

УДК: 57.083.134:[579.843.94Haemophilus+579.862.1Streptococcus

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ ПРИХОТЛИВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

В.А. Шмыленко, А.П. Бондаренко

ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Российская Федерация

Изложены основные требования, которые необходимо выполнять для обеспечения длительного сохранения бактерий. Предложен новый способ сохранения микроорганизмов. В качестве среды сохранения используется готовая среда Signal blood culture system medium производства фирмы Oxoid, первоначально предназначенная для диагностики бактериального заражения крови. Разработка может найти применение для научно-исследовательских и других лабораторий клинической микробиологии при необходимости сохранения прихотливых бактериальных культур Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae и других, в течение длительного времени, в том числе для длительного хранения музейных штаммов.

Ключевые слова: *прихотливые микроорганизмы, длительное сохранение, способ*

METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE SOLUTION OF THE PROBLEM FOR PRESERVATION OF FASTIDIOUS MICROORGANISMS

V.A. Shmylenko, A.P. Bondarenko

FBIS Khabarovsk scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing, Khabarovsk, Russian Federation

The fundamental requirements have been outlined that must be met to ensure the long-term preservation of bacteria. A new method for preserving microorganisms has been proposed. The ready-to-use medium "Signal blood culture system medium" manufactured by Oxoid, is used. Originally, it was designed for the diagnosis of bacterial contamination of blood. The study can be utilized by the research and development laboratories and other kinds of clinical microbiology laboratories if there is a need to preserve fastidious bacteria cultures like: Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and others for a long period of time, among other things long-term storage of museum strains.

Key words: *fastidious microorganisms, long-term storage, approach*

Введение

В своей работе бактериологи исследовательских центров, музейных коллекций и практических лабораторий ежедневно сталкиваются с потребностью сохранять микроорганизмы в течение длительного времени. В каждой бактериологической лаборатории есть музей живых культур микроорганизмов, который используется для обучения, в исследовательских целях и для внутрилабораторного контроля. Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их свойств являются важными условиями научной и практической работы с микроорганизмами. Основными целями хранения является поддержание жизнедеятельности микробных клеток и чистоты культур, а также предупреждение изменений их свойств и мутаций, т.е. сохранение микроорганизма в состоянии, максимально близком к исходно выделенному штамму. Практика консервации и расконсервации микроорганизмов эмпирически выработала ряд приёмов, основанных на знании механизмов погружения клеток в анабиотическое состояние и выхода из него.

Однако эффективная консервация с полным сохранением популяций и геномов разнообразных микроорганизмов представляет собой пока ещё не решённую проблему, нуждающуюся в дальнейшем изучении. Так, известно, что способность сохранять жизнеспособность в определённых условиях консервации связана не только с родом и видом микроорганизмов, но и с другими свойствами бактерий [6]. Поэтому работы, позволяющие иметь более чёткие представления по управлению процессами консервации и восстановления жизнеспособности конкретных и особенно прихотливых микроорганизмов, представляются актуальными.

Среди методов хранения микроорганизмов, практикуемых в различного ранга коллекциях живых культур, различают два основных подхода:

1. Методы непродолжительного хранения микроорганизмов.

Методы первой группы являются самыми простыми, доступными и широко используются в повседневной работе с микроорганизмами:

- субкультивирование (пересев на свежие агаризованные среды);
- хранение под минеральным маслом;
- хранение в высушенном состоянии на полосках фильтровальной бумаги или бумажных дисках;
- хранение замораживанием от -10°C до -20°C, и ряд других методов.

Методы первой группы позволяют сохранять микроорганизмы от нескольких недель, месяцев до одного года. Имеют ряд недостатков (диссоциация микроорганизмов, загрязнение, неконтролируемая селекция мутантов микроорганизмов, не гарантированный срок сохранения жизнеспособности и т.д.). Неправильный выбор поддерживающей среды может привести к потере микроорганизма. Большинство методов непригодно для сохранения прихотливых микроорганизмов, таких как *S. pneumoniae* и *H. influenzae*.

2. Методы длительного хранения микроорганизмов.

- глубокое замораживание, или криоконсервация микроорганизмов (от минус 70°C до минус 196°C);
- лиофильное высушивание (из замороженного состояния) или высушивание из жидкого состояния.

