

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ
В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

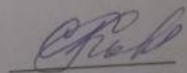
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Ригина Никиты Олеговича

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук


30.05.2022 г. Е.С. Тучина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
профессор, докт. биол. наук


30.05.2022 г. С.А. Коннова

Саратов 2022

Введение. Микроорганизмы широко распространены в природе и обнаруживаются во всех природных средах. Подсчет микроорганизмов является фундаментом для проведения многих лабораторных исследований. Разработка наиболее точных и доступных методов подсчета ведется на протяжении всего времени существования микробиологической науки.

Многочисленные процедуры в биологии и медицине требуют подсчета клеток. Почти во всех случаях подсчитывается концентрация клеток. Подсчитав клетки в известном объеме культуры, можно оценить концентрацию. Определение численности микроорганизмов в пищевом продукте или на поверхностях, вступающих с ним в контакт, является неотъемлемой составной частью любого контроля и системы оценки качества. В медицине концентрация различных клеток крови, таких как эритроциты или лейкоциты позволяет дать важную информацию о здоровье человека. Точно так же концентрация бактерий, вирусов и других патогенов в крови или жидкостях организма позволяет дать информацию о развитии инфекционного заболевания и о том, как иммунная система человека справляется с инфекцией. Знание концентрации клеток важно в экспериментах по молекулярной биологии, чтобы регулировать количество реагентов и химических веществ, применяемых в эксперименте [1-6].

Рост бактериальной популяции (в пробирке или в их естественной среде обитания) происходит быстро. Типичная колония содержит сотни тысяч клеток, а бульонная культура может содержать миллиарды. Поскольку бактерии размножаются экспоненциально, их популяции достигают больших количеств очень быстро. По этой причине очень важно, чтобы микробиологи разработали методы определения численности популяции. Некоторые из этих методов включают определение числа клеток, в то время как другие измеряют общую массу популяции в граммах [2-5].

Регистрация и прогнозирование скорости и динамики роста бактериальных культур является актуальной задачей во многих отраслях промышленности и медицины [7]. Адаптация методов подсчета численности

бактериальных популяций к определенным лабораторным условиям крайне важна, поскольку кривая роста находится в зависимости от множества внешних параметров, таких как температура, влажность, состав используемых сред, а также от физиологических особенностей штаммов используемых в исследованиях.

В связи с вышесказанным, цель данной работы заключалась в оптимизации имеющихся методов подсчета бактериальных клеток при оценке эффективности фотодинамического воздействия.

Для реализации поставленной цели в ходе работы решались следующие задачи:

- 1) изучить разнообразие методов определения численности микроорганизмов;
- 2) оценить степень корреляции данных метода подсчета колониеобразующих единиц и метода определения оптической плотности бактериальных суспензий;
- 3) определить значение фазы роста бактериальных клеток на достоверность полученных результатов.

В качестве объектов исследования использовали: 1) музейный штамм *Staphylococcus aureus* 209 P, полученный из коллекции культур (ГИСК им. Л. А. Тарасевича, Москва, Россия); 2) штамм *Pseudomonas syringae* 11, выделенный из гнили фруктов и овощей. Использовали 24-х часовые культуры, которые выращивались на плотных питательных средах (ГРМ-агар; КВС) при 27°C и 37°C.

Для введения в стационарную фазу роста бактериальные культуры предварительно подвергались стандартизации (1.0 ед на приборе "Densi-Lameter II" (Эрба-Лахема, Чехия)), после чего культуры инокулировали в жидкую питательную среду (0,5% пептон для *S. aureus* 209 P, жидкая КВС для *P. syringae* 11) и культивировали в течение 12-14 часов при оптимальной температуре 37°C.

Согласно спектрофотометрическому методу в течение 3 ч измерения проводятся каждые 15 мин до тех пор, пока оптическая плотность суспензии не перестанет увеличиваться. В работе использовали длину волны измерения 655 нм [8].

По истечению времени, 12-14 ч для *S. aureus* 209 Р и 16-18 ч для *P. syringae* 11, культуры подвергались серии разведений в 10^3 , 10^4 , 10^5 м.к./мл, после чего 0,1 мл взвеси каждого разведения высевались на чашки Петри с плотной питательной средой, а также в объеме 0,03 мл в жидкую питательную среду в полистирольном планшете со средним диаметром ячеек 10 мм. Посевы помещали в термостат с оптимальной температурой для культивирования в течении 24 ч.

