



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89508

(13) U

(51) МПК

C12Q 1/24 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

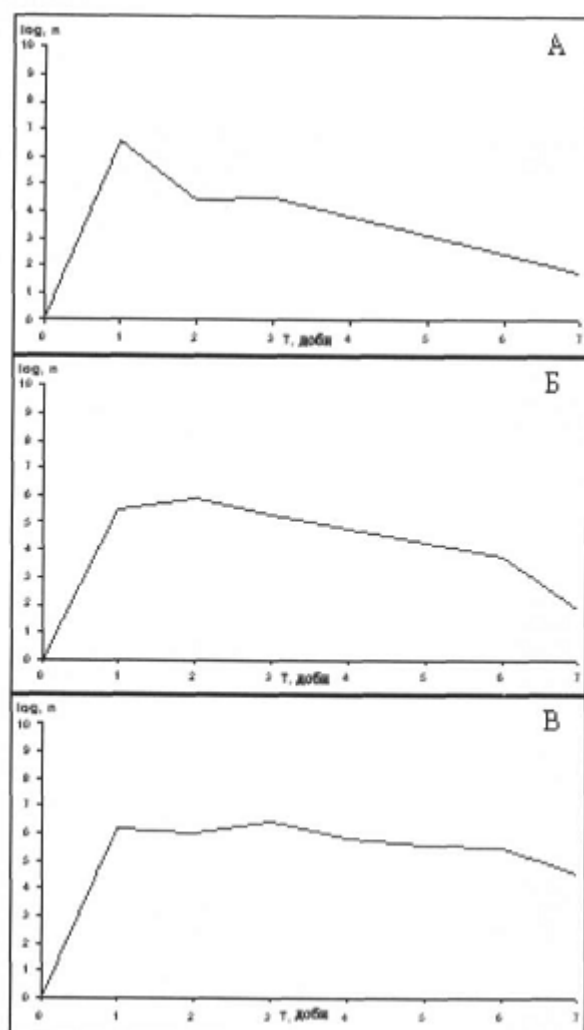
(21) Номер заявки:	u 2013 12899	(72) Винахідник(и):	Балко Ольга Іванівна (UA), Балко Олександр Богданович (UA), Авдєєва Лілія Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	06.11.2013	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.04.2014	(74) Представник:	Піскова Олена Вілліївна, реєстр. №289
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2014, Бюл.№ 8		

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЖИТТЄЗДАТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У СКЛАДІ БІОПЛІВКИ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення кількості мікроорганізмів у складі біоплівки включає отримання зразків біоплівки шляхом культивування мікроорганізмів протягом 1-3 діб за прийнятних для формування біоплівки умов у резервуарі з середовищем з доданням носія для формування біоплівки. Далі здійснюють попереднє відмивання від планктонної форми клітин після завершення культивування, відокремлення бактерій від поверхні носія та визначення титру бактерій у розчині, що відповідає кількості життєздатних клітин досліджуваних мікроорганізмів у біоплівці. Як носій для формування біоплівки використовують покривні скельця. Відокремлення клітин здійснюють шляхом інтенсивного механічного змиву на магнітній мішалці із застосуванням плоскої металічної пластини протягом 45 хвилин у 0,9 %-ному розчині NaCl. При цьому визначення титру бактерій здійснюють у розчині, отриманому після змиву.

UA 89508 U



Фиг.

Корисна модель належить до галузі прикладної мікробіології та може бути використана при проведенні мікробіологічного дослідження різноманітних клінічних матеріалів та об'єктів зовнішнього середовища з метою визначення кількості життєздатних мікроорганізмів у зразку, зокрема у складі біоплівки.

Біоплівка являє собою конгломерат мікроорганізмів, що розташовані на будь-якій поверхні, клітини яких прикріплені одна до одної. Як правило, клітини є зануреними у позаклітинну полімерну речовину (позаклітинний матрикс). Вважається, що 95-97 % усіх мікроорганізмів у природному середовищі існують у вигляді біоплівки. Останніми роками стало зрозумілим, що біоплівки надзвичайно широко поширені в природі, а їх дослідження може виявитися корисним у різноманітних галузях промисловості та медицини.

Наприклад визначення кількості життєздатних мікроорганізмів у складі біоплівки може слугувати критерієм інфекційної активності досліджуваних зразків та дозволить оцінити їх інфекційну активність, визначити стратегію лікування та перспективи одужання пацієнта. Дослідження біоплівок, які формуються корозійно-агресивними бактеріями, забезпечить можливість прогнозування та уникнення пошкоджень підземних комунікацій: теплових мереж, нафто- та газопроводів.