Криоконсервация осуществляется в сосудах с жидким газом (азотом) или в стационарных морозильных камерах. Заморозка проводится путём посева микроорганизмов в специальные среды сохранения с добавлением криопротекторов, обеспечивающих внутриклеточную и (или) внеклеточную защиту микроба от повреждающих факторов в процессе замораживания и размораживания. В качестве среды сохранения используют различные субстраты, но больший процент биомассы микроорганизмов при расконсервации сохраняется при использовании богатых по составу питательных сред [2,3]. Это особенно важно учитывать при сохранении прихотливых микроорганизмов.

Леофильное высушивание обеспечивает наиболее длительное хранение микроорганизмов, но выполняется на дорогостоящем оборудовании, что малодоступно для лабораторной практики.

Таким образом, исследовательские программы, включающие разработку новых методических приёмов для консервации микроорганизмов, будут способствовать расширению возможностей для полноценного лабораторного хранения рабочих и коллекционных штаммов.

Цель исследования - разработать способ длительного хранения прихотливых микроорганизмов таких как *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*.

Материалы и методы

При разработке способа проведены патентный поиск и исследования по трём направлениям:

- 1) Выбор среды сохранения прихотливых микроорганизмов;
- 2) Выбор криопротектора;
- 3) Определение температуры криоконсервации.

1. Выбор среды сохранения.

Бактерии рода *Streptococcus*, в том числе *Streptococcus pneumoniae*, нуждаются в особых условиях культивирования. К питательным средам обычно добавляют кровь и сыворотку крупного рогатого скота или лошадиную сыворотку, для роста требуется повышенная концентрация CO₂. Хранение культур в обычных условиях затруднено вследствие склонности пневмококка к аутолизу.

Бактерии рода *Haemophilus* также относят к труднокультивируемым микробам – все виды гемофильных бактерий нуждаются в присутствии в питательной среде ростовых факторов V и X, источником которых являются эритроциты крови [2].

Выбор среды сохранения микроорганизмов должен основываться на питательных потребностях патогенов. Правильный выбор сред важен как для накопления микроорганизмов (жизнеспособность микроорганизмов значительно повышается, если исходная концентрация микробных клеток в суспензии была высокой, порядка 10⁹-10¹¹ кл/мл), так и для защиты клеток в процессе криоконсервации и расконсервации. Более концентрированная суспензия клеток имеет более высокий титр выживания при размораживании, чем разбавленная суспензия [13].

Для обеспечения ростовых потребностей *Streptococcus pneumoniae* в состав искусственных питательных сред должны входить аминокислоты (лизин, аргинин, метионин, треонин, гистидин, глицин, цистеин, аспарагин, изолейцин, валин и глютаминовая кислота). Необходимыми компонентами питательных сред также являются холин, витамины группы B. Учитывая физиологические потребности прихотливых микроорганизмов в качестве основ питательных сред используются гидролизаты мяса, сои, казеина, куриные эмбрионы, продукты ферментативного гидролиза плаценты человека [1,2]. Известны некоторые способы хранения прихотливых микроорганизмов:

- на яично-желточной среде Дорса при комнатной температуре (до 4-6 месяцев для пневмококков) [4,5]. Недостатками метода являются – короткий срок хранения, невозможность культивирования *Haemophilus influenzae*.

- на стерильной дефибринированной крови кролика при температуре ниже минус 40°C [16]. Недостатком метода является то, что стерильная дефибринированная кровь кролика является недоступным компонентом для практических лабораторий.

- на консервированной донорской человеческой цельной крови, содержащей гемоконсервант ЦФДА-1 (общепринятая аббревиатура торгового названия гемоконсерванта) при температуре минус 20°C [12]. Недостаток метода - возможное содержание антител к возбудителям инфекционных болезней и вследствие этого гибель сохраняемой культуры, незначительный срок хранения – один год, невозможность дальнейшего хранения после расконсервации.

Несмотря на то, что предложенные среды обеспечивают типичный рост пневмококков и гемофилов, использование в них нестандартизованных компонентов существенно снижает их эффективность. Поэтому эффективное долговременное сохранение прихотливых микроорганизмов возможно только при использовании качественной, богатой по составу питательных веществ и стандартизированной среды [13].