Для оценки влияния фазы роста бактериальных клеток на достоверность экспериментов по фотодинамическому воздействию с выбранными параметрами (таблица 1) проводили облучение культур: 1) выращенных в течение 24 ч на плотной питательной среде; 2) находящихся в стационарной фазе роста в жидкой среде.

Таблица 1 – Параметры источников оптического излучения, использованных в работе

Обозначение	Тип излучения	Длина волны, нм	Плотность мощности, мВт/см ²
УФИ	светодиодное	405	31
ИКЛИ	лазерное	808	45

Взвеси культур объемом 1 мл чего подвергались облучению в течение 5, 10, 15, 30 минут. После чего 0,1 мл взвеси рассеивали на плотную питательную среду при помощи стеклянного шпателя, с дальнейшим

помещением в термостат на 24-48 часов. В качестве контроля принимали количественные показатели суспензий, не подвергавшихся облучению. Изменение численности бактерий вычисляли отношением количественных показателей (КП = КОЕ или OD) после обработки к отношению КП контрольных образцов.

$$\text{Численность} = \text{КП (опыт)} / \text{КП (контроль)} * 100\%$$

Учет результатов осуществляли путем измерения оптической плотности бактерий на планшетном фотометре iMark производства компании Bio Rad, а также подсчетом КОЕ на чашках Петри. Все эксперименты проводились с десятикратной повторностью.

Полученные данные обрабатывались в программе Statistica 10 при использовании р-критерия и коррелировались между собой.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы, и список использованных источников, включающий 52 источника на русском, английском и немецком языках. Работа изложена на 43 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 11 рисунками и 1 таблицей.

Основное содержание работы. Отслеживание фаз роста бактериальных культур при помощи спектрофотометрического метода показало, что культура *S. aureus* 209 Р достигает стационарной фазы роста спустя 12-14 часов. Это было выявлено путем измерения оптической плотности каждые 15 минут в течение 3 часов спустя 3, 6, 12 часов после инокуляции культуры в жидкую среду. Средние результаты измерения оптической плотности отображены на рисунке 1.

