

(ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ)
СПОСІБ ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ
МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Валерій Мінухін, Надія Скляр,
Олена Перетятко, Юлія Ягнюк,
Світлана Крестецька, Галіна Большакова

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова Національної академії медичних наук
України

Затверджено Вченою Радою ДУ «ІМІ НАМН»,
Протокол № 8 від 21.09.2023

Рецензент : Філімонова Н. І., д.мед.наук, професор,
завідувач кафедри мікробіології, вірусології і
імунології Національного фармацевтичного
університету МОЗ України.

Пропонується для впровадження в практику роботи лабораторій (відділів, відділень) мікробіологічного профілю закладів охорони здоров'я, наукових, науково-дослідних, науково-виробничих установ спосіб тривалого зберігання музейних штамів мікроорганізмів у поживному середовищі з гліцерином в умовах морозильної камери при температурі мінус 20 °С..

Актуальність проблеми. Колекції мікроорганізмів являють собою унікальний ресурс для наукових та виробничих цілей, внутрішнього контролю якості лабораторних досліджень, оцінки коректності роботи персоналу лабораторій/відділів мікробіологічного профілю тощо. Необхідною умовою підтримання колекцій мікроорганізмів є забезпечення збереження штамів у життєздатному стані, що оптимізує цільове використання їх у різних галузях біотехнології та медицини.

Зазвичай у лабораторіях мікробіологічного профілю для зберігання музейних культур найчастіше використовується спосіб субкультивування (регулярних пересівів) та спосіб зберігання під шаром мінеральної олії. Недоліками вказаних способів зберігання є необхідність чіткого дотримання регламенту періодичності пересівів, потреба у великій кількості лабораторного посуду та поживних середовищ, що призводить до матеріальних витрат, значних затрат часу та людських ресурсів. Крім того, при багаторазових пересівах існує високий ризик контамінації та втрати необхідних цільових властивостей мікроорганізмів, що унеможливує їх подальше використання. Більш перспективними є такі способи тривалого зберігання мікроорганізмів, як ліофілізація та консервування у рідкому азоті за наднизьких температур. Однак вказані способи потребують наявності дороговартісного обладнання. Отже пошук ефективних, оптимальних способів тривалого зберігання мікробних культур є вкрай актуальним.

Нами пропонується спосіб консервування штамів мікроорганізмів шляхом заморожування культур при температурі - 20 °С (в умовах морозильної камери) у поживному середовищі з гліцерином. Використання гліцерину як кріопротектору обумовлено його здатністю підвищувати в'язкість середовища, спричиняти помірну дегідратацію клітин під час охолодження, пригнічувати формування зародків кристалів льоду та їх збільшення, тим самим підвищувати стійкість плазматичних мембран до дії низьких температур та захищати мікробні клітини від згубної дії заморожування. Експериментальним шляхом нами було визначено оптимальну кінцеву концентрацію гліцерину у поживному середовищі (20 %), що забезпечувала найвищі титри життєздатних клітин після рекультивування.

Об'єктами дослідження було 18 штамів мікроорганізмів різних видів (таблиця 1).

З добової культури, що вирощувалась в оптимальних для кожного виду мікроорганізмів умовах, за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter готували мікробну суспензію у поживному середовищі щільністю, що відповідала концентрації 10^9 КУО/мл, враховуючи поправку на каламутність нативного поживного середовища.

Склад поживного середовища:

- Серцево-мозковий (або триптиказо-соєвий) бульйон – 200 мл;
- Гліцерин фармацевтичний – 50 г (гліцерин можна використовувати як фармацевтичний (85 %), так і хімічно чистий, фармакопейний (99,5 %));
- Суміш розливали у флакони, стерилизували в автоклаві при 0,5 атм. 10 хвилин.

Примітка: для вибагливих мікроорганізмів у поживне середовище додавали сироватку (конячу або великої рогатої худоби) у кінцевій концентрації 10 %.

В кріопробірці (можливо з поліпропіленовими бусинами) об'ємом 2 мл вносили по 1,0 мл мікробної суспензії, пробірки відразу поміщали для зберігання у морозильну камеру при температурі - 20 °С.

Рекультивування досліджуваних штамів проводили через 3, 6, 12, 18, 24, 36 місяців зберігання при температурі - 20 °С.

Вживання мікроорганізмів визначали за методом Коха шляхом висіву мікробних суспензій із розведень від 10^{-1} до 10^{-9} . Кількість мікроорганізмів у 1 мл матеріалу визначали за формулою:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V}$$

де М – кількість КУО/мл матеріалу,
а – середня кількість колоній при висіві з даного розведення,
V – об'єм бактеріальної суспензії, взятої для посіву,

10 – коефіцієнт розведення,
n – порядковий номер розведення.

Кількість КУО виражали у десятковому логарифмі (lg КУО/мл).