2. Выбор криопротектора.

Криопротекторы – вещества, способные предотвращать развитие повреждений биологических объектов при охлаждении, замораживании и последующем отогреве. К настоящему времени известно свыше 100 соединений в качестве криопротекторов (спирты, амины, аминокислоты и их амиды, оксиды, углеводы, белки, природные и искусственные полимеры, неорганические соли и др.). Однако многие из известных криопротекторов могут оказывать на клетки токсическое действие, величина которого зависит от температуры и длительности экспозиции клеток с криопротектором. Поэтому, в большинстве случаев, сразу после оттаивания удаляют криопротектор из клеток и среды путём последовательных отмываний и центрифугирования [6,7,8,11]. В качестве криопротекторов в микробиологии обычно используют 10, 15, 20, 30% растворы глицерина [6,10,13,14]; 5, 7% растворы диметилсульфоксида (ДМСО); 12, 24% растворы сахарозы, а также глицерин и ДМСО в сочетании с глюкозой или сахарозой [6,7,9,13]. Для нашего способа в качестве криопротектора был выбран глицерин т.к. он обеспечивает и внутриклеточную, и внеклеточную защиту микроорганизмов от повреждающих факторов. Для дальнейшей исследовательской работы с микроорганизмами не требуется отмывать и центрифугировать состав.

3. Определение температуры криоконсервации.

В настоящее время криоконсервация (криоанабиоз) является наиболее перспективным методом долгосрочного хранения микроорганизмов. При криоконсервации удаётся получить высокий уровень жизнеспособных клеток, титр которых при длительном хранении при температуре от минус 70°C до минус 196°C сохраняется на исходном уровне, что делает практически неограниченным возможное время хранения [6]. Существенным преимуществом криоконсервации перед высушиванием и лиофилизацией является возможность сохранения высокой биохимической активности и генетической стабильности [3]. Наиболее доступным методом для практических и научно-исследовательских лабораторий является криоконсервация в морозильниках при -70°C -80°C.

Известен способ сохранения бактерий путём замораживания при температуре минус 80°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 30% глицерина [14,15]. В этом способе используется триптиказо-соевый бульон в виде сухой среды для приготовления бульона в условиях лаборатории или жидкой среды, готовой к использованию. Недостаток метода - недостаточный набор питательных компонентов [2].

Нами предложен способ длительного хранения прихотливых микроорганизмов таких, как *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и др., который основан на применении в качестве среды сохранения готовой среды Signal blood culture system medium фирмы Oxoid, первоначально предназначенной для диагностики инфекций кровотока, с добавлением 30% глицерина и дальнейшим хранением проб при $t = - 80^{\circ}\text{C}$. Способ обеспечивает гарантированную выживаемость прихотливых микроорганизмов в течение длительного времени. В 2018 году получено положительное решение на заявленную разработку (заявка на патент № 2017119140 «Способ длительного хранения прихотливых микроорганизмов»).

Описание метода:

Готовая среда Signal blood culture system medium производится фирмой Oxoid, Великобритания, каталожный номер BCO 102M. Среда представляет собой жидкий стерильный раствор в стерильном флаконе ёмкостью 84 мл, полностью готовый к использованию в качестве среды сохранения. Состав среды стимулирует рост аэробных, анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов. Исключён «человеческий фактор» в процессе приготовления среды, что обеспечивает стабильность результата. Среда хранится при t от +18°C до +25°, срок годности 2 года. Среда изначально предназначена для посева крови заболевших лиц с целью выделения даже минимальных количеств прихотливых микроорганизмов. В состав среды Signal blood culture system medium входят: триптонно-соевый бульон, желатиновый пептон, дрожжевой экстракт, мясной экстракт,

поваренная соль, нитрат калия, глюкоза, L- аргинин, пируват натрия, желатин, тиогликоль натрия, цистеин HCl, двууглекислая сода, фосфатный буфер, полианетол сульфат натрий, дитиотреитол, аденин сульфат, янтарнокислый натрий, хлорид аммония, сульфат магния, витамин К.

