



(51) МПК  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12Q 1/04* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*C12N 1/20* (2006.01); *C12Q 1/04* (2006.01); *C12R 1/01* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016150728, 22.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 22.12.2016

Дата регистрации:  
 22.03.2018

Приоритет(ы):  
 (22) Дата подачи заявки: 22.12.2016

(45) Опубликовано: 22.03.2018 Бюл. № 9

Адрес для переписки:  
 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, ФКУЗ,  
 Ставропольский противочумный институт

(72) Автор(ы):  
 Катунина Людмила Семеновна (RU),  
 Куличенко Александр Николаевич (RU),  
 Курилова Анна Алексеевна (RU),  
 Зуенко Анастасия Анатольевна (RU),  
 Тимченко Людмила Дмитриевна (RU),  
 Ржепаковский Игорь Владимирович (RU),  
 Бондарева Надежда Ивановна (RU),  
 Аванесян Светлана Суреновна (RU),  
 Вакулин Валерий Николаевич (RU),  
 Сизоненко Марина Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
 Федеральное казённое учреждение  
 здравоохранения Ставропольский  
 научно-исследовательский противочумный  
 институт Федеральной службы по надзору  
 в сфере защиты прав потребителей и  
 благополучия человека (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2394905 C1, 20.07.2010. RU  
 2433170 C1, 10.11.2011. RU 2380409 C1,  
 27.01.2010. RU 2245362 C2, 27.01.2005. Под  
 ред. ЛАБИНСКОЙ А.С., Частная  
 медицинская микробиология с техникой  
 микробиологических исследований, 2005,  
 М., Медицина, с. 565-567.

(54) ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ПЛОТНАЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЧУМНОГО МИКРОБА

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологии.  
 Питательная среда для культивирования чумного  
 микроба содержит кислотный гидролизат  
 водорастворимой фракции эмбрионально-яичной  
 массы птиц, натрий хлористый, натрий  
 фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный,

натрий сернистоокислый, агар  
 микробиологический и дистиллированную воду  
 при заданном соотношении компонентов.  
 Изобретение позволяет получить достаточное  
 количество колоний чумного микроба. 1 ил., 3  
 пр.

RU 2 648 153 C1

RU 2 648 153 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12Q 1/04* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12N 1/20 (2006.01); C12Q 1/04 (2006.01); C12R 1/01 (2006.01)*(21)(22) Application: **2016150728, 22.12.2016**(24) Effective date for property rights:  
**22.12.2016**Registration date:  
**22.03.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **22.12.2016**(45) Date of publication: **22.03.2018** Bull. № 9

Mail address:

**355035, Stavropol, ul. Sovetskaya, 13-15, FKUZ,  
Stavropolskij protivochumnyj institut**

(72) Inventor(s):

**Katunina Lyudmila Semenovna (RU),  
Kulichenko Aleksandr Nikolaevich (RU),  
Kurilova Anna Alekseevna (RU),  
Zuenko Anastasiya Anatolevna (RU),  
Timchenko Lyudmila Dmitrievna (RU),  
Rzhepakovskij Igor Vladimirovich (RU),  
Bondareva Nadezhda Ivanovna (RU),  
Avanesyan Svetlana Surenovna (RU),  
Vakulin Valerij Nikolaevich (RU),  
Sizonenko Marina Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe kazennoe uchrezhdenie  
zdravookhraneniya Stavropolskij  
nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj institut  
Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity  
prav potrebitel'j i blagopoluchiya cheloveka  
(RU)**

(54) **SOLID NUTRIENT MEDIUM CULTIVATION OF A PLAGUE MICROBE**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to microbiology.  
Nutrient medium for cultivation of plague microbe  
contains acidic hydrolyzate of water-soluble fraction  
of embryonic-egg mass of birds, sodium chloride,  
sodium phosphate 2-substituted 12-water, sodium

sulfurous, microbiological agar and distilled water at a  
given ratio of components.

EFFECT: invention allows to obtain a sufficient  
number of colonies of the plague microbe.

1 cl, 1 dwg, 3 ex

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к получению питательных сред, которые создают оптимальные условия для культивирования чумного микроба.

Известна питательная среда для культивирования чумного микроба, включающая, г/л: гидролизат говяжьего мяса, содержащего аминного азота 0,12%, натрий хлористый 4,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный 4,0; натрий сернистокислый 0,04; кислоту соляную (1:1) 1,6; агар микробиологический 24,0; питьевую воду до 1 литра (Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. ПР 01897080-09-09. Регистрационный №2134-09. 2009 г. 253 с.).

