



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72110** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
G01N 33/48 (2006.01)
C12N 11/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 00178	(72) Винахідник(и): Марценюк Валентина Пилипівна (UA), Бабінець Ольга Михайлівна (UA), Висеканцев Ігор Павлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.01.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2012	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2012, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ МІКРОБНИХ КЛІТИН, ІММОБІЛІЗОВАНИХ НА НОСІЯХ

(57) Реферат:

Спосіб визначення життєздатності мікробних клітин, іммобілізованих на носіях, включає серійні розведення вихідної суспензії клітин, посів та культивування в чашках Петрі з агаровим середовищем і підрахування кількості макроколоній. Перед серійними розведеннями вихідну суспензію клітин попередньо вивільняють від неіммобілізованих клітин шляхом центрифугування в пробірках, обладнаних мембранами. Серійні розведення проводять в розчині агару з концентрацією, достатньою для забезпечення рівномірного розподілу комплексів «носії - іммобілізовані клітини» по об'єму розчину.

UA 72110 U

Корисна модель належить до галузі мікробіології та біотехнології і може бути використана для оцінки якості препаратів мікроорганізмів, іммобілізованих на носіях.

Останнім часом значну увагу приділяють розробці препаратів мікроорганізмів, іммобілізованих на або в носіях [1]. Для зберігання та виготовлення комерційних форм таких препаратів використовують технології кріоконсервування, ліофілізації та теплового висушування. Оцінку їх якості проводять за показниками життєздатності.

Існує спосіб визначення життєздатності мікроорганізмів [2], в основі якого лежить припущення про те, що для утворення популяції у рідкому середовищі необхідно і достатньо у зразку, який досліджується, однієї мікробної клітини. Відповідно до способу готують ряд послідовних серійних розведень у рідкому середовищі (вода, фізіологічний розчин, живильне середовище тощо). Потім із кожного розведення засівають певний об'єм у пробірки із рідким прозорим живильним середовищем. Після культивування підраховують кількість пробірок із заму́тненим (пророслим) середовищем і кількість пробірок із прозорим середовищем. По спеціальній таблиці Мак-Креді, створеній на основі варіаційної статистики, розраховують найбільш вірогідну кількість живих клітин в одиниці об'єму.

Оскільки препарати мікробних клітин, іммобілізованих на носіях, являють собою суміш комплексів іммобілізованих клітин (носій - клітини на його поверхні) і певної частки неіммобілізованих клітин, то мікробну культуру у рідкому середовищі (заму́тнені пробірки) будуть утворювати неіммобілізовані клітини або клітини, які звільнилися від носія за рахунок ресорбції під час різних маніпуляцій. Тому неможливо одержати дані про життєздатність іммобілізованих клітин, які будуть ділитися на поверхні носія і не будуть заму́тнювати живильне середовище у пробірці. Крім того, при проведенні серійних розведень у рідкому середовищі за рахунок великої маси носіїв вони швидко випадають в осад та нерівномірно розподіляються по об'єму рідини, що призводить до великого розкиду результатів.

Найбільш близьким до заявленого способу за своєю суттю є спосіб визначення життєздатності мікробних клітин шляхом висіву на тверді середовища (метод Коха) [3]. Згідно з цим способом проводять серійні розведення вихідної суспензії клітин у рідкому середовищі. Із кожного розведення певний об'єм суспензії клітин висівають на поверхню чашки Петрі з твердим агаровим середовищем. Після культивування підраховують кількість ізольованих одна від одної макроколоній. При цьому вважають, що кожна колонія утворена за рахунок розмноження однієї клітини. Далі проводять перерахунок кількості життєздатних клітин на 1 мл вихідної суспензії або 1 г досліджуваної речовини з урахуванням серійного розведення.

Недоліком цього способу є те, що при висіві на поверхню агарового середовища макроколонії будуть утворювати як мікробні клітини, зв'язані з носієм, так і неіммобілізовані клітини. У зв'язку з цим неможливо достовірно оцінити дійсну життєздатність саме іммобілізованих клітин. Другим недоліком цього способу є те, що при проведенні серійних розведень препаратів іммобілізованих клітин у рідких середовищах за рахунок досить великої маси носіїв вони швидко випадають в осад та нерівномірно розподіляються по об'єму рідини, що призводить до великого розкиду результатів.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити відомий спосіб визначення життєздатності мікробних клітин таким чином, щоб він забезпечив можливість одержання достовірних даних щодо іммобілізованих на носіях мікробних клітин, а також зниження їх розкиду.