Приготовление рабочего раствора среды:

1) Для приготовления рабочего раствора среды сохранения (среда + криопротектор) среда Signal blood culture system medium наливается стерильным шприцем в количестве 7 мл в стерильную пробирку ёмкостью 10-15 мл. Затем в эту же пробирку добавляется 3 мл глицерина, предварительно простерилизованного 15 мин. при давлении 0,5 атм.

2) Пробирки типа Eppendorf из полипропилена помещают с открытыми крышками в крафт-пакеты по 10 штук, стерилизуют автоклавированием при t 120°C – 45 мин. [17]. Срок хранения стерильных пробирок типа Eppendorf трое суток.

3) Рабочий раствор должен быть сразу разлит в стерильные пробирки типа Eppendorf в ламинарном боксе 2 класса биологической защиты по 1 мл. Далее эппендорфы со средой хранятся в штативе при t 2-8°C 7-10 дней.

Способ осуществляется следующим образом:

1) Культуры Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae для длительного сохранения путём замораживания в стерильной среде Signal blood culture system medium с добавлением глицерина предварительно выращивают на кровяном агаре с добавлением 10% лошадиной сыворотки (Streptococcus pneumoniae) и на шоколадном агаре (Haemophilus influenzae) в атмосфере повышенной концентрации CO₂ 18-24 часа [1,2].

2) Стерильным одноразовым тампоном-зондом из вискозы снимают с агара видимый рост бактерий. Затем тампон-зонд помещают в пробирку типа Eppendorf со средой сохранения, интенсивно суспендируют его и вынимают, отжав о внутреннюю стенку пробирки.

3) Пробирки типа Eppendorf с культурой маркируют маркером по стеклу, обозначая название, номер культуры, дату заморозки. Каждый штамм сохраняется в 5 экземплярах, чтобы протестировать жизнеспособность бактерий через 3 мес., 6 мес., 12 мес., 1,5 года и 2 года консервации. При обычном сохранении, исключая исследовательские задачи по определению выживаемости бактерий, каждый штамм сохраняем в нескольких (от 3 до 5) экземплярах.

4) Подписанные пробирки с культурой без дополнительного подращивания помещают в штатив и затем в морозильную камеру при t-80°C.

5) Для расконсервации сохраняемой культуры одноразовой пластиковой бактериологической петлей прокалывается замороженная среда. Затем взятая на петлю масса растирается по поверхности кровяного (шоколадного) агара штриховым способом. Чашки инкубируют при t 37°C в атмосфере повышенной концентрации CO₂ 18-24 часа.

6) После посева пробирка с замороженной культурой вновь помещается в морозильник.

Результаты исследования

Нами было протестировано хранение предлагаемым способом 60 штаммов бактерий: 30 штаммов Streptococcus pneumoniae, 30 штаммов Haemophilus influenzae. Результаты исследований, приведённые в таблице 1, показали, что все 60 культур сохранили свою жизнеспособность в течение 2-х лет хранения на испытываемой среде.

Таблица 1.

Изучение жизнеспособности культур при длительном сохранении бактерий в среде Signal blood culture system medium с добавлением глицерина при t - 80°C.

Число сохраняемых штаммов	Число жизнеспособных штаммов через различные сроки хранения					
	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.	Итого
S.pneumoniae-30	30	30	30	30	30	150
H.influenzae-30	30	30	30	30	30	150
Всего	60	60	60	60	60	300

Преимуществом разработанного метода является то, что среда Signal blood culture system medium с добавлением глицерина в качестве криопротектора стандартизована по составу, стерильна, содержит большой набор питательных компонентов и ростовых факторов, исключён «человеческий фактор» в процессе приготовления среды. Среда обеспечивает выживаемость в высоком титре максимального количества проб с прихотливыми микроорганизмами, жизнеспособность и возобновление культивирования сохраняемых бактерий в течение минимум 2-х лет хранения. Культуры закладываются на хранение без дополнительного подращивания в термостате, из одной пробирки можно делать высев несколько раз без полного оттаивания, исключён трудоёмкий этап «оживления» микроорганизмов после расконсервации. Дополнительным преимуществом является то,

что микробиологическая лаборатория, выполняющая исследования крови на стерильность с использованием среды Signal blood culture system medium, может без дополнительных затрат времени и денежных средств на приобретение другой среды сохранять лабораторные штаммы для последующего изучения.

