



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **159892** (13) **U**
(51) МПК

G01N 1/02 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2024 05716</p> <p>(22) Дата подання заявки: 03.12.2024</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 17.07.2025</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 16.07.2025, Бюл.№ 29</p>	<p>(72) Винахідник(и): Палій Анатолій Павлович (UA), Зажарська Наталія Володимирівна (UA), Бібен Іван Андрійович (UA), Павліченко Олена Володимирівна (UA), Ващик Євгенія Володимирівна (UA), Келеберда Микола Іванович (UA), Дунаєв Юрій Костянтинович (UA), Стешенко Людмила Миколаївна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Григорія Сковороди, 83, м. Харків, 61023 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВИРОБНИЧОГО ШТАМУ A-24 ПРОБІОТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ AEROCOCCUS VIRIDANS

(57) Реферат:

Спосіб одержання виробничого штаму A-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans* включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей пробіотичної культури штаму *Aerococcus viridans*. Клонують пробіотичну культуру штаму A-24 *Aerococcus viridans* в розведенні від 10^{-1} до 10^{-8} , інкубують протягом 48 год для відбору поодиноких колоній та додають як індикаторну речовину 5 % сірчану кислоту.

UA 159892 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології та біотехнології, зокрема стосується підбору виробничого штаму А-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans* та виготовлення пробіотичних і симбіотичних препаратів, придатних для підвищення імунобіологічного стану і корекції мікробіоценозу макроорганізму в стані дисфункції мікробіоти кишечника для сільськогосподарських і домашніх ссавців та птиці, як польовий індигенний прокаріот з вираженими пробіотичними та імунобіологічними потенціями.

Існує штам *Aerococcus viridans* № 167К (Дипозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України, м. Київ, вул. Заболотного, реєстраційний номер *Aerococcus viridans* IMB В-7069 для виготовлення лікарських препаратів, косметичних засобів та біодобавок.

Найближчим аналогом до корисної моделі є штам *Aerococcus viridans* № 167 (Авторське Свідоцтво № 1494516 ССРСР. Питательная среда для определения лактатоксидазной активности *Aerococcus viridans* / - Оpubл. в Б.И., 1989, № 26 Кременчуцкий Г.Н.).

Цей штам було отримано з грудного молока жінки в 70-х роках минулого століття на кафедрі мікробіології Дніпропетровського медичного інституту за допомогою відбору, висіву клонів і інкубації для виготовлення біопрепаратів. Це рішення може бути аналогом. Недоліком є те, що в результаті того, що штам був виділений більше півсотні років тому, то на підставі дисоціативних модифікацій є неоднорідним в біологічному аспекті, що призводить до отримання некондиційних біопрепаратів, а також те, що джерелом референтного штаму є людина, тому референтні прокаріоти є антигенно неспоріднені з польовими ізолятами від тварин і це призводить до незадовільного приживання гуманізованого пробіотика в організмі тварин.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання виробничого штаму А-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans* для використання як індигенного пробіотика за підвищення імунобіологічного стану і корекції мікробіоценозу макроорганізму в стані дисфункції мікробіоти кишечника у сільськогосподарських і домашніх ссавців та птиці.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання виробничого штаму А-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans*, що включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей пробіотичної культури штаму *Aerococcus viridans*, згідно з корисною моделлю, клонують пробіотичну культуру штаму А-24 *Aerococcus viridans* в розведенні від 10^{-1} до 10^{-8} , інкубують протягом 48 год для відбору поодиноких колоній та додають як індикаторну речовину 5 % сірчану кислоту.

Для одержання стабільної культури пробіотичного штаму А-24 *Aerococcus viridans* проводять його клонування. Для цього висівають дводобові суспензії культури на чашки Петрі з індикаторно-селективним агаром на ОГГХ (на основі перевару Хотінгера), яке складається з KI - 26,0; розчинний крохмаль - 10,0; МЛА на ОПХ - 30,0; H₂O - ad 1000,0 у розведеннях від 10^{-1} до 10^{-10} , інкубують за температури 37-38 °С протягом 48 год та отримують ізольовані колонії.

На чашках Петрі з розведенням від 10^{-1} до 10^{-8} спостерігався зливний ріст бактерій, тобто, кількість колоній перевищувала 250-300 колоній на одну чашку Петрі. З кожної чашки Петрі з розведення 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} відбирають по два клони штаму та культивують за 37-38 °С на індикаторно-селективному МЛА на ОПХ в чашках Петрі впродовж 48 год. В ході дослідження в окремих випадках спостерігають дисоціацію культур, які мають вигляд поліморфних клітин різної величини та характеризуються ростом гетерологічних колоній. З загальної кількості отриманих клонів були відібрані гомогенні культури, що мали однакові морфологічні ознаки: дрібні граммпозитивні нерухомі безкапсульні коки, які не утворювали спор. Для індикації видотипових колоній поверхню чашок Петрі зі сформованим бактеріальним газоном пробіотичного прокаріоту обробляють 5 % розчином сірчаної кислоти і ті колонії, які змінили колір і стали темно-синіми віднесли до типових. Подібні колонії з необроблених чашок Петрі відсівають на чашки Петрі з агаром Хотінгера, інкубують впродовж 48 год за 37-38 °С і після цього вивчають їх тинкторіальні, морфологічна, культуральні, біохімічні і біологічні властивості.