Таблиця 1. Показники життєздатності культур мікроорганізмів при різних термінах зберігання у середовищі з гліцерином при температурі - 20 °С

Вид мікроорганізму	Кількість життєздатних клітин (lg КУО/мл) при різних термінах зберіганні культур					
	3 міс.	6 міс.	12 міс.	1,5 роки	2 роки	3 роки
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9,14± 0,50	8,73± 0,36	7,95± 0,42	7,21± 0,35	6,57± 0,41	5,17± 0,20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	9,38± 0,31	9,01± 0,28	8,39± 0,32	8,04± 0,35	7,71± 0,39	6,92± 0,34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8,71± 0,33	8,12± 0,41	7,96± 0,38	7,25± 0,47	6,83± 0,37	6,22± 0,43
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8,25± 0,27	7,04± 0,22	6,27± 0,35	5,29± 0,45	4,18± 0,38	2,04± 0,33
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	9,06± 0,21	8,39± 0,47	8,13± 0,39	7,33± 0,49	6,92± 0,41	5,53± 0,48
<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	8,92± 0,16	8,31± 0,25	8,26± 0,32	8,04± 0,29	7,88± 0,35	7,17± 0,34
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	8,74± 0,41	7,03± 0,39	6,14± 0,45	5,06± 0,51	3,16± 0,47	2,07± 0,49
<i>Corynebacterium diphtheria gravis</i> tox "+" NCTC 10648	8,06± 0,47	7,92± 0,51	7,07± 0,42	6,19± 0,38	4,84± 0,41	3,15± 0,43
<i>Corynebacterium xerosis</i> ATCC 373	9,12± 0,51	8,68± 0,47	7,55± 0,36	6,54± 0,49	4,09± 0,51	3,86± 0,47
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> ATCC 10700	8,59± 0,39	8,14± 0,42	7,29± 0,50	6,51± 0,48	4,81± 0,42	3,07± 0,46
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9127	9,08± 0,50	8,91± 0,46	8,56± 0,42	8,02± 0,37	7,35± 0,46	7,01± 0,49
<i>Salmonella enterica subsp.</i> <i>enterica, serovar Typhimurium</i> № 1721	9,17± 0,34	9,12± 0,43	8,22± 0,47	7,94± 0,50	7,58± 0,47	7,17± 0,41
<i>Shigella flexneri</i> № 4157	8,24± 0,38	8,17± 0,40	8,01± 0,50	7,17± 0,44	6,99± 0,42	6,09± 0,39
<i>Proteus vulgaris</i> № 2091	9,41± 0,50	9,18± 0,34	8,62± 0,44	8,12± 0,41	7,88± 0,45	7,13± 0,42
<i>Enterobacter aerogenes</i> № 418	9,68± 0,22	9,05± 0,38	8,49± 0,41	8,09± 0,46	7,16± 0,39	6,91± 0,43
<i>Bacillus licheniformis</i> № 180	8,98± 0,37	8,72± 0,41	8,15± 0,48	7,95± 0,50	7,62± 0,49	7,02± 0,50
<i>Bacillus stearothermophilus</i> № 181	9,16± 0,44	9,03± 0,39	8,77± 0,41	8,19± 0,46	7,91± 0,42	7,51± 0,49
<i>Clostridioides difficile</i> № 281 A	9,19± 0,37	9,14± 0,46	8,63± 0,39	8,08± 0,42	7,65± 0,44	7,16± 0,34

Отже використання запропонованого нами способу забезпечило виживаність більшості досліджуваних штамів з високими показниками життєздатності ($10^5 - 10^7$ КУО/мл) протягом 3-річного періоду спостереження, а для вибагливих штамів (*E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *C. d. gravis* tox "+" NCTC 10648, *C. xerosis* ATCC 373, *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700) – 1,5 роки.

Таким чином, спосіб, що пропонується до використання у лабораторіях/відділах мікробологічного профілю, вважаємо ефективним для зберігання невибагливих мікроорганізмів без пересівів – 3 роки, а для вибагливих – 1,5 роки.

Висновок. Встановлено високу ефективність способу тривалого зберігання музейних культур мікроорганізмів у поживному середовищі з гліцерином в умовах морозильної камери при температурі - 20 °С.
Алгоритм виконання методики:

1. Приготувати поживне середовище з гліцерином за вказаною вище рецептурою (схемою);
2. У стерильному поживному середовищі з гліцерином з добової культури мікроорганізмів приготувати мікробну суспензію щільністю не менше ніж 4 одиниці за McF.
3. Мікробну суспензію розлити по 1,0 мл у кріопробірки та помістити у морозильну камеру для зберігання штамів при температурі - 20 °C.

Інформаційний лист складено за матеріалами НДР «Дослідження закономірностей еволюції антибіотикорезистентності у найпоширеніших різновидів збудників гнійно-запальних інфекцій» (№ держреєстрації 0118U004052, термін виконання 2018-2020 рр.) та НДР «Дослідження механізмів формування резистентності до бета-лактамних антибіотиків у мікроорганізмів різних таксономічних груп» (№ держреєстрації: 0121U107613, термін виконання 2021-2023 рр.).

(Information letter) Method of long-term storage of museum strains of microorganisms

Valery Minukhin, Nadia Sklyar, Olena Peretyatko, Yulia Yagnyuk, Svetlana Krestetska, Galyna Bolshakova

The method of long-term storage of museum strains in collections is proposed. It consists in the preservation of microorganisms by freezing cultures at a temperature of - 20 °C in a nutrient environment with glycerin. The use of glycerol as a cryoprotectant is due to its ability to increase the viscosity of the medium, cause moderate dehydration of cells during cooling, inhibit the formation of ice crystal nuclei, thereby increasing the resistance of plasma membranes to low temperatures and protecting microbial cells from the harmful effects of freezing. The proposed method will make it possible to optimize the maintenance of microbial collections which are necessary for the effective operation of laboratories/departments of microbiological profile of health care institutions, scientific, scientific research, scientific and industrial institutions.

Key words: museum strains of microorganisms, long-term storage, nutrient medium with glycerin, freezing.