

УДК 579.852.1.001.76.8.004.4 405

О. І. Брич, Е. О. Сністар, В. Ю. Черненко

ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України", м. Київ, Національний технічний університет України "КНУ", м. Київ

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ДОВГОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ CLOSTRIDIUM

Мета: удосконалення способу укладання музейних штамів анаеробних мікроорганізмів та перевірка їх життєздатності у процесі тривалого зберігання. Методи: дослідження проводили із застосуванням мікроскопічних, бактеріологічних та біохімічних методів. Результати: у роботі запропоновано технологію приготування інкапсульованих зразків музейних еталонних штамів анаеробних мікроорганізмів роду Clostridium, які мають діагностичне та промислове значення. Встановлено високу життєздатність зі збереженими вихідними біологічними властивостями еталонних культур анаеробних бактерій у процесі тривалого зберігання. Висновок. Доведено перспективність застосування запропонованої методики виготовлення зразків музейних еталонних штамів анаеробних мікроорганізмів з метою тривалого зберігання культур у мікробіологічних лабораторіях.

Ключові слова: анаеробні бактерії, зберігання, життєздатність.

Довготривале зберігання різних видів спороутворюючих анаеробних мікроорганізмів зі збереженням їх вихідних характеристик має важливе практичне значення у процесі виготовлення імунобіологічних препаратів, та є актуальною проблемою при підтриманні колекційних зразків культур у депозитаріях [4].

Так, при культивуванні вакцинних штамів мікроорганізмів роду Clostridium в більшості випадків стоїть завдання одержання не тільки біомаси, але і великої кількості активного продукту біосинтезу – токсину, що гарантує повноцінну імунну відповідь. Ліофілізація як ефективний спосіб зберігання музейних культур анаеробних бактерій в незмінному стані (більше 30 років) не завжди може бути використаний у зв'язку з відсутністю спеціального обладнання в мікробіологічних лабораторіях лікувально-профілактичних закладів та науково-дослідних установ [1, 2].

Тому велике значення надається розробці нових методів зберігання музейних штамів в умовах діагностичних лабораторій та науково-дослідних установ, які мають дозвіл на роботу з мікроорганізмами III-IV груп патогенності [6].

Метою роботи було удосконалення способу укладання музейних штамів анаеробних мікроорганізмів та перевірка їх життєздатності у процесі тривалого зберігання.

Матеріал та методи дослідження. Відомий спосіб тривалого зберігання клітин живої тканини, індивідуальних клітин (клітин Лангерганса, гепатоцитів, еритроцитів, ферментів та ін.) автора Франкліна Ліма (United States Patent № 24600), який полягає в інкапсуляції біологічного матеріалу з утворенням напівпроникної мембрани і здійснюється шляхом суспендування останнього в розчині альгінату натрію, який характеризується стабілізуючими та желеподібними властивостями.

При внесенні зазначеної суспензії у розчин хлориду кальцію (ініціатор полімеризації) утворюються желеподібні краплі-капсули, що містять біоматеріал. Приклади застосування даної методики описані тільки для деяких видів біологічного матеріалу без зазначення оптимального терміну тривалого зберігання [7].

Дані експериментальних досліджень свідчать, що використання хлориду кальцію як ініціатора полімеризації часто призводить до осмотичного лізису бактеріальних клітин. Нами запропоновано застосування лактату кальцію замість хлориду кальцію в якості ініціатора полімеризації, оскільки при цьому створюються найбільш оптимальні умови, наближені до фізіологічних, для підтримання життєдіяльності як мікробних клітин, так і взагалі будь-яких індивідуальних клітин (еритроцити, лімфоцити) макроорганізму. Лактат кальцію є більш "м'якою" кращою сполукою як фактор живлення для мікроорганізмів.

Виготовлено зразки музейних штамів різних видів анаеробних мікроорганізмів, що мають промислове та діагностичне значення (Clostridium acetobutylicum 524, C. acetobutylicum 780, C.perfringens 27, C. novyi 198, C.sporogenes 275) [5]. Дослід проводили у кілька етапів у стерильних умовах. Для роботи підготовлено стерильний посуд, флакони, разові стерильні

шприци, голки. На початковому етапі вирощували культури вище зазначених видів мікроорганізмів, внесені у флакони з тіогліколевим середовищем (виробництва bioMerieux, Франція), при 37°C в анаеростаті протягом 2-3 діб.

