

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ МОНО- И ПОЛИКУЛЬТУР БАКТЕРИЙ НА СТЕКЛЕ С РАЗЛИЧНЫМ РЕЛЬЕФОМ

Корляков Константин Александрович

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Челябинский

Государственный университет»

korfish@mail.ru

FEATURES OF DEVELOPMENT OF MONO-AND POLY CULTURES OF BACTERIA ON GLASS WITH DIFFERENT RELIEF

K. Korlyakov

Summary. We studied the population of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* cultures and their joint polyculture of glasses with different recess diameters: 7.8 microns, 23.4 microns, 78 microns, and 235 microns. It was found that the larger the diameter of the furrows, the faster they form a monolayer of bacteria, as the previous stage of biofilm development. Individual preferences of crops for settlement of certain size depressions of sectors are revealed. The number of bacterial cells in the recesses is always higher than between the recesses, which may indicate a more intensive accumulation of nutrient medium inside the recesses. At the same time, the number of cells in the recesses at the first hours of exposure (5–7 hours) is higher than in the control, and in the following hours, the number in the control on the contrary begins to prevail over the other sectors. This can be explained by the fact that uneven depressions on the glass are a catalyst for the development of bacteria due to the accumulation of nutrients there and a place convenient for attaching cells. In the future, when forming a biofilm, the surface relief no longer plays a role in the development of culture. In relation to polyculture, similar trends were revealed when the *Pseudomonas aeruginosa* culture replaced the *Staphylococcus aureus* culture.

Keywords: “scratched” glass, monolayer, cell count, sector, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Аннотация. Изучено заселение культурами *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* и их совместной поликультурой стеклов с различным диаметром углублений: 7.8 мкм, 23.4 мкм, 78 мкм и 235 мкм. Установлено, что чем больше диаметр борозд, тем быстрее в них формируется монослой бактерий, как предшествующая стадия развития биопленки. Выявлены индивидуальные предпочтения культур к заселению определенных по размеру углублений секторов. Численность клеток бактерий в углублениях всегда выше, чем между углублений, что может свидетельствовать о более интенсивном накоплении внутри углублений питательной среды. При этом численность клеток в углублениях на первых часах экспозиции (5–7 часов) выше, чем в контроле, а в последующие часы численность в контроле наоборот начинает превалировать над остальными секторами. Это может объясняться тем, что неровные углубления на стекле являются катализатором развития бактерий ввиду накопления там питательных веществ и местом удобным для прикрепления клеток. В дальнейшем, при формировании биопленки рельеф поверхности уже не играет значения в развитии культуры. В отношении поликультуры выявлены схожие тенденции при вытеснении культурой *Pseudomonas aeruginosa* культуры *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: «царапанные» стекла, монослой, численность клеток, сектор, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Введение

Вопрос о матрицах и твердых ячейках для фиксации и культивирования бактерий, как и для эукариотических клеточных культур становится все более актуальным. В то же время структурные особенности твердого субстрата в виде стекла служащего основой для культивирования микроорганизмов до сих пор остаются мало изученными. Ранее нами были исследованы особенности адсорбции и развития микроорганизмов и гидробионтов на стекле с различными по размеру углублениями [1, 2]. Однако, первичное накопление ор-

ганического вещества на неровной поверхности стекла, как правило обусловлено развитием бактериальных биопленок. Для чего необходимо изучение динамики развития клеток в различных углублениях — ячейках. И определение того, как те или иные изменения рельефа поверхности стекла блокируют или способствуют формированию колоний и биопленок, то есть влияют на все стадии развития бактериальных культур. Цель настоящей работы состояла в изучении особенностей роста бактериальных культур до формирования монослоя на секторах стекла с различными по размеру углублениями.