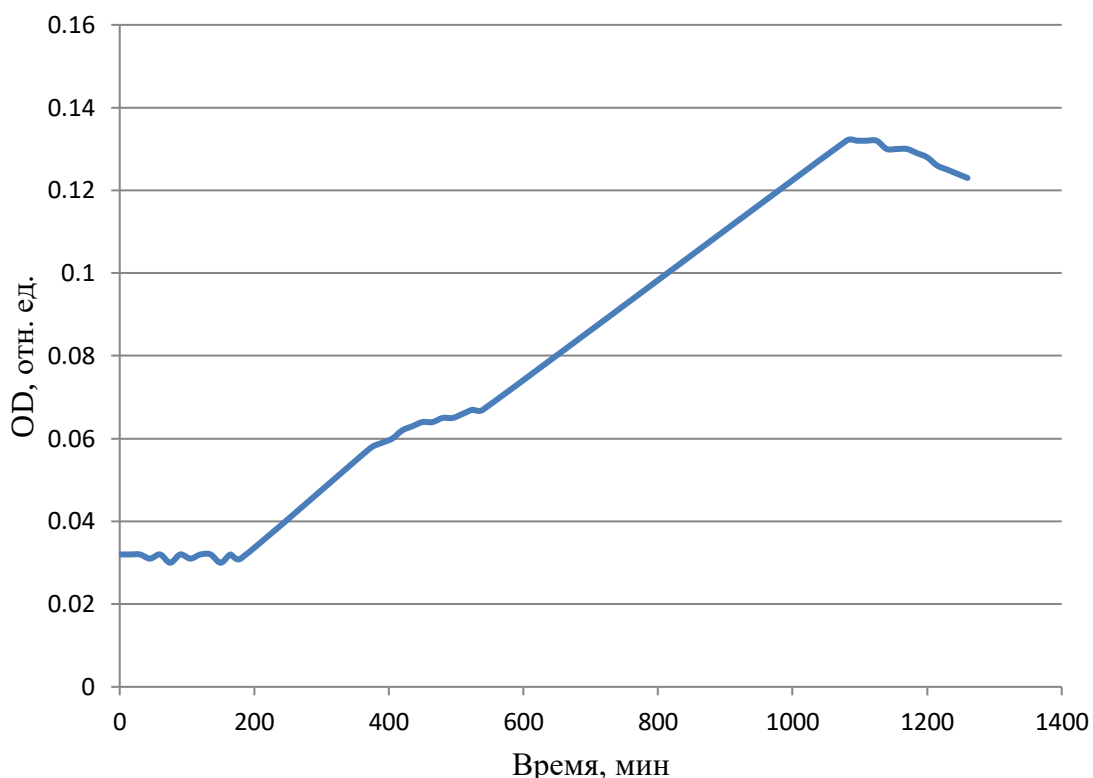


Рисунок 1 – Кривая роста *S. aureus* 209 P

К заключению о том, что стационарная фаза наступает на 12-14 ч можно прийти в связи с тем, что наблюдается стабилизация роста, а затем его снижение, что говорит о переходе к фазе гибели. Данные результаты согласуются с литературными данными [7].

При использовании того же метода на культуру *Pseudomonas syringae* были получены другие данные. *P. syringae* 11 достигает стационарной фазы роста спустя 14-16 часов. Это было выявлено путем измерения оптической плотности каждые 15 минут в течение 3 часов спустя 3, 6, 12, 16 часов после инокуляции культуры в жидкую среду. Средние результаты измерения оптической плотности отображены на рисунке 2.

Можно видеть, что стационарная фаза наступает позже, чем это было у *S. aureus* 209 P, так как стабилизация роста и его снижение наступает на 14-16 часах исследования.