Є відомим спосіб визначення життєздатних клітин, що передбачає обробку зразків флуоресцентними барвниками, які здатні вибірково проникати у живі та загиблі клітини, з подальшим проведенням флуоресцентної мікроскопії (Smith K., Martin L., Rinaldi A., Rajendran R., Ramage G., Walker D. Activity of pyocin S2 against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrob. Agents Chemother. - 2012. - 56, № 3. - P. 1599-1601). Даний спосіб дозволяє візуалізувати життєздатні клітини за специфічним світінням, проте не забезпечує можливості провести їх кількісне визначення.

Іншою групою способів є визначення кількості зв'язаного біоплівкою барвника. Такі способи передбачають інкубування бактерій у лунках полістиролових планшетів, забарвлення сформованої біоплівки генціан-віолетом і подальше відмивання барвника 96 %-ним етиловим спиртом. Визначення інтенсивності біоплівкоутворення проводять або за показниками заломлення світла в отриманому після відмивання розчині (Lee B., Haagensen J.A.J., Ciofu O., Andersen J.Bo., Hoiby N., Molin Soren Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis // J. Clin. Microbiol. - 2005. - 43, № 10. - P. 5247-5255), або за інтенсивністю забарвлення біоплівки, сформованої на стінках лунок (Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices // J. Clin. Microbiol. - 1985. - 22, № 6. - P. 996-1006.). Проте в обох випадках проводиться встановлення відсотка накопичення біоплівки і не враховується кількість у її складі життєздатних мікроорганізмів.

Найбільш близьким до запропонованого способу є метод, у відповідності з яким після формування біоплівки, що відбувається на поверхні металічних або полімерних матеріалів, проводять змив бактерій із зразка за допомогою обробки ультразвуком з наступним визначенням кількості мікроорганізмів у складі сформованої біоплівки шляхом титрування змитої в розчин бактеріальної суспензії (Асауленко Л.Г., Пуріш Л.М., Козлова І.П. Етапи формування біоплівки сульфатвідновлювальними бактеріями // Мікробіол. журн. - 2004. - 66, № 3. - С. 72-79). До недоліків вказаного методу необхідно віднести те, що ультразвук може впливати на життєздатність оброблюваних клітин, що несприятливим чином позначиться на точності визначення їх кількості. Крім цього застосування ультразвуку не дозволяє використовувати як основу для формування біоплівки тонкі, оптично прозорі і, відповідно, крихкі матеріали через загрозу їх руйнування.

Задачею заявленої корисної моделі є підвищення точності та ефективності визначення кількості життєздатних мікроорганізмів у складі сформованої бактеріальної біоплівки за рахунок забезпечення щадного режиму обробки та можливості використання різноманітних основ для формування біоплівок.

Поставлена задача вирішується тим, що запропонований спосіб визначення кількості життєздатних мікроорганізмів у складі біоплівки передбачає одержання зразків біоплівки шляхом культивування мікроорганізмів протягом 1-3 діб за прийнятних для формування біоплівки умов у резервуарі з середовищем для культивування з додаванням носія для формування біоплівки, відмивання зразків 0,9 %-ним розчином NaCl від планктонної форми клітин після завершення культивування, відокремлення бактерій від поверхні носія шляхом інтенсивного механічного змиву на магнітній мішалці із застосуванням плоскої металічної пластини протягом 45 хвилин у 0,9 %-ному розчині NaCl та визначення титру бактерій у розчині, отриманому після змиву, що відповідає кількості життєздатних клітин досліджуваних

мікроорганізмів у біоплівці.

Переваги запропонованого способу включають: щадний режим змиву клітин, що дозволяє ефективно відокремлювати мікроорганізми від основи (наприклад покривельних скелець) і не призводить до їх руйнування; можливість використання більшості широко застосовуваних основ для формування біоплівки (пластин з металу, полімерів, скла) без порушення їх цілісності; невисокі фінансові затрати на придбання обладнання та розхідних матеріалів; простота, доступність та зручність у практичному застосуванні.

У переважному втіленні корисної моделі як основу для формування біоплівки використовують покривні скельця.

На кресленні представлені одержані при використанні запропонованого способу криві, які характеризують накопичення клітин у складі біоплівки досліджених штамів *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (АТСС 9027) (А), УКМ В-1 (АТСС 10145) (Б), УКМ В-12 (ССМ 1500) (В).

Корисна модель ілюструється конкретним прикладом її реалізації.

Приклад.

