

Корисна модель належить до медицини, зокрема до бактеріології та може бути застосована для збереження музейних культур лептоспир у бактеріологічних лабораторіях.

Відомі різні способи тривалого збереження культур мікроорганізмів [1]:

- регулярний пересів їх на свіжі живильні середовища.
- збереження під шаром мінеральної олії.
- збереження у замороженому стані.
- збереження у ліофільному стані.

Найбільш розповсюдженим методом збереження культур мікроорганізмів являються регулярні пересіви бактерій у свіжі живильні середовища та збереження їх при кімнатній температурі, або в побутовому холодильнику. Метод широко використовують для збереження нечисленних колекцій мікроорганізмів у більшості бактеріологічних лабораторій. Але при збільшенні колекцій ця робота значно ускладнюється. Метод має ряд недоліків зберігається вільний доступ кисню до культур та середовища, що веде до утворення перекисів, висиханню середовища та до загибелі культур.

Визнаним методом є збереження засіяних мікроорганізмів у живильному середовищі під вазеліновою олією, але цей метод потребує регулярних пересівів бактерій на свіжі живильні середовища. Визнано також, що при таких умовах збереження культур відбувається дисоціація бактерій: морфологічні, біохімічні, фізіологічні та антигенні властивості змінюються, що може знецінювати колекційні штами мікроорганізмів та призвести до втрати основних ознак первинної культури.

Для збереження культур мікроорганізмів також використовують низькі температури побутового холодильника, в якому зберігають культури мікроорганізмів висіяними на щільні, або на напівтверді живильні середовища, а також зберігають культури у ємностях Дюара з рідким азотом при -196°C . Недоліком цих методів є необхідність утримання та обслуговування в лабораторії великих холодильних камер та великих ємностей Дюара, котрі необхідно регулярно поповнювати рідким азотом для збереження мікроорганізмів.

Поряд з цим, для збереження бактерійних культур, використовують як консерванти різні складні синтетичні хімічні сполуки [Патенти РФ №№2008348, 2291193, 2185435 2291193] [3, 4, 5].

Можливо, що методи, наведені в патентах, мають певну перевагу для збереження культур мікроорганізмів з високою стійкістю до зовнішніх впливів середовища та до дії різних хімічних елементів. Лептоспири відносяться до високочутливих мікроорганізмів до умов зовнішнього середовища та до різних хімічних речовин, вони потребують особливих умов збереження. Методом, що відповідає меті довготривалого збереження лептоспир могла б бути ліофілізація, або висушування із замороженого стану під вакуумом. Але і цей спосіб є проблематичним для лептоспир, тому що вони є вологолюбними мікроорганізмами, які спроможні зберігатися та накопичуватися у прісних відкритих водоймищах, мають у своєму складі 82% води. Обезводнення їх приведе до втрати ними життєдіяльності [2]. До того ж більшість кріопротекторів та їх розчинники, що застосовуються у способі, на лептоспири діють як дезінфектанти.

Таким чином, до цього часу не розроблені методи та умови довгострокового збереження лептоспир.

В якості прототипу приготування живильного середовища використали середовище Фервоорт - Вольфа для ізоляції лептоспир в модифікації Тарасова [10]. До складу живильного середовища входять 0,1г пептону і 0,05г агару Дифко у 100мл дистильованої води. До отриманого розчину добавляють 5 - 10мл фосфатної буферної суміші з рН 7,2. Суміш кип'ятять, фільтрують через паперові фільтри, стерилізують у автоклаві, після стерилізації у кожному пробірці вносять 5 - 7 крапель кролячої сироватки.

Наведене середовище не може бути використаним для довготривалого збереження лептоспир тому, що введення пептону веде до порушення морфології бактерій, яке виникає, зазвичай, у середовищах з великою концентрацією живильних речовин. Середовище має щільну консистенцію агару з відсутністю рідкої фази, що заважає рухомості лептоспир. Крім того, для підтримання життєздатності лептоспир є важливим використання якісної дистильованої води та встановлення оптимальної концентрації кролячої сироватки [12].

Задача корисної моделі живильного середовища для збереження культур лептоспир є розробка складу живильного середовища для довгострокового зберігання штамів *Leptospirae* шляхом створення колоїдної системи певної структури задля збільшення строку збереження життєздатності та типових морфологічних ознак мікроорганізмів.

Задача вирішується тим, що живильне середовище для збереження лептоспир, містить агар Дифко та кролячу сироватку із наступним співвідношенням компонентів, мас. %:

колоїдний розчин агару Дифко	0,005-0,015
кролячу сироватку	3,0-3,5
розчин фосфатного буферу (рН 7,2 - 7,4)	решта

Задача виконується наступним чином. До фосфатно-буферної основи живильного середовища рН 7,2 - 7,4 вносять дрібнодисперсний високоочищений агар Дифко у кінцевій концентрації 0,005 - 0,015%, що сприяє утворенню колоїдної системи із 2-х фаз. Після додавання кролячої сироватки 3,0 - 3,5% утворюється гелеподібна сітчаста структура завдяки тому, що кроляча сироватка є високомолекулярною сполукою. Сполука, адсорбуючись на поверхні колоїдної частинки агару Дифко, утворює на поверхневому шарі сітчасту структуру [11], що перешкоджає об'єднанню колоїдних частинок. Колоїдна частинка має пористу структуру з численними мікроканальцями, а це, по-перше, сприяє умовам входження в них лептоспир, а по-друге, знижує можливість проникнення до пор атмосферного кисню, що є необхідною умовою тривалого збереження життєздатності в них лептоспир. Визначення якості кролячої сироватки проводили відповідно до нашого патенту на корисну модель [№ U200613105 від 11.12.2006 «Спосіб виготовлення живильного середовища для культивування лептоспир»] [12].

