентрованої соляної кислоти до рН 6,8-7,4. Основа поживних середовищ містить аміний азот у готовому продукті не менш 600мг %, і може бути розведена водою, наприклад, до вмісту амінного азоту в живильному до середовищі 60-120мг %. Це забезпечить утримання хлориду натрію в готовому середовищі на рівні, що не буде перевищувати 0,5%, що відповідає складові м'ясопептонів, рекомендованих для культивування великої кількості видів бактерій.

Нашими дослідженнями встановлено, що для досягнення оптимальної якості середовища необхідно:

- введення в поживне середовище культивування мікроорганізмів як поживної основи суміші лужного гідролізату з моллюсків з кислотним гідролізатом з рибної сировини в співвідношенні 3:1-1:3 доцільно в кількості 0,6-1,2г/л;
- введення в поживне середовище культивування мікроорганізмів таких вуглеводів, як глюкози або мальтоза доцільно в кількості 30-50г/л;
- додаткове введення в поживне середовище культивування мікроорганізмів пептону в кількості в межах 8-12г/л доцільно при виготовленні рідкого поживного середовища бактерій;
- додаткове введення в поживне середовище культивування мікроорганізмів агару в кількості в межах 13-20г/л. доцільно при виготовленні твердого поживного для середовища бактерій і грибів.

Випробування ростових властивостей зразків рідких, твердих і напіврідких поживних середовищ "Аквамедіа" проводили згідно з ДСТУ 4483-2005. Спочатку готували зразки середовищ (рідкого, твердого, напіврідкого для бактерій і грибів) за рецептами 1-4, потім на них висівали тест-культури згідно з Таблицею 1.

Рецепт 1. Рідке поживне середовище для бактерій.

Готували з поживної основи (суміш лужного гідролізату з моллюсків з кислотним гідролізатом з рибної сировини у співвідношенні 3:1-1:3) без розведення або після розведення водопровідною водою до вмісту амінного азоту 100-120мг %. До 1дм³ рідини додавали 10г пептону ферментативного, якщо необхідно доводили рН середовища до 7,2-7,4 1%-им розчином гідроксиду натрію і стерилізували 20 хвилин при температурі 120°C, після чого в асептичних умовах додавали готовий стерильний (або стерилізований 20 хвилин при температурі 112°C) розчин глюкози медичної до вмісту її в середовищі 0,5% за сухою речовиною.

Рецепт 2. Рідке поживне середовище для грибів.

До 1дм³ поживної основи (суміш лужного гідролізату з молюсків з кислотним гідролізатом з рибної сировини у співвідношенні 3:1-1:3), аміний азот якої доводили розведенням дистильованою водою до 60-80мг %, додавали 40г глюкози медичної або мальтози, встановлювали рН 5,8±0,2 додаванням 1-2%-го розчину соляної кислоти, розливали у стерильні пробірки і стерилізували 30 хвилин при температурі 110°C

Рецепт 3. Тверде поживне середовище.

Для бактерій і грибів готували так саме, як відповідні рідкі поживні середовища, але з додаванням на кожний їх літр 13-20г агару мікробіологічного (у залежності від марки агару).

Рецепт 4 Середовище напіврідке.

Для бактерій готували так саме, як за рецептом 1; для грибів відповідно, як за рецептом 3, але перед додаванням глюкози або мальтози на кожний літр рідини додавали від 3г до 7г агару, розливали по 10см³ у пробірки, після чого стерилізували 20 хвилин при температурі 120°C.

Таблиця 1

Штами тест-культур для визначення ростових властивостей поживного середовища "Аквамедіа" для культивування мікроорганізмів

Види мікроорганізмів	Штами	Розведення, висівання з яких повинно дати ріст не менше, як у двох з трьох засіяних пробірок	Середовища, що їх тестують	Температура інкубації, °C
Бактерії: <i>Alcaligenes faecalis</i>	ДНКІБШМ №415	10 ⁻⁷	Напіврідке (ТГС)	30-35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, ДНКІБШМ 27/29	10 ⁻⁵	Тверде (МПА)	30-35
<i>Corynebacterium xerosis</i>	ДНКІБШМ №1911	10 ⁻⁶	Рідке (МПБ)	30-35
Гриб: <i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, ATCC 2091 ATCC 885-653	10 ⁻⁵	Напіврідке (ТГС), тверде і рідке для грибів	20-25

Культури бактерій і гриба, що вирости на скошеному твердому середовищі (рецепт 3) протягом 18-20 годин, а гриб *Candida albicans* - 24-48 годин за температурних умов, що зазначені в Таблиці 1, змивали стерильним ізотонічним розчином (0,85% розчином хлористого натрію) і їм же доводили мутність суспензії мікробних клітин до 10 одиниць за оптичним стандартом.