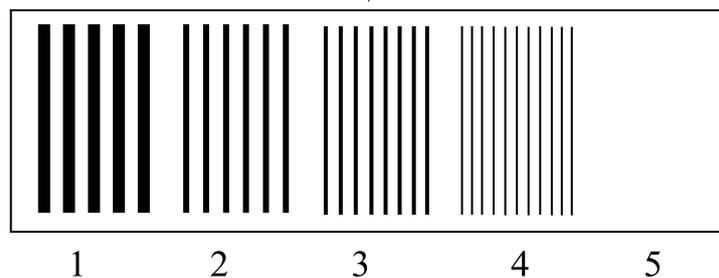


Рис. 1. Схема стекла с секторами: 1 сектор — ширина углублений 235 мкм, 2 сектор — ширина углублений 78 мкм, 3 сектор — ширина углублений 23.4 мкм, 4 сектор — ширина углублений 7.8 мкм, 5 сектор — контроль.

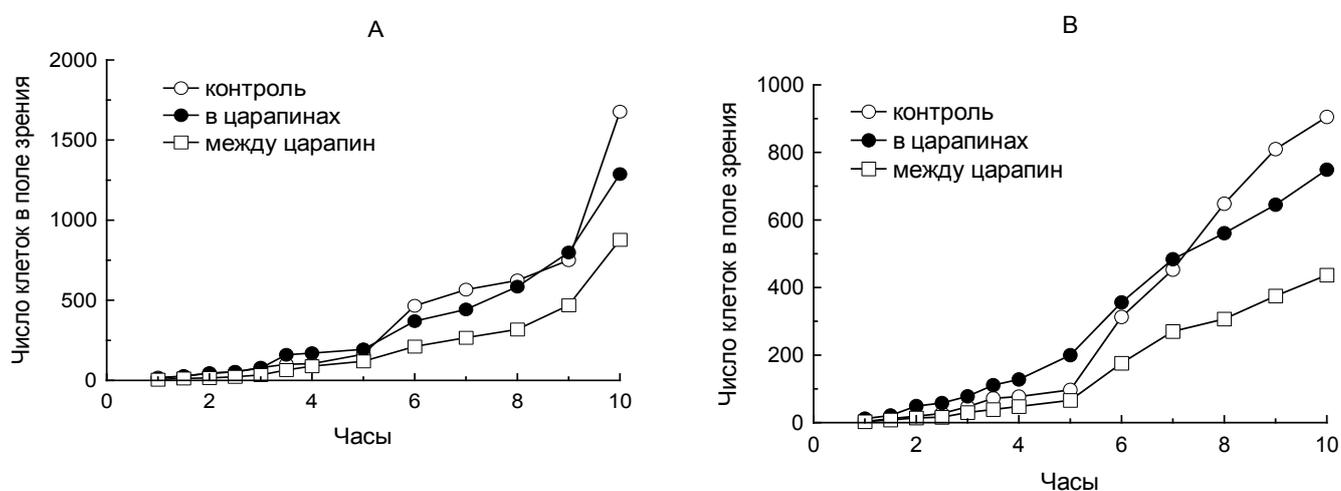


Рис. 2. Динамика роста среднего числа клеток монокультур по различным секторам в царапинах, между царапин и в контроле. А — *Pseudomonas aeruginosa* В — *Staphylococcus aureus*.

Материал и методика

Для исследований были использованы две культуры бактерий: *Staphylococcus aureus* штамм 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* штамм 259212. Культуры выращивались по отдельности в виде монокультур и совместно в виде поликультуры. В качестве жидкой фазы для выращивания микроорганизмов использовали мясопептонный бульон. Культивирование осуществляли при температуре 37°C в одноразовых чашках Петри, содержащих по 20 мл питательной среды. Первые результаты в трехкратной повторности снимали через 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24 часа. Предметные стекла были разделены на 5 секторов, на которых абразивной шкуркой были нанесены углубления различной толщины: 7.8 мкм, 23.4 мкм, 78 мкм и 235 мкм. Расстояния между углублениями составили соответственно: 78 мкм, 195 мкм, 312 мкм и 585 мкм. Сектора были расположены в порядке возрастания толщины углублений и увеличения удельных поверхностей (рис. 1).

Пятый сектор оставался необработанным (ровным) и использовался в качестве контроля. Стекла перед применением проходили дезинфекционную обработку (выдерживание в 96% спирте) и стерилизацию (фломбирование).