Для визначення оптимальної кількості агару, досліджували три варіанти живильного середовища на основі фосфатно-буферного розчину (рН 7,2 - 7,4) з кінцевими концентраціями 0,005%, 0,001%, 0,0015% високодисперсного та високоочищеного агару Дифко з оптимальною кількістю кролячої сироватки (3,0 - 3,5%), вільної від токсичних факторів та неспецифічних аглютининів. Критеріями оцінки оптимальної кількості агару Дифко слугували морфологічні ознаки та кількість життєздатних лептоспир в залежності від терміну спостереження.

Досліджувані музейні культури лептоспир вирощували на середовищі із заявленим складом у пробірках впродовж 7-10 діб для накопичування бактерій та переносили в ампули. Ампули запаювали на вогні.

Таблиця 1

Порівняльна таблиця терміну збереження культур
лептоспир у живильному середовищі з різною кількістю агару Дифко.

Живильні середовища			Фосфатний буфер, мл	Термін збереження лептоспир	Кількість життєздатних лептоспир в полі зору мікроскопу
Концентрація агару Дифко, %	Кроляча сироватка, %				
	вар. 1	вар. 2			
0,005	3,0	3,5	до 100	1-2 роки	До 50
0,015	3,0	3,5	до 100	3-5 роки	100-150
0,010	3,0	3,5	до 100	8-10 років	100-150
Рідке середовище без агару (контроль)	3,0	3,5	до 100	10-15 діб	Поодинокі життєздатні лептоспирі із слабкою рухомістю та порушеною морфологією

Таким чином, 0,010% колоїдне середовище дозволяє зберігати лептоспирі в ампулах життєздатними впродовж 8 - 10 років. Збереження лептоспир у напіврідкому живильному середовищі у запаєних ампулах (5,0мл) запобігає висиханню середовища, зберігає сталу концентрацію кисню, сприяє збереженню необхідних умов для росту лептоспир та підтримки життєздатності впродовж тривалого часу при кімнатній температурі. Заявлена рецептура живильного середовища дозволяє довгостроково зберігати лептоспирі без пересівів. Приготування середовища не потребує допоміжної апаратури, являється простим та дешевим при використанні у лабораторіях, що займаються діагностикою лептоспирозів, а також може бути застосованим для одержання діагностичних препаратів на основі свіжоізолюваних сероваріантів лептоспир, та при виробництві профілактичних вакцин.

Джерела інформації:

1. Методы общей бактериологии в трех томах. Под редакцией Ф. Герхарда и др. Москва. Мир 1984 г. Том 1 С.512-533.
2. Патент RU 2008348 Способ хранения микроорганизмов. Опубликовано 1994.02.28. Заявлен Ленинградским научно-исследовательским институтом травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена.
3. Патент RU 95114509 Состав для хранения бактерий. Опубликовано 1997.08.10 Заявлен Научно-исследовательским институтом химии при Саратовском государственном университете им. Н. Г. Чернышевского; Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб».
4. Патент RU 2088657 Состав для хранения микроорганизмов 1997.08.27 Заявлен Научно-исследовательским институтом химии при Саратовском государственном университете им. Н. Г. Чернышевского; Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб».
5. Патент RU 2088258. Способ изготовления вакцины против лептоспироза животных. Опубликовано 1997.08.27. Заявлен Всероссийским научно-исследовательским и технологическим институтом биологической промышленности.
6. Патент RU 2185435 Способ хранения культур микроорганизмов. Опубликовано 2002.07.20. Заявлен Пензенской государственной сельскохозяйственной академией.
7. Патент RU 2291193 Консервант для хранения микроорганизмов. Опубликовано 2007.01.10. Заявлен ГОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского.
8. Патент RU 2292388 Способ сохранения жизнеспособности штамма патогенных бледных трепонем Опубликовано 2007.01.27. Заявлен Центральным научно-исследовательским кожно-венерологическим институтом Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.
9. Бернасовская Е. П., Угрюмов Б. Л., Вовк А. Д., Могилева Л. А. и др. в кн. Лептоспирозы. Киев "Здоровье" 1978. С.135.
10. Приказ №1152 МЗ СССР от 13.11.1979 г. О профилактике заболеваний людей лептоспирозом. М. 1979. С.58 в разделе Лабораторная диагностика лептоспироза.
11. Возная Н. Ф. Химия воды и микробиология, 1979 С.344
12. Патент на корисну модель № U200613105 від 11.12.2006 «Спосіб виготовлення живильного середовища для культивування лептоспир». Заявлений Українським науково-дослідним протичумним інститутом ім. І. І. Мечникова.