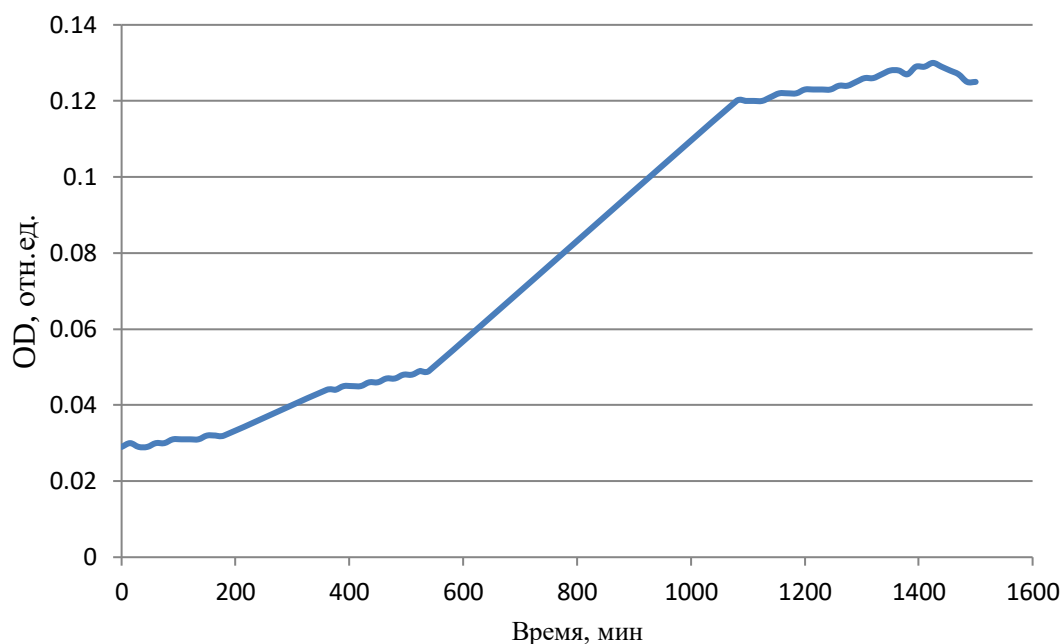


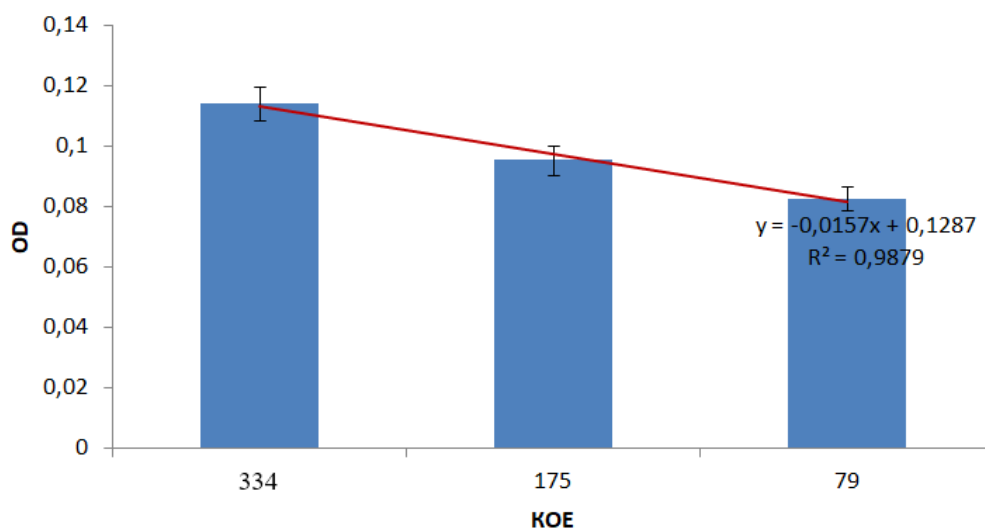
Рисунок 2 - Кривая роста *P. syringae* 11

Изначально корреляцию полученных КОЕ и OD *S. aureus* 209 Р планировалось проверять без введения в стационарную фазу, но результаты показали, что такие данные не коррелируют между собой, так как корреляция составила всего лишь 7%, 2,4%, 7,1% при различных разведениях.

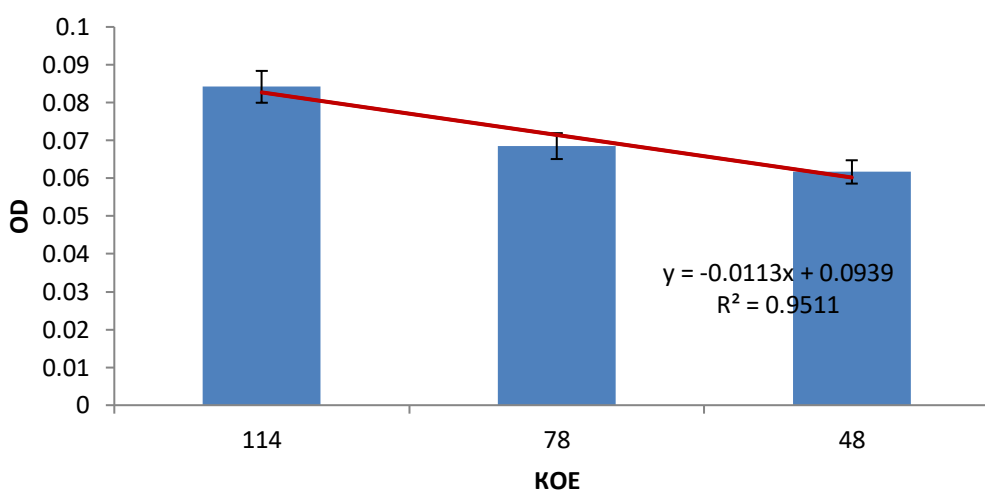
Поэтому было принято решение вводить культуры в стационарную фазу и проводить само исследование.

Был проведен классический эксперимент с культивированием культур клеток на твердой питательной среде в чашках Петри и в жидкой питательной среде в бактериологическом планшете после введения их в стационарную фазу. Спустя сутки происходил подсчет КОЕ и оптической плотности. На основании полученных данных были составлены графики для *S. aureus* 209 Р и *P. syringae* 11 (рисунок 3).

Была проведена статистическая обработка результатов и выявлено, что КОЕ и оптическая плотность коррелируют между собой в достаточной степени, для *S. aureus* 209 Р корреляция между КОЕ и OD составляет 99%, а в случае с *P. syringae* 11 она составляет 98,5%, что является высокой степенью корреляции.