Недостатком данной среды является ее дороговизна.

Наиболее близкой к предлагаемому изобретению является питательная среда для культивирования микроорганизмов, включающая, г/л: гидролизат говяжьего мяса, содержащего аминного азота 0,12% хлористый натрий 5,0; натрий фосфорнокислый двузамещенный 4,0; агар микробиологический 12,0; дистиллированную воду до 1 литра. рН среды 7,2 (Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования, Биргер М.О., 1982 г., с. 53).

Недостатком данной среды является отсутствие стимулятора роста микроорганизмов.

Целью изобретения является получение качественной питательной среды плотной для культивирования чумного микроба на основе кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, которая обеспечивает рост достаточного количества колоний на пластинках питательного агара.

Сущность предлагаемого изобретения заключается в том, что питательная среда плотная в качестве питательной основы содержит кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, натрий хлористый, натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный, агар микробиологический, дистиллированную воду, с добавлением в среду стимулирующей добавки - натрия сернистокислого, воды дистиллированной при следующем соотношении ингредиентов, г/л:

30	Кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц	235,0-335,0
	Натрий хлористый	4,0-6,0
	Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный	3,0-5,0
	Натрий сернистокислый	0,15-0,35
35	Агар микробиологический	6,0-10,0
	Дистиллированная вода	до 1 л

Кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, содержащий в среднем 9,4% белка. Благодаря высокому содержанию пептидов - 1450 мг %; белка (по Кумасси) - 106 мг %; общего белка (по Киельдалю) - 2,1%; аминного азота - 421 мг %, углеводов - 0,15%; хлоридов - 1,8%, сухого остатка - 5,25% гидролизат является хорошей питательной средой для культивирования микроорганизмов.

В состав питательной среды входят следующие ингредиенты.

Натрий хлористый 99,9%, хч, ГОСТ 4233-77 партия 246, срок годности 09.2019. Производитель «Нева реактив». Бактерии нуждаются в минимальном количестве солей, будучи растворены в питательной среде и находясь в состоянии электролитического распада, ионизируемые минеральные соединения являются одновременно катализаторами различных химических процессов, происходящих в микробной клетке.

Включение в состав среды натрия фосфорнокислого 2-замещенного 12-водного обосновано широким использованием фосфатов при приготовлении питательных сред, т.к. это единственные неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне рН, они малотоксичны (Методические рекомендации по изготовлению и использованию питательных сред и растворов для микробиологических целей, культивирования клеток и вирусов. - М., 1989) (М.С. Поляк; В.И. Сухаревич; М.Э. Сухаревич. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб.: ЭЛБИ-СПб. - 2008. - С. 37-38).

Натрий сернистоокислый ГОСТ 195-77 ЧДА, дата поступления 23.12.15 г., партия №15, порошок белого цвета, растворим в воде. Выдерживает испытание п. 3.4. ГОСТ 197-77. Определение щелочности, %, не более 0,048. Массовая доля основного вещества, %, не менее 99,1. Дата контроля 19.01.16 г. Срок хранения 6 месяцев. Изготовитель АО «Химический завод им. Л.Я. Карпова. Натрий сернистоокислый является стимулятором роста микроорганизмов, источником серы и восстановителем окислительно-восстановительного потенциала питательной среды. Сера, присутствующая в натрии сернистоокислом, необходима для белка клеток микроорганизмов в количестве 1%. Для подавляющего числа микроорганизмов, в том числе и патогенных, благоприятной средой для роста и размножения является нейтральная реакция среды (рН 7,0±0,5), поэтому уровень рН среды до нужного значения необходимо контролировать, этот фактор доводят до нужного использованием сернистых солей или кислот. Этим фактором и является натрий сернистоокислый. При добавлении натрия сернистоокислого среда становится прозрачнее.

Агар микробиологический - агар бактериологический (европейский тип). Производитель: «Pronadisa» Испания. Партия LF 15130184. Срок годности до 10.2017 г. Дата изготовления: октябрь 2013 г. Порошок светло-кремового цвета сероватого оттенка, запах без постороннего, свойственный студню с массовой долей сухого агара 0,85%. Температура плавления студня с массовой долей сухого агара 0.85% не ниже 80°C, температура застудневания - 30-37°C, прочность студня не менее - 350±40 г. Главная особенность агара его желеобразующая способность при 90°C.

