



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **27970** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 1/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СТВОРЕННЯ АНАЕРОБНИХ УМОВ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ АНАЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ

1

2

(21) u200705932

(22) 29.05.2007

(24) 26.11.2007

(72) ДАНИЛЕЙЧЕНКО ВАЛЕРІЙ ВАСИЛЬОВИЧ,
UA, ФЕДЕЧКО ЙОСИП МИХАЙЛОВИЧ, UA,
ГАРБУЗОВ АНТОН ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA
(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, UA
(56)

(57) Спосіб створення анаеробних умов для
культивування анаеробних бактерій шляхом
генерації водню, який **відрізняється** тим, що
водень генерують методом електролізу води та
порційно накопичують і зберігають безпосередньо
в спеціальному модулі, з якого водень при потребі
подають у контейнер для культивування анаеробів
з каталізатором.

Корисна модель стосується медицини,
зокрема мікробіології, і може бути використана для
культивування облигатно анаеробних бактерій.

Облігатно анаеробні бактерії належать до
патогенних та умовно-патогенних бактерій.
Атмосфера для їх культивування повинна бути
повністю позбавлена кисню. З цією метою
використовують спеціальні контейнери або
анаеростати, у яких за допомогою різних способів
видаляють кисень.

Існує спосіб створення анаеробних
(безкисневих) умов з використанням спеціальних
пакетів, наприклад GenBox фірми BioMerieux [1],
АнаероPack фірми [2], що генерують відповідну
газову суміш в анаеростатах. Висока вартість
пакетів, нерациональне їх використання при малій
кількості лабораторних досліджень, постійна
потреба в доставці витратних матеріалів значно
ускладнює роботу лабораторії. Можливе
використання також спеціальних «рукавичних
камер» - «Glove Box», що являють собою
термостат з буферною зоною та спеціальними
рукавичками для проведення маніпуляцій
всередині камери. Анаеробні умови створюють
шляхом продування сумішшю азоту, вуглекислоти
та водню з балонів з подальшим окисненням
водню на паладієвому каталізаторі. Об'єм камери
дозволяє помістити всередину десятки чашок
Петрі [3]. Однак система ефективна лише при
великій кількості досліджень, оскільки вартість
обладнання висока, крім того, для постійної
підтримки газового складу використовують великі
об'єми газів, що потребує постійної заміни балонів.
При малій кількості досліджень собівартість одного
дослідження є надзвичайно висока.

Відомий спосіб для створення анаеробних
умов, вибраний прототипом, в якому використано
систему для анаеробного культивування
HiAnaerobic™ System-10 фірми Himedia.
Анаеробні умови в системі створює
газогенераторний пакет (HiGas Pack). Генерацію
водню здійснюють хімічним шляхом.
Газогенераторного пакету достатньо для
виділення 1800мл водню та 350мл вуглекислого
газу. Для окислення водню використовують
каталізатор [4]. Однак цей спосіб створення
анаеробних умов потребує постійної заміни
газогенераторних пакетів, що значно збільшує
вартість досліджень анаеробних бактерій.

В основу корисної моделі поставлено
завдання створення анаеробних умов з
мінімальним використанням витратних матеріалів,
що значно знизить собівартість дослідження.

Поставлене завдання досягається тим, що у
способі створення анаеробних умов для
культивування анаеробних бактерій шляхом
генерації водню, згідно з корисною моделлю,
водень генерують методом електролізу води та
порційно накопичують і зберігають безпосередньо
в спеціальному модулі, з якого водень при потребі
подають у контейнер для культивування анаеробів
з каталізатором.

Перевагою одержання водню даним способом
є вища хімічна чистота, ніж при одержанні
хімічними способами. При отриманні водню
шляхом електролізу на катоді виділяється тільки
молекулярний водень $2\text{H}^+ + 2\text{OH}^- \rightarrow$ (електричний
струм) $\text{O}_2 \uparrow + 2\text{H}_2 \uparrow$, в той час як при утворенні водню
хімічним шляхом утворюється атомарний водень,
що здатний відновлювати домішки з утворенням

(19) **UA** (11) **27970** (13) **U**

летючих токсичних продуктів, наприклад AsH. В спеціальному модулі діє система зворотного зв'язку: при накопиченні потрібного об'єму водню генерація автоматично припиняється.

Спосіб здійснюють таким чином. У спеціальній камері модуля водень генерують шляхом електролізу води. Після накопичення потрібного об'єму, який визначається об'ємом камери, генерація водню припиняється. У цій же камері водень зберігають. При потребі водень подають у через трубку у контейнер для культивування анаеробів, який містить каталізатор. Для запобігання вибуху каталізатор знаходиться в спеціальному контейнері, що виготовлений з тонкої мідної сітки. Перед початком роботи перевіряють придатність каталізатора, скерувавши на нього струмінь водню - придатний до роботи каталізатор швидко починає нагріватися. Водень окислюється на каталізаторі та створює анаеробні умови для культивування анаеробних бактерій.

Ефективність створення анаеробних умов перевіряли за допомогою комерційних смужок Anaer Indicator (виробництво фірми BioMerieux, Франція), принцип дії яких полягає у знебарвленні метиленового синього в безкисневій атмосфері. В контейнер для культивування анаеробів помістили смужку Anaer Indicator, що має голубий колір в атмосферних умовах, та каталізатор, попередньо перевіривши його придатність. Контейнер заповнили воднем з модуля, стінки контейнера покрились водяною парою, що свідчило про те, що відбулось окислення водню. Через 2 години спостерігали знебарвлення смужки Anaer Indicator. Через 24, 48 та 72 години смужка була білого кольору. Після відкриття контейнера смужка знову набула голубого кольору.

Також ефективність створення анаеробних умов перевіряли біологічним методом - визначали наявність росту облигатних анаеробів *Bacteroides fragilis* в атмосфері, що була створена запропонованим способом. На чашку Петрі з агаром Шедлера, що містить гемін та вітамін K, засіяли культуру *Bacteroides fragilis*. В контейнер для культивування анаеробів помістили засіяну чашку Петрі та каталізатор, попередньо перевіривши його придатність. Контейнер заповнили воднем з модуля, стінки контейнера покрились водяною парою, що свідчило про те, що відбулось окислення водню. Контейнер помістили в термостат на 48 годин. Через 48 годин відкрили контейнер і на агарі Шедлера спостерігали ріст бактерій у вигляді колоній, що морфологічно нагадують *Bacteroides fragilis*. З культурою провели тест на аеротолерантність - засіяли на агар Шедлера з геміном та вітаміном K, посів помістили в термостат в аеробних умовах. Через 24 та 48 годин росту бактерій не спостерігалось. Це дозволило стверджувати, що запропонований спосіб створив анаеробні умови для культивування анаеробних бактерій.

Джерела інформації:

1. URL <http://bivaxn.com.ua/bivaxn/news/1999/2-02/2-02-3.pdf>

2. Delaney, M.L., and A.B. Onderdonk. // Evaluation of the AnaeroPack system for the growth

of clinically significant anaerobes. - J. Clin. Microbiol. - 1997. - vol.35. - p.558-562.

3. Downes, J., J. Aranki, A., and R. Freter. // Use of anaerobic glove boxes for cultivation of strictly anaerobic bacteria. - Am. J. Clin. Nutr. - 1972. - vol.25. - p.1329-1334.

4. URL <http://www.himedialabs.ru/anaer/>.