



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 52151

(13) A

(51) 6 C 12N1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ AEROCOCCUS VIRIDANS 167

1

2

(21) 2002021681

(22) 28 02 2002

(24) 16 12 2002

(46) 16 12 2002, Бюл. № 12, 2002 р

(72) Кременчуцький Геннадій Миколайович

(73) ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

(57) Штам *Aerococcus viridans* 167 (колекція мікроорганізмів філії Національного депозитарію патогенних для людини мікроорганізмів на базі Харківського інституту мікробіології й імунології ім. І. І. Мечникова - інв. № 1006 від 15 лютого 2002 р.) - продуцент біологічно активних речовин

Винахід відноситься до мікробіології і стосується нового штаму мікроорганізму з роду *Aerococcus*, вид - *viridans* № 167

Мікроорганізми роду *Aerococcus* мають низьку патогенність, і інфекції, викликані ними у людини, реєструють досить рідко, звичайно це особи, що страждають різною патологією або імунodefіцієтами. Спроможність виявляти патогенні властивості деяких із цих мікроорганізмів відкрита тільки в останнє десятиліття.

У закордонній літературі за 1994-2000 роки з'явилася невелика кількість даних про новий патогенний вид *A. uiridae*, що викликає інфекції сечових шляхів, ендокардити і сепсиси, що часто закінчуються летальним виходом у людей похилого віку і пацієнтів із схильністю.

Слід зазначити, що інтерес до аерококів зв'язаний не тільки з патогенним видом *A. uiridae*. Всесторонньо вивчається, як у нашій країні, так і за рубежом, представник нормальної мікрофлори людини - *Aerococcus viridans*, що має широкий спектр біохімічних активностей. Крім того, *A. viridans* вивчається, як суперпродуцент L-альфа-гліцерофосфат оксидази [2] і L-лактат оксидази [3], у зв'язку з чим розробляються середовища культивування і досліджуються властивості ферментів.

Відомий штам *Aerococcus viridans* GK 308 - ВНИИА - 1730 (Колекція мікроорганізмів науково-дослідного інституту антибіотиків, м. Москва). Штам *Aerococcus viridans* GK 308 - ВНИИА № 1730 отриманий у результаті добору негемолитическої колонії на 3%-ном кров'яному м'ясо-пептонному агарі серед колоній природного розсіву дикого типу *Aerococcus viridans*. З відібраної негемолитическої колонії отримана чиста культура при

пересіванні на м'ясо-пептоновий агар, що містить 10% кінської сироватки.

Штам *Aerococcus viridans* GK 308 депонований у колекції мікроорганізмів НДІ антибіотиків (м. Москва) під номером 1730. Штам має характерні властивості.

Морфологічні ознаки. Полиморфне. Основні структури - коки подовженої овоїдної форми, грам-позитивні, нерухомі. При електронно-мікроскопічному дослідженні видні ніжні капсули й усередині кліток великі включення неправильної форми. При вирощуванні на середовищах, збагачених кінською сироваткою, клітки однорідне витягнуті і не відрізняються за поліморфизмом. При вирощуванні штаму на м'ясо-пептоновому агарі і середовищах, збагачених білком, клітки відрізняються значним поліморфизмом змінюється форма кліток, їхнє розташування. Клітки здобувають неправильну кокоподібну форму, овоїдну, гантелеподібну, булавоподібну, зернисту форму. Клітки можуть розташовуватися безладно, скупченнями, у виді "частоколу", "розеток", можуть розташовуватися по кільцю.

Розмноження. Поперечний розподіл, дроблення.

Культуральні властивості. Скудно росте на м'ясо-пептоновому агарі у виді дрібних (0,5-1,0 мм у діаметрі) плоских безбарвних колоній круглої форми, щільної консистенції. Поверхня суха, краї рівні згладжені до поверхні середовища. Структура гомогенна чи зерниста. Спостерігається вросання в середовище.