Дистиллированная вода ГОСТ 6709-72 отвечает всем гигиеническим требованиям. Внешний вид - прозрачная жидкость, хлориды, мг/дм<sup>3</sup> нет, нитраты, мг/дм<sup>3</sup> нет. Удельная электропроводимость при 20°C, См/м - 0,38, рН - 6,5. Вода составляет 80-90% от клеточной массы микроорганизмов и играет важнейшую роль в их физиологических функциях, а также входит в состав структурных элементов клетки, служит средой для биохимических реакций, источником кислорода в процессах метаболизма, непосредственно участвует в метаболических реакциях, например в реакциях гидролиза.

Приготовление кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц.

Способ приготовления питательной основы для выращивания чумного микроба заключается в следующем: куриные яйца с десятисуточными эмбрионами в количестве двадцати штук помещают в холодильную камеру бытового холодильника при температуре 2-8°C на 7 суток (методика приготовления тканевых препаратов по Филатову В.П., 1946). Яйца извлекают, затем обрабатывают 5% спиртовым раствором йода. Для дополнительной стерилизации яйца подвергают облучению в стерильном боксе источником УФ-излучения в течение 60 минут на расстоянии 1 метра. Затем осуществляют гомогенизацию извлеченных куриных эмбрионов без скорлупы в размельчителе тканей в течение 10 минут до однородной жидкости желтого цвета. Полученную массу высушивают лиофильно с предварительным замораживанием при

температуре минус  $40,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 72 часов при рабочем давлении в камере высушивания 8,0-9,0 Па при температуре конденсора минус  $50,0 \pm 1^\circ\text{C}$ , общей длительности цикла сушки 28 часов до остаточной влажности  $9 \pm 1\%$ . Затем из полученного порошка удаляют липиды при помощи петролейного эфира (ТУ 6-02-1244-83). Полученный белоксодержащий порошок впоследствии подвергают кислотному гидролизу по классической методике Козлова Ю.А. (1950) в собственной модификации, которая заключается в следующем: 40 грамм белоксодержащего порошка добавляют к 1 л 1% соляной кислоты (HCl) (х.ч. ГОСТ 3118-77) до pH 3,28 и автоклавируют при температуре плюс  $125^\circ\text{C}$  в течение 60 мин, затем гидролизат нейтрализуют 20% раствором натрия гидроокиси (NaOH) (ч.д.а ГОСТ 4328-77) до pH  $6,6 \pm 0,1$ , полученный раствор центрифугируют при 4800 оборотах в мин при температуре плюс  $4^\circ\text{C}$ , надосадочную жидкость фильтруют через 0,2 мкм стерилизующий фильтр (Sartorius). В фильтрате (гидролизате) аминный азот составляет  $421 \pm 6$  мг %, сухой остаток  $5,25 \pm 0,05\%$ .

#### 15 Приготовление питательной среды плотной

Питательную среду на основе кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц для культивирования чумного микроба готовят следующим способом: кислотный гидролизат, разбавленный дистиллированной водой до показания аминного азота 0,12% - 285 мл, натрий хлористый - 5,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водного - 4,0; агар микробиологический - 8,0; дистиллированная вода до 1 литра. Среду кипятят до полного растворения ингредиентов, затем устанавливают pH  $7,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$  помощью 20% раствора натрия гидроокиси, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, затем в фильтрат добавляют стимулирующую добавку натрий сернистокислый - 0,25, разливают в градуированные флаконы по 200,0 мл, закрывают ватно-марлевыми пробками и бумагой Крафт, стерилизуют при 0,5 атм. в течение 30 мин. После стерилизации охлаждают до  $56^\circ\text{C}$ , разливают в стерильные чашки Петри по 30 мл.

Перед приготовлением посевного материала исходную культуру чумного микроба контролируют ее культурально-морфологические и ферментативные свойства, высевают по 2 пробирки со средами Гисса с сахарозой, лактозой, рамнозой и глицерином, к которым добавляют индикатор Андресе, и высевают на 3 чашки Петри с агаром Хоттингера pH  $7,3 \pm 0,1$ . Также культуру высевают на 3 чашки Петри с агаром Хоттингера pH  $7,1 \pm 0,1$ , которые в дальнейшем используют для последовательного посева с целью получения изолированных колоний. Все чашки Петри с посевами помещают на  $(48 \pm 2)$  ч для выращивания в термостате при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ . В том случае, если культура без диссоциации, т.е. морфология колоний типична для чумного микроба и стойко удерживает свой биохимический тип, исходную культуру пересевают в бактериологические пробирки. Посевы инкубируют  $(24 \pm 1)$  ч при  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . Через сутки пробирки с культурой используют для культивирования чумного микроба на чашки Петри. В качестве примера испытывают культуру чумного микроба №231 (производственный штамм, обладающий типичными культуральными, морфологическими, биохимическими и иммунологическими свойствами), выращенную на пластинках 2% агара Хоттингера, pH  $7,2 \pm 0,1$  при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Затем готовят взвесь I суточной культуры тест-штамма, соответствующую 10 ед. по оптическому стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-85 П), эквивалентную  $1,0 \times 10^9$  м.к./мл в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида, затем серийными десятикратными разведениями в физиологическом растворе в объеме 4,5 мл доводят до содержания в 1 мл 1000 м.к. Из данного разведения взвеси чумного микроба высевают по 0,1 мл на 3