А



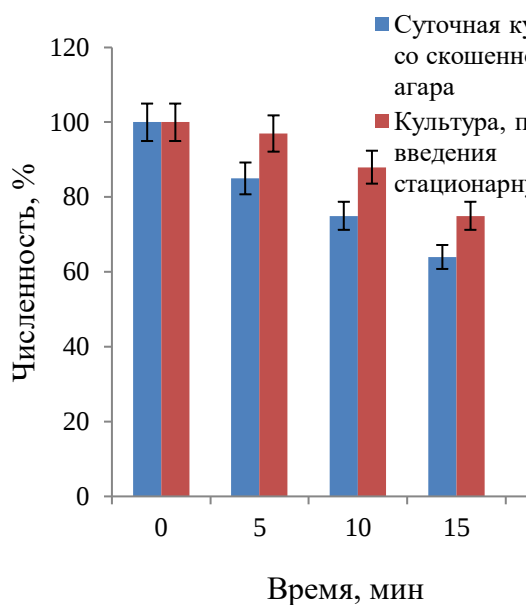
Б

А) *S. aureus* 209 P; Б) *P. syringae* 11

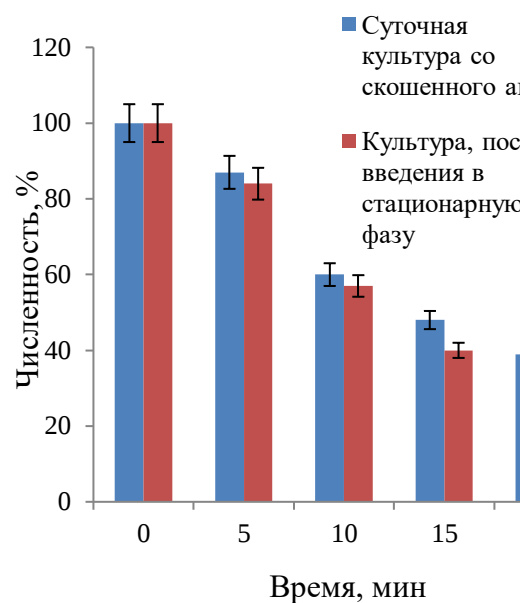
Рисунок 3 – Сравнение количественных показателей бактериальных суспензий при использовании методов подсчета КОЕ и регистрации OD

Для проверки влияния стационарной фазы на достоверность и динамику результатов был проведен эксперимент с облучением культур светодиодным и лазерным излучением длиной волны 405 и 808 нм соответственно.

Исследование показало, что полученные данные между обычной 24 часовой культурой и введенной в стационарную фазу отличаются, что было отображено на графиках зависимости численности от времени облучения (рисунок 4, 5).



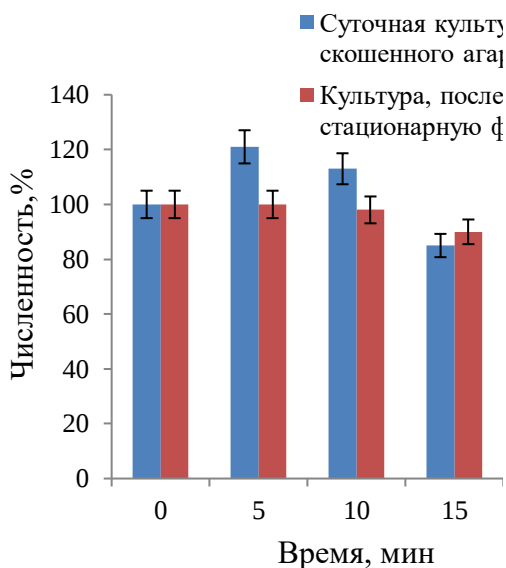
А



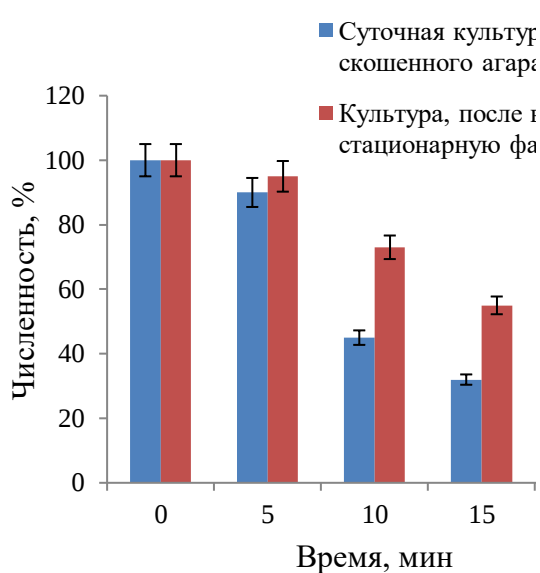
Б

А) *S. aureus* 209 P; Б) *P. syringae* 11

Рисунок 4 – Изменение численности бактерий под действием синего (405 нм) светодиодного излучения