Використовувані культури мікроорганізмів. У досліді визначали кількості життєздатних мікроорганізмів у складі біоплівки на колекційних штаммах *Pseudomonas aeruginosa*. УКМ В-1 (АТСС 10145), УКМ В-12 (ССМ 1500) і УКМ В-900 (АТСС 9027), отриманих із Української колекції мікроорганізмів (УКМ, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Дані мікроорганізми є фармакопейними і типовими, що дозволяє стандартизувати отримані результати.

Використані поживні середовища. Отримання добових культур досліджуваних мікроорганізмів, приготування вихідних робочих суспензій та культивування з метою отримання зразків біоплівки проводили в рідкому середовищі LB (Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. Под ред. С.И. Алиханяна. - М.: Мир, 1976. - С. 394-395). Змив клітин із зразків біоплівки, проведення серійних десятикратних розведень отриманих суспензій мікроорганізмів у біоплівковій формах здійснювали в 0,9 %-ному розчині NaCl. Нанесення аліквот розведених суспензій, їх культивування та визначення кількості життєздатних бактерій проводили на агаризованому середовищі LB. Вказані середовища вважаються одними із оптимальних для культивування використаних мікроорганізмів.

Умови інкубування культур. Добові культури досліджуваних штамів *P. aeruginosa* УКМ В-1, УКМ В-12 і УКМ В-900 отримували шляхом їх вирощування в середовищі LB при 37 °С протягом 18-24 год., після чого розводили середовищем LB у співвідношенні 1:100 (по об'єму). Далі 2 мл розведеної суспензії досліджуваних культур, які містили  $2 \times 10^6$  КУО/мл клітин вносили в бюкси розміром 30×50 мм і об'ємом 20 мл, після чого додавали покривні скельця 18×18 мм. Культивування здійснювали за температури 37 °С. Зразки біоплівки отримували шляхом відбору скелець із бюксів на першу, другу та третю добу культивування.

Визначення кількості життєздатних мікроорганізмів у біоплівковій формі методом "змиву". Відібрані із бюксів скельця 2-3 рази відмивали від планктонної форми клітин 0,9 %-ним розчином NaCl. Відмиті скельця переносили в бюкси із 5 мл 0,9 %-ного розчину NaCl. Після цього клітини біоплівки протягом 45 хв. піддавали інтенсивному механічному відокремленню від поверхні скла на магнітній мішалці за допомогою плоскої металічної пластини розмірами 0,5×2 см. Отриману суспензію із змитих в розчин бактерій у біоплівковій формі піддавали серійним десятикратним розведенням і аліквоти (по 10 мкл) відповідних розведень наносили у двох повторях на чашки Петрі із твердим середовищем LB. Чашки інкубували при 37 °С протягом 18-24 год. Далі визначали кількість мікроорганізмів, які вирости у відповідному розведенні, отримані результати перераховували на 1 мл і виражали в КУО/мл. Визначений титр вказував на кількість життєздатних мікроорганізмів у біоплівковій формі.

У переважному втіленні способу визначення титру бактерій здійснювали у розчині, отриманому після першого змиву. Проте було продемонстровано, що для визначення можуть використовуватися розчини, отримані після ряду послідовних змивів.

Додатковим контролем ефективності проведеного відокремлення клітин від поверхні скла слугував візуальний контроль за допомогою світлової мікроскопії (мікроскоп Micromed XS-2610) при загальному збільшенні ×600. Для цього отримані після змиву скельця фіксували 10 хв. у 96 % розчині етанолу, забарвлювали генціан-віолетом протягом 10 хв. і визначали загальну кількість бактеріальних клітин, сорбованих до поверхні скла.

Визначення кількості життєздатних клітин *P. aeruginosa* УКМ В-900 у складі біоплівки показало, що максимальне їх накопичення спостерігалось на 1 добу культивування і становило  $4,1 \times 10^6$  КУО/мл (креслення, А). Протягом подальшого періоду спостереження кількість клітин у змивах логарифмічно знижувалась і на 7 добу їх титр становив  $6 \times 10^1$  КУО/мл.

Для *P. aeruginosa* УКМ В-1 кількість життєздатних клітин у складі біоплівки досягала

максимальних показників на другу добу культивування (креслення, Б). При цьому титр мікроорганізмів в змитій суспензії був дещо нижчим за такий для штаму УКМ В-900 і становив  $8,2 \times 10^5$  КУО/мл. Після досягнення максимальних значень кількість життєздатних клітин *P. aeruginosa* УКМ В-1 рівномірно знижувалась і на кінцевому етапі спостереження (7 доба культивування) у змиві виявлялось  $7 \times 10^1$  КУО/мл мікроорганізмів.