Морфо-тинкторіальні властивості.

Aerococcus viridans штам "А-24" у мазках-відбитках з біоматеріалу або у мазках з агарових культур представлені нерухомими безкапсульними граммпозитивними коками, розташованих парами чи скупченнями, а у мазках з культур вирощених в МПБ - здебільшого тетрадами.

Культуральні властивості.

Факультативні анаероби та мікроаерофіли, швидкозростаючі прокаріоти. На МЛА утворюють дрібні півпрозорі білувато сірі колонії в S формі; викликають α-гемоліз 5 % кров'яного МЛА, навкруги великих колоній в М-формі. В МПБ утворюється гомогенне помутніння, що має тенденцію перетворюватися в зернистий осад з просвітлінням бульйону.

Температурний оптимум 37-38 °С, ростуть в діапазоні 10-42 °С, при 45 °С ріст припиняється. Здатні рости на середовищах, що містять до 6,5 % кухарської солі. Штам проявляє високу чутливість до антибіотиків.

Біохімічні властивості.

5 Хемоорганотрофи за окисним типом метаболізму, вуглеводи ферментують з утворенням кислоти. Каталазо-негативні, желатин не розріджують, нітрати не відновлюють.

Ріст штаму залежить від наявності в поживному середовищі біотину, пантотенової і нікотинової кислоти. Tween-80 замінює потребу в біотині. Штам не потребує вітамінів групи В: тіаміну, рибофлавіну, піридоксину, фолієвої і флавонової кислот. Для росту штаму потрібні екзогенні пурини. Гуанін і ксантин взаємозамінні з аденіном. Штам не потребує екзогенних піримідинів. Потреба в амінокислотах варіабельна.

10 Штам за культивування в молоці з 1,0 % метиленової синьки, не відновлює останньої, підкислює молоко при відсутності згортання, желатину не розріджує, аргінін, крохмаль, ескулін не гідролізує. Аерококи продукують кислоту без газу при культивуванні на середовищах з глюкозою, мальтозою, лактозою, манітом, сахарозою. Ацетоїн не утворюють, рафінозу не зброджують, каталазу не продукують, коагулазу не утворюють.

15 При культивуванні в мікроаерофільних умовах в МПБ з 1,0 % глюкози - фінальне рН МПБ сягає 5,0-5,5, а в аеробних умовах штам продукує H₂O₂. Максимальна продукція перекису водню спостерігається на початку експоненціальної фази росту, стаціонарна фаза - нетривала.

20 Біологічні властивості штаму.

Штам апатогенний для тварин. Сапрофіти, входять до складу резидентної мікробіоти з пробіотичними потенціями, убіквітарні прокаріоти широко розповсюджені в природі.

25 *Aerococcus viridans* "A-24" - це резидентний, біологічно активний індигенний штам з вираженими пробіотичними потенціями, отриманий з молока корови, придатний для виготовлення пробіотиків і симбіотиків.

Виробничий штам А-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans* був виділений з молока клінічно здорової корови в одному з приватних фермерських господарств Дніпропетровської області і зареєстрований в музеї навчально-наукової лабораторії кафедри інфекційних хвороб тварин Дніпровського ДАЕУ.

30 Запропонований виробничий штам А-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans* використовується як пробіотична культура при виготовленні пробіотиків та симбіотиків, як один з компонентів біопрепарату.

35 Пробиотики та симбіотики призначаються сільськогосподарським і домашнім тваринам як кормова дієтична добавка, яка вміщує пробіотичну індигенну резидентну культуру, штам "А-24" *Aerococcus viridans*, для нормалізації видового і кількісного складу мікробіоценозу макроорганізму.

40 Для накопичення бактеріальної маси пробіотичної культури *Aerococcus viridans* штам "А-24" використовують МПБ, в якому за 37-38 °С в аеробних умовах, стаціонарно або суспензійно (в біореакторі), отримують необхідну кількість бактеріальної маси прокаріот. Сепарацію бактеріальної маси аерококів від рідкого живильного середовища після культивування проводять за допомогою центрифугування. Отриману бактеріальну масу пробіотичної культури суспендують у стерильному ізотонічному розчині та використовують за призначенням, відповідно інструкції до біопрепарату.

45 Таким чином, штам А-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans*, отриманий таким способом, може використовуватись для виготовлення пробіотичних і симбіотичних препаратів, придатних для підвищення імунобіологічного стану і корекції мікробіоценозу макроорганізму.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

50 Спосіб одержання виробничого штаму А-24 пробіотичної культури *Aerococcus viridans*, що включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей пробіотичної культури штаму *Aerococcus viridans*, який **відрізняється** тим, що клонують пробіотичну культуру штаму А-24 *Aerococcus viridans* в розведенні від 10⁻¹ до 10⁻⁸, інкубують протягом 48 год для відбору поодиноких колоній та додають як індикаторну речовину 5 % сірчану кислоту.