Добре росте на м'ясо-пептоновому агарі з додаванням 10% кінської сироватки з формуванням ізольованих, чи колоній, що зливаються, розміром

(13) A

(11) 52151

(19) UA

2-3 мм у діаметрі, круглої форми, слизуваті консистенції, блискучі

Добре росте на м'ясо-пептоновому агарі з додаванням 0,2% лізоциму. Характеристика росту така ж, як на м'ясо-пептоновому агарі з додаванням кінської сироватки

На 3%-ному кров'яному м'ясо-пептоновому агарі ріст убогий без прояву гемолізу і зміни кольору навколишнього середовища

Телуристий калій, доданий у м'ясо-пептоновий агар у концентраціях 0,01-0,05%, не гнітить ріст штаму

Селенисто-кислий натрій, доданий у середовище в концентрації 0,05%, придушує ріст штаму

При рості в м'ясо-пептоновому бульйоні з додаванням 10% кінської сироватки штам формує придонний і пристінковий осад з одночасним гомогенним помутнінням середовища

Штам добре зберігається на твердих живильних середовищах м'ясо-пептоновому агарі, м'ясо-пептоновому агарі з 10% лоядиної сироватки і відповідних рідких живильних у середовищах плин 2-3 мес при 4°C. Штам добре зберігається в ліофільно-висушеному стані, не утрачаючи своєї життєздатності, по наявним даним, протягом 6 років

Фізіологічні і біохімічні ознаки. Як джерела вуглецю штам утилізує глюкозу, арабінозу, рамнозу, сорбіт, лактозу, інозит, ксилозу, дульцит, маніт, сахарозу. Не утилізує мальтозу

ДНК штаму містить 35-42% Г+Ц. Немає цитохром-оксидазної системи і гемвміщуючих каталази і пероксидази

Добре відновлює телур з телуристого калію і не відновлює селенів із селенисто-кислого натрію

Оптимальна температура росту 37°C, температурний інтервал росту 20-40°C, час росту 20-24ч (залежить від виду живильного середовища). Перекис водню не продукує. Відношення до антибіотиків: резистентне до стрептоміцину – мінімальна гнітюча концентрація антибіотика (МІК) дорівнює 61,44мкг/мол, до лізоциму (МІК - 3000мкг/мол), діоксидину (МІК - 500мкг/мол), димексиду (МІК - 3000мкг/мол). До інших препаратів чутливий

Мінливість. Штам має підвищену мінливість морфології кліток при вирощуванні на живильних і середовищах збіднених білком

Недоліком штаму *A. viridans* GK 308 є повна відсутність антагоністичної активності у відношенні тест-культур мікроорганізмів

Завданням винаходу було одержання культу-

ри *Aerococcus viridans* с підвищеною антагоністичною активністю у відношенні тест-культур мікроорганізмів

Новий штам *Aerococcus viridans* 167 був виділений із грудного молока. По своїх морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостях цілком відповідає представникам роду *Aerococcus* виду *viridans*, а також має антагоністичну активність у відношенні різних штамів мікроорганізмів. Культурально-морфологічні та фізіологічно-біохімічні особливості штаму *Aerococcus viridans* 167 – представник мікрофлори організму людини. Він відноситься до другого відділу грамположитивних субакерій, що мають клітинну стінку, чи *Furmicutes*. Входить в 17-у групу грамположитивних коків, що містить роди *Aerococcus*, *Coprococcus*, *Deinobacter*, *Deinococcus*, *Enterococcus*, *Gemmella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Mannococcus*, *Melissococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Planococcus*, *Ruminococcus*, *Saccharococcus*, *Salinicoccus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, *Streptococcus*, *Trichococcus*, *Vagococcus*

На основі 16S ррнк секвенування, біохімічного і жирно-кислотного аналізу, у результаті дослідження фенотипичної і генетичної кривності аерокок-подібних мікроорганізмів, виділених від людини, диференціювали три види – *A. viridans*, *A. urinae* і *A. christensenii* sp. nov., ізольований із піхви людини

Клітини *Aerococcus viridans* 167 мають нерухомі кулясті клітки діаметром 1,0-2,0мкм, у мазках з культур, вирощених на рідких середовищах, розташовуються тетрадами. Факультативні анаероби, але краще ростуть у мікроаерофільних умовах. Утворюють дрібні колонії, викликаючи позеленіння кров'яного агару. Хемоорганотрофи з окисним метаболізмом, вуглеводи ферментують з утворенням кислоти. Каталазо-негативні чи слегка-полоитивні. Желатин не розріджують, нітрати не відновлюють. Температурний оптимум 37 °C (також ростуть при 10°C, але не при 45°C), Принципи виділення аерококів аналогічні таким при індикації стрептококових інфекцій, бактерії утворюють білувато-сірі колонії, сформовані велика и коками, зібраними в чи зошиті парі. Подібно до ентерококів, смороду здатні рости на середовищах, що містять 6,5% NaCl, але не ростуть при 10°C, а також чуттєві до бацитрацину. У таблиці 1 наведена характеристика штаму *Aerococcus viridans* 167