чашки Петри разлитого подсушенного агара, затем покачиванием распределяют взвесь по поверхности пластинки питательной среды, оставляют на 30 мин для впитывания посевного материала, затем помещают в термостат. Выращивают в течение  $(48 \pm 2)$  ч при  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ . В качестве контрольной среды используют плотную питательную среду рН  $7,2 \pm 0,1$ , приготовленную на ферментативном гидролизате из говяжьего мяса.

Учет результатов проводят через  $(48 \pm 2)$  ч.

Пример 1. Тест-штамм выращивают на питательной среде плотной на основе кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, разлитой на чашки Петри, содержащей, г/л: кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц - 2350,0; натрий хлористый - 4,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный - 3,0; натрий сернистоокислый - 0,15; агар микробиологический - 6,0; дистиллированную воду до 1 л. При таком соотношении ингредиентов количество выросших колоний чумного микроба составляет 50 колоний диаметром 1 мм, что составляет 50% роста от посевной дозы. Тогда как на контрольной питательной среде, приготовленной на мясной основе агара Хоттингера, вырастает 55 колоний диаметром 1,2 мм.

Пример 2. Тест-штамм выращивают на питательной среде плотной на основе кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, разлитой на чашки Петри, содержащей, г/л: кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц - 285,0 мл; натрий хлористый - 5,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный - 4,0; натрий сернистоокислый - 0,25; агар микробиологический - 8,0; дистиллированную воду до 1 л. При таком соотношении ингредиентов количество выросших колоний чумного микроба составляет 66,3 колоний диаметром 1,2 мм, что составляет 66,3% роста от посевной дозы. Тогда как на контрольной питательной среде, приготовленной на мясной основе агара Хоттингера, вырастает 70 колоний диаметром 1,5-1,8 мм. Фото 1. А) Рост колоний чумного микроба на плотной питательной среде, приготовленной на основе кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, выращенной через 48 ч инкубации при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Б) Контроль рост колоний чумного микроба на питательной среде плотной, приготовленной на ферментативном гидролизате из говяжьего мяса в аналогичных условиях через 48 ч инкубации при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  из посевной дозы 0,1 мл из разведения  $10^6$  м.к.

Пример 3. Тест-штамм выращивали на питательной среде плотной на основе кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, разлитой на чашки Петри, содержащей, г/л: кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц - 335,0 мл; натрий хлористый - 6,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный - 5,0; натрий сернистоокислый - 0,35; агар микробиологический - 10,0; дистиллированную воду до 1 л. При таком соотношении ингредиентов количество выросших колоний чумного микроба составляет 52 колоний диаметром 1,2 мм, что составляет 52% роста от посевной дозы. Тогда как на контрольной питательной среде, приготовленной на мясной основе агара Хоттингера, вырастает 60 колоний диаметром 1,5 мм.

Таким образом, заявленная питательная среда плотная на основе кислотного гидролизата водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц для культивирования чумного микроба (пример 2) может применяться для культивирования чумного микроба №231 (производственный штамм), которая обеспечивает достаточное количество колоний, что наглядно отражено на представленном фото 1.

## (57) Формула изобретения

Питательная среда плотная для культивирования чумного микроба, содержащая питательную основу, натрий хлористый, натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный, агар микробиологический, дистиллированную воду, отличающаяся тем, что в качестве питательной основы содержит кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц, а в качестве стимулирующей добавки используют натрий сернистокислый при следующем соотношении ингредиентов, г/л:

10	Кислотный гидролизат водорастворимой фракции эмбрионально-яичной массы птиц	235,0-335,0
	Натрий хлористый	4,0-6,0
	Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный	3,0-5,0
	Натрий сернистокислый	0,15-0,35
15	Агар микробиологический	6,0-10,0
	Дистиллированная вода	до 1 л.

20

25

30

35

40

45

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ПЛОТНАЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
ЧУМНОГО МИКРОБА



Фото 1. Рост чумного микроба на контрольной и предлагаемой плотной питательной среде.