Для контролю чистоти кожної культури паралельно проводили засів її на 2 чашки Петрі з кров'яним агаром, з яких одну клали в анаеростат, а одну для інкубації при 37°C в термостат. Готували розчин альгінату натрію (NaC₆H₇O₆), який у кількості 2,0 г розчиняли у 100,0 мл тридистильованої води на водяній бані. Наступний етап – приготування 0,1N розчину лактату кальцію (Ca (C₃H₅O₃)₂ · H₂O). Останній в кількості 3,85 г розчиняли у 250,0 мл тридистильованої води. Обидва розчини стерилізували шляхом автоклавування при 121°C 20 хвилин.

В асептичних умовах культуру кожного виду анаеробних мікроорганізмів інокулювали у стерильний розчин альгінату натрію у співвідношенні 1:1 та з використанням стерильних голок для пункції вносили у флакони зі стерильним розчином лактату кальцію, що супроводжувалося полімеризацією бактерійного матеріалу та утворенням гелевих мікрокульок. В подальшому інкапсульовані культури було внесено в стерильні епендорфи та закладено для тривалого зберігання в температурних умовах -70°C.

Через 3, 6, 9, 12 та 15 місяців капсули культур розчиняли в 0,1 N розчині лимонної кислоти, який готували шляхом додавання 0,19 г кристалів лимонної кислоти до 1,0 л стерильної дистильованої води, та здійснювали засів у пробірки з тіогліколевим середовищем. В подальшому проводили пересів у напіврідкий 0,5 % цукровий поживний агар (ЦА) та висів на глюкозо-кров'яний агар Цейслера з наступною інкубацією в анаеростаті при 37°C. Культури анаеробів досліджували за культуральними, морфологічними, тинкторіальними, біохімічними властивостями [2]. Для перевірки токсигенності штамів *C.perfringens* 27, *C. novyi* 198 проводили біологічну пробу шляхом підшкірного введення білим мишам добової культури зазначених штамів в дозі 0,2 мл [3].

Результати дослідження та їх обговорення. Перевірка ростових властивостей експериментальних зразків музейних штамів анаеробних мікроорганізмів, що мають промислове та діагностичне значення *Clostridium acetobutylicum* 524, *C. acetobutylicum* 780, *C.perfringens* 27, *C. novyi* 198, *C.sporogenes* 275 через 3, 6, 9, 12 та 15 місяців, що зберігались в інкапсульованому виді при температурі -70° С показала високу життєздатність всіх досліджуваних штамів (таблиця 1).

Таблиця 1

Результати росту анаеробів на поживних середовищах

№ п/п		Результати посіву на наявність анаеробів		Мікроскопія, забарвлення за Грамо
		Тіогліколеве середовище	0,5 % цукровий агар	
1.	<i>Clostridium acetobutylicum</i> 524	ріст	колонії у вигляді пушинок	Грампозитивні палички із субтермінальними спорами
2.	<i>Clostridium acetobutylicum</i> 780	ріст	колонії у вигляді пушинок	Грампозитивні палички із субтермінальними спорами
3.	<i>C.perfringens</i> 27	ріст	R-колонії у вигляді комочків вати	Грампозитивні палички із центральними спорами
4.	<i>C. novyi</i> 198	ріст	колонії у вигляді чечевиці	Грампозитивні палички із субтермінальними спорами
5.	<i>C.sporogenes</i> 275	ріст	колонії у вигляді чечевиці	Грампозитивні палички із субтермінальними спорами

Інтенсивний ріст культур анаеробів на тіогліколевому середовищі спостерігався вже на другу добу. Через 2 – 3 доби у стовпчиках 0,5 % цукрового поживного агару виростили ясно видимі візуально колонії мікробів-анаеробів у вигляді чечевиці та пушинок. На глюкозо-кров'яному агарі Цейслера виявлено характерні для кожного виду колонії, інколи оточені зоною гемолізу (*C. novyi* 198, *C.perfringens* 27). В мазках, забарвлених за Грамом, культури мали типові для штамів морфологію: грампозитивні палички із закругленими кінцями, розташовані поодинокі, або в ланцюжках з 3 – 5 паличок, овальними спорами, розміщеними субтермінально або центрально (*C.perfringens* 27).

За біохімічними властивостями, які вивчали за здатністю ферментувати глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, маніт, саліцин, використані в експериментальній роботі штами були типовими. Підшкірне введення добових культур *C. novyi* 198 і *C.perfringens* 27 білим мишам в дозі 0,2 мл викликало загибель тварин через 20 годин.