Таблиця 1

Характеристика штаму *Aerococcus viridans* 167

Властивості штаму	<i>Aerococcus viridans</i> 167
Морфологія клітин при рості на м'ясо-пептоном агарі (МПА)	Коки, що розташовуються тетрадами і скупченнями, неправильної форми, грамполозитивні
Морфологія клітин МПА з 10% кінської сироватки	Морфологія та ж
Характер росту на МПА	Ріст гарний, колонії (1-2мм у діаметрі) з рівними краями, опуклі, що не зливаються
МПА з 1 0% кінської сироватки	Ріст убогий. Дрібні крапкові колонії
МПА (м'ясо-пептоновий бульйон)	Ріст гарний у виді пристінкового і придонного осаду

Властивості штаму	<i>Aerococcus viridans</i> 1 67
МПА з 0,05% сепенистокисного натрію	Ріст гарний, великі (2-3мм у діаметрі) колонії червоного кольору
МПА з 0,01% телуристого калію	Ріст гарний, колонії середнього розміру (2-3мм у діаметрі), безбарвні
МПА з 0,05% телуристого калію	Ріст відсутній
МПА з 3% крові	Ріст рясний. Великі колонії (2-3мм у діаметрі), що зеленять кров'яний агар
Здатність рости в присутності 40% жовчі	Ріст
при pH 9,6	Ріст
при 45°C	Ріст відсутній
Стійкість до витримування при 60°C 30 хв	Стійкий
у 1 5%-ном розчині H ₂ O ₂	Стійкий
Антибіотики	Мінімальна інгібуюча концентрація (мкг/мл)
Пеніцилін	0,12
Оксацилін	0,12
Метицилін	0,12
Стрептоміцин	3,84
Лізоцим	1,92
Бікліноциклін	0,12
Карбеніцилін	3,84
Целоспор	3,84
Кефлін	1,92
Цефалотин	1,92
Поліміксін	30,72
Рифампіцин	1,92
Нітроксолін	1,92
Грамурин	1000
Діоксидин	1000
Невіграмон	30,72
Димексид	750
Хіноксидин	500,0
Аскорбінова кислота	1000
Борна кислота	4000
Хлорамін	500,0
Відновлення 1%-ний метиленової сині в молоці	Немає
Желатина	не розріджує
Гідроліз Арпніну	Не гідролізує
Крохмалю	Не гідролізує
Утилізація вуглеводів	
Арабіноза	+
Рамноза	+
Інозит	+
Ксилоза	+
Сорбіт	+
Дульцит	+
Глюкоза	+
Лактоза	+
Мальтоза	+
Маніт	-
Сахароза	+
Зміст Г+Ц в ДНК штамів %	30-42

Отже, підводячи підсумки можна дати наступну характеристику штаму *Aerococcus viridans* № 167

МОРФОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Грампозитивні коки, нерухомі, 1-2мкм у діаметрі, що розташовуються парами, чи нерегулярними скупченнями. Клітинна стінка складається з

двох електронощільних і одного менш щільного проміжного шару. Товщина цитоплазматичної мембрани 200-400Å. Цитоплазма кліток має гетерогенний характер. Вона заповнена дрібними гранулами, полірибосомами, сконцентрованими навколо мезосом чи ядерних утворень.

КУЛЬТУРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ

Колонії аерококів на щільному живильному агарі круглі, 0,5-1,0 мм у діаметрі, напівпрозорі, білі чи сірі, іноді бусинкоподібні. На кров'яному агарі колонії аерококів мають великі розміри, оточені зоною позеленіння, можливо, у результаті дії лактат-оксидази. У живильному бульйоні при рості утворюється гомогенне помутніння, що має тенденцію перетворюватися в зернистий осад.

Установлено залежність росту аерококів від наявності в середовищі біотину, пантотенової і нікотинової кислот. Штам не потребує для свого росту вітаміни групи "В" (тіаміні, рибофлавіні, піридоксин, фолієвої і флавонової кислот), Tween-80 замінює потребу в біотині.