Во всех случаях эффекты и различия считали статистически значимыми при $P \leq 0.05$, незначимыми — при $P > 0.10$, промежуточные значения ($0.05 \leq P \leq 0.10$) обсуждали в качестве тенденций. Расчёты и графические построения выполнены в пакете *KuPlot* [3].

Результаты исследования

Средняя плотность клеток двух монокультур внутри углублений стекла была значительно выше, чем между углублениями (рис. 2).

В первые 5 часов у синегнойной палочки и 7 часов у золотистого стафилакокка численность клеток в углу-

Таблица 1. Численность клеток *Pseudomonas aeruginosa* на различных секторах стекла: числитель — внутри царапин, знаменатель — между царапинами.

Часы	Контроль	Количество клеток на неровной поверхности				Достоверность зависимости числа клеток от размера углублений $P \leq 0.05$
		1 сектор	2 сектор	3 сектор	4 сектор	
1	18	9/4	11/4	16/7	18/7	0,0415
1.5	26	27/14	32/11	27/12	23/14	0,2785
2	45	38/12	41/13	46/16	54/21	0,0415
2.5	53	52/23	49/22	54/22	57/26	0,1742
3	80	86/30	85/33	41/36	96/37	1
3.5	101	147/48	154/54	187/86	155/72	0,1742
4	104	178/87	156/91	188/89	160/90	1
5	163	193/116	193/131	222/120	171/109	0,7179
6	466	370/219	392/219	414/209	306/204	0,7290
7	566	429/269	457/255	512/330	376/214	0,7290
8	624	578/288	575/316	615/352	572/316	0,4969
9	750	814/483	791/477	877/508	711/408	0,4969
10	1677	1351/955	1652/936	1267/880	885/742	0,1742
24	МОНОСЛОЙ					-

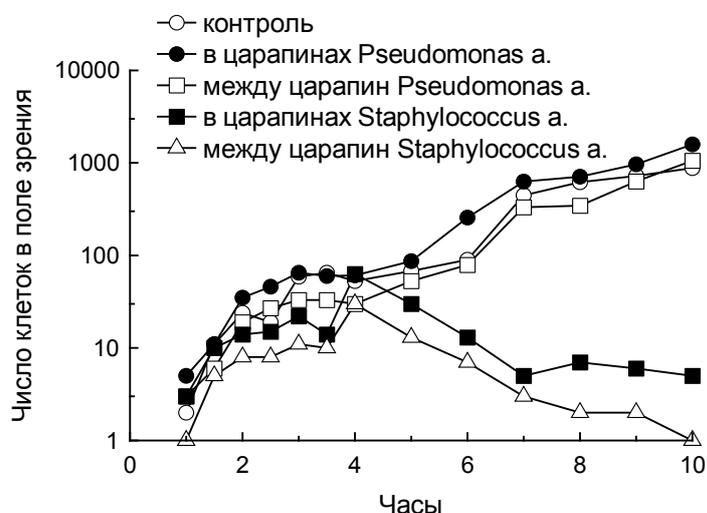


Рис. 3. Динамика роста среднего числа клеток поликультуры (*Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*) по четырем секторам в царапинах, между царапин и в контроле.

блениях была выше, чем в контроле. На последних часах численность клеток в контроле наоборот становилась выше, чем в углублениях. В поликультуре начиная с 5 часа культура *Pseudomonas aeruginosa* доминировала по численности подавляя *Staphylococcus aureus* (рис. 3).

При этом у обеих культур плотность клеток в углублениях также была выше, чем между углублениями. На 24

часу роста культуры *Pseudomonas aeruginosa* наблюдался монослой — сплошной одинарный по высоте слой клеток, охватывающий все поле зрения (табл. 1).

Однако, развитие монослоя клеток шло неравномерно на различных секторах. В культуре *Pseudomonas aeruginosa* на 10 часу наблюдался монослой в 5 полях зрения второго и первого секторов. Рост культуры *Staphylococcus aureus* был замедлен по сравнению

Таблица 2. Численность клеток *Staphylococcus aureus* на различных секторах стекла: числитель — внутри царапин, знаменатель — между царапинами.