Отже, в результаті проведених етапів оживлення, пасажування зазначених штамів встановлено високу життєздатність цих культур, що свідчить про перспективність застосування у

мікробіологічних лабораторіях методики виготовлення інкапсульованих зразків музейних штамів анаеробних мікроорганізмів для їх тривалого зберігання.

Запропонована технологія довготривалого зберігання різних видів спороутворюючих анаеробних мікроорганізмів зі збереженням їх вихідних характеристик має важливе практичне значення у процесі виготовлення імунобіологічних препаратів, та є надзвичайно актуальною при підтриманні колекційних зразків культур у депозитаріях.

Висновки

1. Встановлено високу життєздатність зі збереженими вихідними біологічними властивостями інкапсульованих зразків еталонних культур анаеробних бактерій роду *Clostridium* у процесі тривалого зберігання.
2. Доведено перспективність застосування запропонованої методики виготовлення зразків музейних еталонних штамів анаеробних мікроорганізмів, що мають промислове та діагностичне значення, з метою тривалого зберігання культур у мікробіологічних лабораторіях.

Список літератури

1. Акименко Л.І. Методика виділення, ідентифікації та довгострокового зберігання штамів мікроорганізмів роду *Clostridium* / Л.І. Акименко, Д.О. Котляр, Н.С. Палійчук // М – Київ: Товариство “Знання” України. – Вип.2 - 2001. – С.69-76.
2. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии / Ф.Герхардт [и др.] // – М.: Мир. – Т.1. – 1983. – С.517-533.
3. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская // – М.: Медицина, - 1978. – С. 54 – 56.
4. Наказ МОЗ України від 14.01.2004 р. за № 5 “Про затвердження порядку одержання, обліку, зберігання та утримання тест-штамів мікроорганізмів для проведення контролю якості лікарських засобів за мікробіологічними показниками”.
5. Поліщук О. І. Каталог культур Музею патогенних для людини мікроорганізмів // О. І. Поліщук, О. І. Брич, Ж. Е. В'ялих [та ін.] // – К.: Знання України, - 2006. – 144 с.
6. Пінчук Н.Г. Розробка технології довготривалого зберігання бактерій з використанням методу сорбційно-контактного зневоднення // Автореферат на здоб. наук. ступ. канд. вет.наук: 16.00.03. – Нац. наук. центр “Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини”. – Харків, - 2008. – 20 с.
7. United States Patent № 24600. Encapsulation of biological material // Franklin Lim, Richmond, Va. / C12N 11/10; C12N 11/04; C12N 5/00. Oct. 5, - 1982.

Реферати

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА CLOSTRIDIUM

Брич О.И., Синетар Э.А., Черненко В.Ю.

В работе усовершенствован способ укладки музейных штаммов анаэробных микроорганизмов и проверка их жизнеспособности в процессе длительного хранения. Методы: исследование проводили с применением микроскопических, бактериологических и биохимических методов. Результаты: в работе предложена технология приготовления инкапсулированных образцов музейных эталонных штаммов анаэробных микроорганизмов рода *Clostridium*, которые имеют диагностическое и промышленное значение. Установлена высокая жизнеспособность с сохраненными исходными биологическими свойствами эталонных культур анаэробных бактерий в процессе длительного хранения. Вывод. Доказана перспективность применения предложенной методики изготовления образцов музейных эталонных штаммов анаэробных микроорганизмов с целью длительного хранения культур в микробиологических лабораториях.

Ключевые слова: анаэробные бактерии, хранение, жизнеспособность.

IMPROVED METHODS OF LONG-TERM STORAGE OF MICROORGANISMS OF THE GENUS CLOSTRIDIUM

Brych O.I., Synetar E.A., Chernenko V.J.

In research improved the method of stacking museum strains of anaerobic microorganisms and test their viability in the long-term storage. Methods: The study was conducted with the use of microscopic, bacteriological and biochemical methods. Results: The technology in the preparation of encapsulated samples museum reference strains of anaerobic microorganisms genus *Clostridium*, which are diagnostic and industrial importance was offered. The high viability with preserved original biological properties of reference cultures of anaerobic bacteria in the long-term storage established. Conclusion. Proved promising application of the proposed method sample making museum reference strains of anaerobic organisms with a view to long-term storage of cultures in microbiological laboratories.

Key words: anaerobic bacteria, storage, viability/

Стаття надійшла 9.10.2015 р.

Рецензент Куш О.Г.