Вывод: Разработка может найти применение для научно-исследовательских и других лабораторий клинической микробиологии при необходимости сохранения прихотливых бактериальных культур *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* в течение длительного времени, в том числе для длительного хранения музейных штаммов.

Литература

1. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований/ под редакцией А.С.Лабинской, Л.П.Блинковой, А.С. Ещиной. - М.: Медицина, 2005.-600с.
2. Методики клинических лабораторных исследований.: Справочное пособие, Том 3, Клиническая микробиология / под редакцией В.В. Меньшикова. М.: Лабора, 2009.- 879с.
3. В.Д. Похиленко Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. - 2009.-№4 (12).- С.99-121.
4. Wasas A.D., Huebner R.E., De Blanch M, Klugman K.P. Long-term survival of *Streptococcus pneumoniae* at room temperature on Dorset egg medium. J Clin Microbiol.- 1998.-36. – P. 1139-1140.
5. Ajello G.W., Feeley J.C., Hayes P.S., reingold A.L., Bolan G., Broome C.V., Phillips C.J. Transisolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenza* // J Clin Microbiol. – 1984. -20. – P. 55-58.
6. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения: пер. с англ./ О. Смит.- М., 1963.-430 с.
7. А.М. Белоус Криоконсерванты / А.М. Белоус, М.И. Шраго, Н.С. Пушкарь.-Киев : Наукова думка, 1979.-198 с.
8. Патент 2008348 Российская Федерация, С 12 N1/04, 1994.Способ хранения культур микроорганизмов / Афиногенов Г.Е., Доморад А.А., Шамолина И.И., Краснова М.В.; опубл.28.02.94, Бюл. №4.
9. Патент 2045573 Российская Федерация, С 12 N1/04, 1995. Состав для хранения бактерий / Плотников О.П., Маркова Л.И., Виноградова Н.А., Харченко В.Г., Казаринова Т.Д.; опубл. 10.10.95, Бюл. №28.
10. Брюханов, А.Л. Длительное хранение строго анаэробных микроорганизмов в глицерине / А.Л. Брюханов, А.И. Нетрусов // Прикладная биохимия и микробиология.- 2006.-Т.42.-№2.- С.2000-2003.
11. Патент 2185435 Российская Федерация, С 12 N1/04, 2001. Способ хранения культур микроорганизмов / Ильин Д.Ю., Блинохватов А.Ф., Ильина Г.В., Иванов А.И.: опубл. 20.07.02, Бюл. №20.
12. Патент 2535984 Российская Федерация, С 12 N1/04, 2014. Способ длительного хранения прихотливых бактерий в консервированной цельной донорской крови путём замораживания / Боронина Л.Г., Суматова Е.В., Кукушкина М.П.: опубл. 20.12.2014, Бюл. №35.
13. Патент 2123044 Российская Федерация, С 12 N1/04, 2011. Способ длительного хранения естественных симбиотических ассоциаций микроорганизмов человека и животных / Шендеров Б.А., Гахова Э.Н., Манвелова М.А., Пиорунский Д.А., Карнаухов В.Н.: опубл.10.12.1998.
14. Протасова И.Н. Смена серотипов *Streptococcus pneumoniae* у детей, вакцинированных 7-валентной конъюгированной вакциной / И.Н. Протасова, Н.В. Бахарева, О.В. Перьянова, Т.А. Елистратова, М.В. Коваль // Эпидемиология и вакцинопрофилактика.-2014.-№5(78).-С.67-71.
15. Маянский Н.А. Определение капсульных серотипов пневмококка методом мультиплексной ПЦР /Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, Л.К. Катосова, Т.А. Гречуха, В.Г. Пинелис, Л.С. Намазова-Баранова // Вопросы диагностики в педиатрии.-2010.-Том 2.-№6.-С.6-11.
16. «Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных)». Пер. с англ. Р.Вейант, У.Мосс, Р.Уивер, Д.Холлис, Дж.Джордан, Э.Кук, М.Дейншвар.-М.: Мир,1999.-791с., - Стр..56
17. ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы» - Стр.9.

Сведения об авторах:

Ответственный автор: *Шмыленко Влада Александровна* - младший научный сотрудник лаборатории бактериальных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, тел. 8(4212)32-88-93, e-mail: adm@hniiem.ru