Для росту аерококів вимагаються екзогенні пурини. Гуанін і ксантин взаємозамінні з аденіном. Штам не має потреби в екзогенних пиримідинах. Потреба в амінокислотах варіабельна.

Потреба для росту в біотині, нікотинової, пантотенової кислот, пуринах і незалежність від змісту в середовищі від вітамінів групи "В", відрізняє аерококи від інших грампозитивних коків, наприклад, педіококів, що бідують у фолієвої кислот, чи стрептококів у тіаміні.

БІОХІМІЧНА АКТИВНІСТЬ

При культивуванні на молоці з 1,0% метиленовим синьом не відновлюють останній, підкисляють молоко при відсутності згортання, желатину не розріджують, аргінін, крохмаль, ескулін не гідролізують. Аерококи продукують кислоту, але не газ, при культивуванні на середовищах із глюкозою, мальтозою, лактозою, маннолом, сахарозою. Ацетон не утворюють, рафінозу не зброджують, каталазу не продукують, коагулазу не утворюють. При культивуванні в глюкозному (1%) бульйоні кінцева рН 5,1-5,8, ріст мікроаерофільний. При аеробному рості продукують перекис водню.

Каталазна активність аерококів може мати негеміновий характер. Аерококи містять фермент, що захищає їх від супероксидних радикалів – супероксидну дисмутаза, кофактором якої є марганець. По кисневій стійкості аерококи займають друге місце після *S. faecalis* і знаходяться перед *E. coli*.

Максимальна продукція перекису водню в культурі аерококів відзначається в ранній період логарифмічної фази культури. У аерококів – сильних продуцентів перекису водню стаціонарна фаза розвитку культури нетривала. Відзначається їхня висока чутливість до антибіотиків.

ХІМІЧНИЙ СКЛАД

Клітинна стінка аерококів містить глюкозу, галактозу, галактозамін і не містить рамнозу, гліцеролу чи рибітолу. Визначено однаковий зміст Г+Ц пар у ДНК аерококів і педіококів, рівне 41-43%. Зміст Г+Ц пар у ДНК аерококів коливався в межах 39,5-42,0%. В аерококів, виділених із грудного молока, зміст Г+Ц пара була 39,9-42,0%, з коров'ячого 39,5-41,6.

Антагоністичну активність штаму *Aerococcus viridans* №167 перевіряють у відношенні 9 тест-штамів методом штриха на щільному живильному у середовищі чашці Петри. Ампулу з культурою розводять 0,9% розчином натрію хлориду, з розрахунку змісту $2 \cdot 10^8$ аерококів у 1 мл і засівають штрихом по діаметрі чашки з МПА, що містить 1% глюкози і 0,4 мг/мл калію йодиду. Після інкубації посівів у термостаті при температурі $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в 48 годин перпендикулярно виростає культура аерококів підсівають петлею Генте того ж діаметра культуру тест-штамів. Після інкубації при температурі $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 24 години зони затримки росту тест-культури вимірюють від краю штриха до початку росту тест-культури.

Зони гніблення росту тест-штамів повинні бути не менш 5 мм для *Pseudomonas aeruginosa* 1312 і не менш 10 мм для всіх інших культур.

Тест-штами

Культури тест-штамів одержують з ДІСК ім. Л. А. Тарасевича. Добові культури тест-штамів: *Staphylococcus aureus* 209 p, *Proteus vulgaris* 401, *Proteus mirabilis* H 2091, *Klebsiella pneumoniae* 320, *Pseudomonas aeruginosa* 1312, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* 1046, *Salmonella typhimurium* 5710, *Vibrio* Nag p 6078, що вирости протягом 24 годин на скошеному МПА, змивають 0,9% розчином натрію хлориду і готують мікробну суспензію 5. Од стандарту (ОСО 42-28-59-85).

Продукти, що синтезуються штамом показане на схемі, яку наведено на фіг. креслення.

Можливість одержання штаму підтверджуються наступними відомостями про депонування штаму.

Штам *Aerococcus viridans* 167 (колекція мікроорганізмів філії Національного Депозитарію патогенних для людини мікроорганізмів на базі Харківського інституту мікробіології й імунології ім. І. Мечникова – інв. №1006 від 15 лютого 2002 р.)



Фіг.

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'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