А



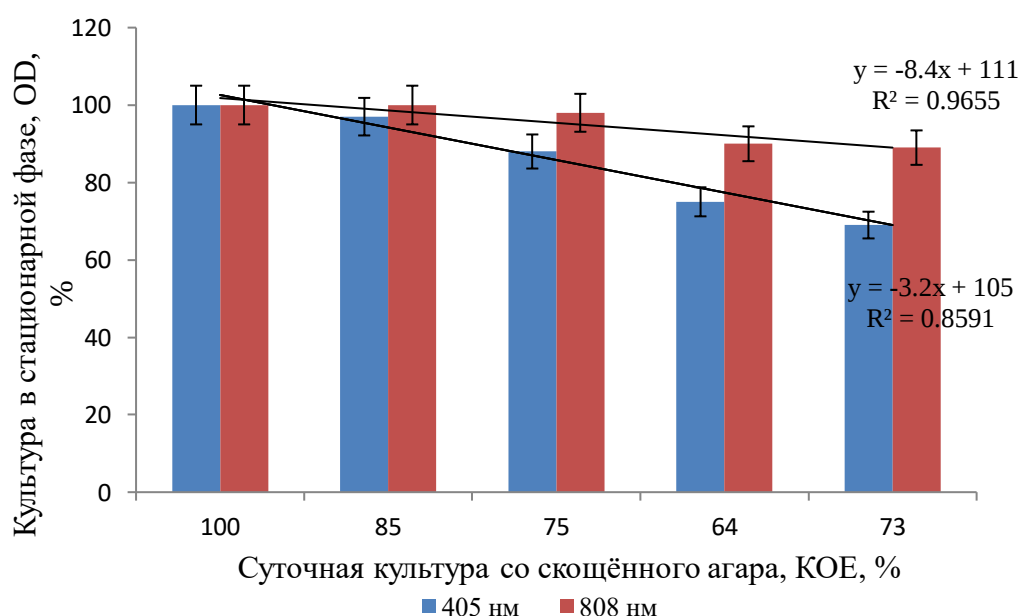
Б

А) *S. aureus* 209 P; Б) *P. syringae* 11

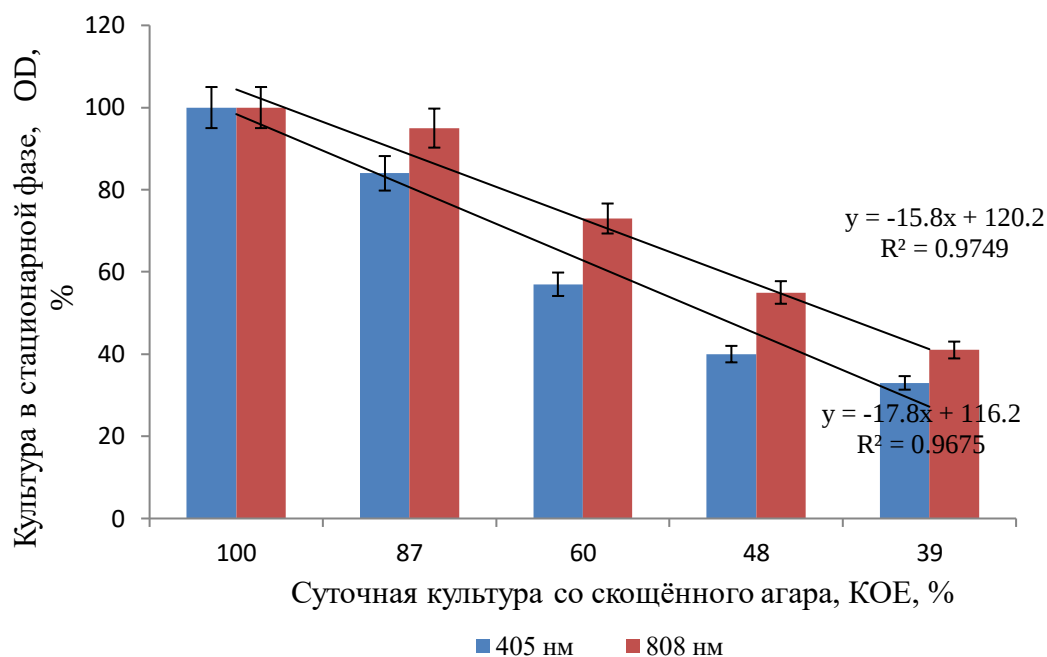
Рисунок 5 – Изменение численности бактерий под действием инфракрасного (808 нм) лазерного излучения

Основываясь на полученных данных можно судить о том, что между культурой суточной и введенной в стационарную фазу есть различия. В случае *S. aureus* 209 P при светодиодном облучении показатели численности были выше у культуры, введенной в стационарную фазу, кроме 30 минуты облучения. В то время как при лазерном облучении на 5, 10, 30 минутах показатели численности суточной культуры были выше. Корреляция между данными количественных показателей составляет 83,4% и 80,2% для разного вида излучения соответственно, что является средней степенью корреляции.