Аналіз життєздатних клітин *P. aeruginosa* УКМ В-12 у сформованій біоплівці показав, що максимальне накопичення кількості бактерій УКМ В-12 до  $5,5 \times 10^6$  КУО/мл виявляли у змивах на першу добу культивування (креслення, В). При цьому на 7 добу у складі біоплівки все ще виявлялась достатньо висока кількість життєздатних бактерій -  $3,5 \times 10^4$  КУО/мл.

Таблиця

Кількість життєздатних мікроорганізмів у складі біоплівки досліджуваних штамів *P. aeruginosa* протягом періоду спостереження, визначених методом "змиву"

Досліджуваний штам <i>P. aeruginosa</i>	Титр мікроорганізмів у змиві у відповідний період спостереження, КУО/мл		
	1 доба	2 доба	3 доба
УКМ В-900	$4,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$
УКМ В-1	$2,6 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
УКМ В-12	$3,1 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$

Отримані у відповідності із запропонованим способом значення кількості життєздатних клітин у складі біоплівки збігалися із результатами, отриманими при використанні способу, згідно з прототипом.

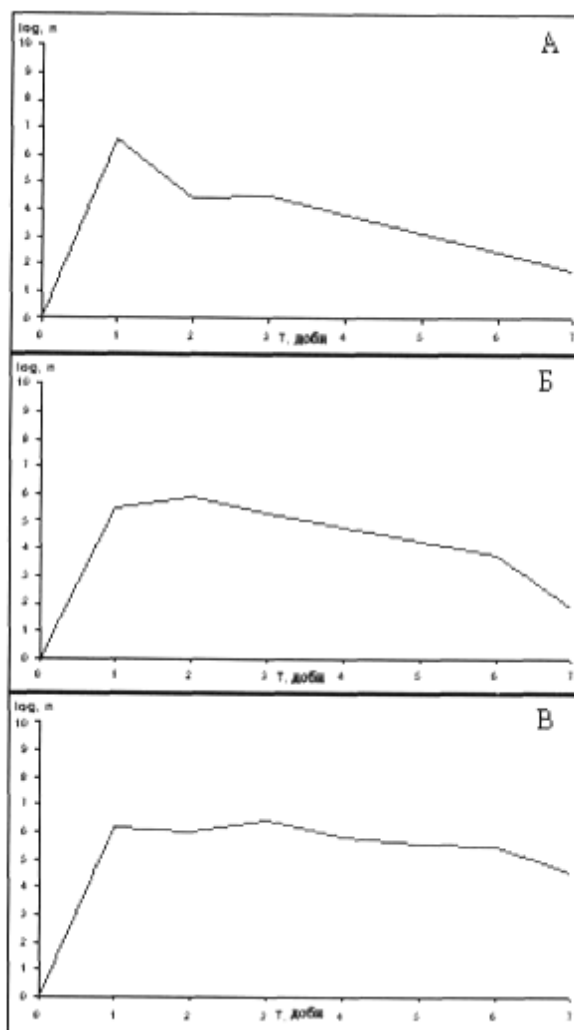
Таким чином, даний спосіб є досить точним для визначення кількості бактерій у складі біоплівки і дозволяє оцінити кількість життєздатних мікроорганізмів у біоплівковій формі. Даний показник життєздатності може слугувати критерієм інфекційної активності досліджуваних зразків.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення кількості мікроорганізмів у складі біоплівки, що включає отримання зразків біоплівки шляхом культивування мікроорганізмів протягом 1-3 діб за прийнятих для формування біоплівки умов у резервуарі з середовищем з доданням носія для формування біоплівки, попереднє відмивання від планктонної форми клітин після завершення культивування, відокремлення бактерій від поверхні носія та визначення титру бактерій у розчині, що відповідає кількості життєздатних клітин досліджуваних мікроорганізмів у біоплівці, який **відрізняється** тим, що як носій для формування біоплівки використовують покривні скельця, а відокремлення клітин здійснюють шляхом інтенсивного механічного змиву на магнітній мішалці із застосуванням плоскої металічної пластини протягом 45 хвилин у 0,9 %-ному розчині NaCl, при цьому визначення титру бактерій здійснюють у розчині, отриманому після змиву.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що визначення титру бактерій здійснюють у розчині, отриманому після першого змиву.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що визначення титру бактерій здійснюють у розчинах, отриманих після ряду послідовних змивів.




---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

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