Отриману суспензію розводили ізотонічним розчином загальновідомим способом у співвідношенні 1:10 за виключенням наступного за першим розведенням. Це (умовно друге) розведення готували з'єднанням однакових об'ємів (наприклад, по 4,5см³) мікробної суспензії з розведення 10⁻¹ і ізотонічного розчину. Третє й наступні розведення роблять у співвідношенні 1:10.

З кожного розведення, починаючи з кінцевого, вносили по 0,1см³ суспензій у три пробірки з досліджуваним середовищем. *Alcaligenes faecalis* висівали з розведень 10⁻⁶, 10⁻⁷ та 10⁻⁸; *Pseudomonas aeruginosa* - із розведень 10⁻⁴, 10⁻⁵ і 10⁻⁶; *Corynebacterium xerosis* - із розведень 10⁻⁵, 10⁻⁶ і 10⁻⁷, а *Candida albicans* - із розведень 10⁻⁴, 10⁻⁵ і 10⁻⁶.

Середовище визнають придатним за ростовими властивостями, якщо відповідна бактерійна тест-культура дала видимий ріст не менше як у

двох з трьох пробірок, засіяних з розведень, що наведені в Таблиці 2, не пізніше як через 48 годин, а культура гриба - через 72 годин.

Допустимим є також, якщо одержані такі результати посіву: ріст відмічено не менше як у двох з трьох пробірок, що були засіяні із попереднього розведення (наприклад: для *Alcaligenes faecalis* - 10⁻⁶, а для *Candida albicans* - 10⁻⁴, і не менше як в одній пробірці з трьох під час висівання обох наступних за цим розведень, тобто для *Alcaligenes faecalis* це 10⁻⁷ і 10⁻⁸, а для *Candida albicans* відповідно 10⁻⁵ і 10⁻⁶. Інші види тест-культур - відповідно). У разі одержання інших результатів, посіви з таких розведень повторюють на подвійній кількості пробірок із середовищем.

Досліджене середовище вважають придатним для випробовувань, якщо при повторному висіванні тест-культури відмічається ріст у посівах з розведень, зазначених у Таблиці 1, не менше ніж у чотирьох із шести засіяних пробірок. Тест-культури можна одержати з будь-якої міжнародної колекції штамів або в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ, м. Київ).

За результатами випробувань поживні середовища з трьох зразків гідролізатів відповідали вимогам ДСТУ 4483-2005.

Таблиця 2

Визначення ростових властивостей середовищ з гідролізатів
(№1-з мідійного гідролізату; №2 - з автолізату шпроту; №3 – середовище “Аквамедіа”)

Логарифми розведення тест-культури	Наявність росту тест-культури (+) або його відсутність (-) в зразках (по три пробірки)			
	Зразок №1	Зразок №2	Зразок №3	Еталон
Рідке середовище (тест-культура: <i>Corynebacterium xerosis</i> , еталон - МПБ)				
-6	+++	+++	+++	+++
-7	+++	+++	+++	+++
-8	---	---	---	+--
Тверде середовище (тест-культура: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , еталон - МПА)				
-5	+++	+++	+++	+++
-6	+++	+++	+++	+++
-7	++-	-+-	---	--+
Напівтверде середовище (тест-культура: <i>Alcaligenes faecalis</i> , еталон - ТГС)				
-7	+++	+++	+++	+++
-8	++-	-+-	++-	+--
-9	+--	---	-+-	+--
Середовище для грибів рідке (тест-культура: <i>Candida albicans</i> , еталон - Сабуро)				
-5	+++	+++	+++	+++
-6	++-	++-	+-+	+++
-7	-+-	+--	---	+--

У середовищах, виготовлених з мідійних і рибних гідролізатів, був отриманий ріст тест-культур не менше як у двох із трьох засіяних пробірках: *Alcaligenes faecalis*-(тест-культура для універсального напіврідкого тіогліколевого середовища для виявлення бактерій) у розведенні 10^{-7} і 10^{-8} , *Pseudomonas aeruginosa* - (тест-культур для виявлення бактерій на МПА) відповідно 10^{-5} і 10^{-6} ; *Corynebacterium xerosis* (те ж - для МПБ) – 10^{-6} і 10^{-7} , *Candida albicans* – 10^{-5} і 10^{-6} . Таким чином - в розведенні, що є тестовим і наступним за ним

одержаний ріст всіх тест-культур, що свідчить про можливість використання середовища “Аквамедіа” у мікробіологічній практиці.

Запропоноване поживне середовище “Аквамедіа” збагачене трофічними цінними речовинами з гідролізатів організмів різних таксономічних груп, переважно риб і молюсків та містить доступні вітчизняні компоненти. Властивості середовища “Аквамедіа” відповідають властивостями еталонних поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, переважно бактерій і грибів.