Анализируя данные полученные для *P. syringae* 11 можно говорить о том, что между культурой суточной и введенной в стационарную фазу есть различия. При светодиодном облучении численность суточной культуры была выше на протяжении всего времени эксперимента. В случае с лазерным облучением показатели численности культуры введенной в стационарную фазу на протяжении 5, 10, 15 минуты были выше, чем у суточной культуры. Корреляция между данными количественных показателей составляет 99,8% и 87,2% для разного вида излучения соответственно, что в свою очередь является высокой степенью корреляции (рисунок 6).



А



Б

А) *S. aureus* 209 P; Б) *P. syringae* 11

Рисунок 6 – Сравнение данных чувствительности бактерий к фотодинамическому воздействию в зависимости от фазы роста культур

Заключение. Исходя из проанализированной литературы, можно прийти к заключению о том, что наиболее распространенным методом подсчета микроорганизмов является спектрофотометрический. Его преимущества заключаются в том, что измерения чрезвычайно быстры, недороги, просты, относительно безвредны, быстро действуют и легко автоматизируются.

В результате проведенных экспериментов можно судить о том, что введение в стационарную фазу необходимо для повышения достоверности, а также оно влияет на динамику результатов.

В целом можно сказать, что полученные в ходе исследования данные корреляции дают возможность сократить затраты и время эксперимента в связи с тем, что можно засеять культуру на бактериологический планшет и в дальнейшем вывести коэффициент корреляции и перевести полученные данные в КОЕ.

Выводы.

1. В результате эксперимента было установлено, что культура *S. aureus* 209 P входит в стационарную фазу спустя 12-14 часов после её инокулирования в среду.

2. В результате эксперимента было установлено, что культура *P. syringae* 11 входит в стационарную фазу спустя 16-18 часов после её инокулирования в среду.

3. Исходя из полученных данных можно сказать о том, что если ввести культуру *S. aureus* 209 P в стационарную фазу, то показатели ее КОЕ и OD будут коррелировать между собой и эта корреляция составляет 99%.

4. Показано, корреляция количественных показателей культуры *P. syringae* 11, введенной в стационарную фазу, составила 98,5%.

5. Введение культуры в стационарную фазу повышает достоверность экспериментов по фотодинамическому воздействию на исследуемые штаммы.

Список использованных источников

1. Counting bacteria [Электронный ресурс]. – URL: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/counting-bacteria/> (дата обращения: 10.05.2021). – Загл. с экрана. – Яз. англ.

2 Determination of microbial numbers [Электронный ресурс]. – URL: https://biosci.sierracollege.edu/materials/4/laboratory_syllabus/determination_of_microbial_numbers.pdf (дата обращения: 10.05.2021). – Загл. с экрана. – Яз. англ.

3 Wintrobe, M.M. Blood, pure and eloquent: a story of discovery, of people, and of ideas / M.M. Wintrobe. – New York: «McGraw-Hill Book Company», 1980. – 770 p.

4 Mohandas, N. Red cell membrane: past, present, and future / N. Mohandas, PG Gallagher. – Washington DC: «American Society of Hematology», 2008. – P. 3939–3948

5 Виноградова, Г. Н. История науки и приборостроения / Г.Н. Виноградова. – СПб: НИУ ИТМО, 2012. – 157 с.

6 Галанин, Д.Д. Электронный микроскоп / Д.Д. Галанин // Наука и жизнь. – 2009. – N. 10. – С. 2–5.

7 Zaccanti, G. Measurements of optical properties of high-density media / G. Zaccanti, S. Del Bianco, F. Martelli // Appl Opt. – 2003. – V. 42, N. 19. – P. 4023–4030.

8 Bacterial Growth Curves using a Spectrophotometer (Turbidimetric Determination) [Электронный ресурс]. – URL: <https://info.gbiosciences.com/blog/bacterial-growth-curves-turbidimetric-determination> (дата обращения: 20.06.2021). – Загл. с экрана. – Яз. англ.