Ця задача вирішується тим, що в способі визначення життєздатності мікробних клітин, який включає серійні розведення вихідної суспензії клітин, посів та культивування в чашках Петрі з агаровим середовищем і підрахування кількості макроколоній, згідно з корисною моделлю, перед серійними розведеннями вихідну суспензію клітин попередньо вивільняють від неіммобілізованих клітин шляхом центрифугування в пробірках, обладнаних мембранами, а серійні розведення проводять в розчині агару з концентрацією, достатньою для забезпечення рівномірного розподілу комплексів "носій - іммобілізовані клітини" по об'єму розчину.

Спосіб здійснюють таким чином.

Після процедури іммобілізації препарат вивільняють від неіммобілізованих клітин, для чого отриману суспензію препарату вносять в центрифугальну пробірку із вмонтованою в неї мембраною, яка пропускає неіммобілізовані клітини і затримує комплекси "носій - іммобілізовані клітини". Зразок центрифугують, неіммобілізовані клітини випадають в осад, а комплекси "носій - іммобілізовані клітини" переносять з мембрани в пробірку з фізіологічним розчином, до якого додано агару в кількості, що забезпечує рівномірне розподілення комплексів "носій - іммобілізовані клітини" по об'єму. Концентрація агару залежить від виду і розмірів носія. Далі проводять серійні розведення у фізіологічному розчині, до якого додають агар у вибраній для даного носія концентрації. Із кожного серійного розведення переносять певну кількість суспензії

в порожню чашку Петрі, потім в неї доливають агаризоване живильне середовище з вмістом агару 1,7-2,2 %. Чашки культивують та підраховують кількість макроколоній.

Приклад.

- Для дослідження брали суспензію неімобілізованих клітин *Saccharomyces boulardii* та клітин цього мікроба, іммобілізованих на ентеросорбентах "Сорбекс" та "Сумс-1". Експериментально підбирали концентрацію агару, який додавали у фізіологічний розчин для проведення серійних розведень. Для носіїв "Сорбекс" та "Сумс-1" вона становила 0,2 %. Для порівняння проводили серійні розведення неімобілізованих та іммобілізованих на ентеросорбентах клітин у фізіологічному розчині та висівали "чашковим" методом Коха, як у прототипі. Паралельно суспензії іммобілізованих клітин вносили в обладнані мембранами центрифугальні пробірки. Зразки центрифугували. Комплекси "носії - іммобілізовані клітини" переносили з мембран у фізіологічний розчин, до якого додано 0,2 % агару. Проводили серійні розведення у цьому розчині. Із кожного розведення переносили в стерильну чашку Петрі по 1 мл суспензій та заливали їх 15-20 мл живильного середовища Сабуро, яке містило 2 % агару. Чашки із посівами інкубували 48 годин при 30 °С. Потім підраховували кількість макроколоній. Результати дослідів наведені в Таблиці, з якої видно, що при визначенні життєздатності іммобілізованих клітин способом за прототипом відмічається значний розкид результатів, в той час як у заявленому способі розкид результатів незначний.

Таблиця

Життєздатність *Saccharomyces boulardii*

Зразки клітин	Спосіб оцінки життєздатності	Середня кількість, КУО/мл	
		$\bar{X} + s\bar{X}$	P
Неімобілізовані клітини	За прототипом	$(8 \pm 0,2) \cdot 10^8$	<0,05
Клітини, іммобілізовані на "Сумс-1"	За прототипом	$(3,5 \pm 1,0) \cdot 10^6$	>0,05
Клітини, іммобілізовані на "Сорбекс"	За прототипом	$(4,2 \pm 1,3) \cdot 10^7$	>0,05
Неімобілізовані клітини	Заявлений	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$	<0,05
Клітини, іммобілізовані на "Сумс-1"	Заявлений	$(7,1 \pm 0,2) \cdot 10^6$	<0,05
Клітини, іммобілізовані на "Сорбекс"	Заявлений	$(5,4 \pm 0,2) \cdot 10^6$	<0,05

Примітки: \bar{X} - середнє арифметичне;

$s\bar{X}$ - середнє квадратичне відхилення;

P - рівень довірчої імовірності ($\leq 0,05$).

Джерела інформації:

1. Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Имобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты // Биотехнология.-2008. - № 2. - С. 30-45.

2. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. - Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. - С. 8-10.

3. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. - С. 61-69.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення життєздатності мікробних клітин, іммобілізованих на носіях, який включає серійні розведення вихідної суспензії клітин, посів та культивування в чашках Петрі з агаровим середовищем і підрахування кількості макроколоній, який **відрізняється** тим, що перед серійними розведеннями вихідну суспензію клітин попередньо вивільняють від неімобілізованих клітин шляхом центрифугування в пробірках, обладнаних мембранами, а серійні розведення проводять в розчині агару з концентрацією, достатньою для забезпечення рівномірного розподілу комплексів "носій - іммобілізовані клітини" по об'єму розчину.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601