Часы	Контроль	Количество клеток на неровной поверхности				Достоверность зависимости числа клеток от размера углублений $P \leq 0.05$
		1 сектор	2 сектор	3 сектор	4 сектор	
1	3	8/2	15/4	16/4	11/2	0,4969
1.5	12	22/9	23/9	19/7	20/8	0,4969
2	19	39/16	72/20	46/12	41/10	1
2.5	27	51/17	77/17	47/15	57/14	1
3	47	69/26	85/33	81/25	76/37	1
3.5	72	118/38	107/48	103/43	117/28	0,4969
4	77	138/50	123/51	125/49	126/42	1
5	97	202/65	215/70	212/61	173/67	0,4969
6	313	375/189	445/180	364/196	240/141	0,1742
7	453	552/301	601/301	447/264	338/211	0,1742
8	648	656/352	713/338	507/299	369/239	0,1742
9	810	707/386	786/448	611/353	479/314	0,1742
10	905	829/454	841/521	711/409	615/365	0,1742
24	1768	1487/885	1696/798	1316/612	1269/790	0,1742

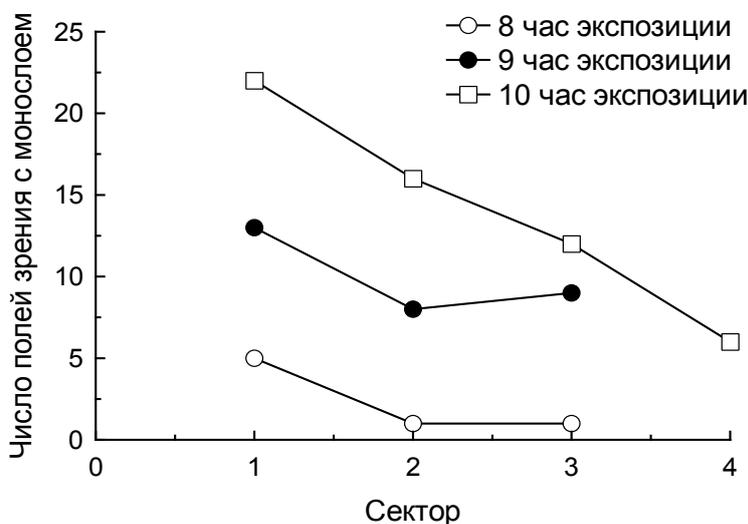


Рис. 4. Формирование бактериального монослоя (поликультуры *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus aureus*) в полях зрения по часам на различных секторах.

с *Pseudomonas aeruginosa* и формирование монослоя не фиксировалось до последних стадий экспозиции — 24 часа (табл. 2).

При смешении двух культур монослой также наблюдался у культуры *Pseudomonas aeruginosa*, но гораздо раньше — начиная с 8 часа экспозиции (рис. 4). На 8 часу

монослой наблюдался на 7 полях зрения, на 9 часу — на 30 полях зрения и на 10 часу — на 56 полях зрения (рис. 4).

При этом монослой клеток чаще наблюдался на секторах с наибольшим размерам углублений. Так на 1 секторе с углублениями диаметром 235 мкм число полей

Таблица 3. Численность клеток *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus aureus* на различных секторах стекла: числитель — внутри царапин, знаменатель — между царапинами.

Часы	Контроль	Количество клеток на неровной поверхности				Достоверность зависимости числа клеток от размера углублений $P \leq 0.05$ для <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		1 сектор	2 сектор	3 сектор	4 сектор	
1	п2 с2	п6/2 с3/1	п6/3 с4/1	п6/3 с3/1	п4/2 с3/1	0,1797
1.5	п11 с6	п10/5 с9/4	п10/5 с9/3	п12/7 с9/5	п13/6 с12/7	0,0709
2	п24 с9	п51/23 с16/9	п36/14 с13/8	п28/16 с13/7	п26/24 с15/10	0,04154
2.5	п19 с9	п50/32 с9/2	п51/27 с15/7	п43/25 с25/15	п39/25 с13/9	0,1742
3	п59 с23	п73/33 с18/10	п67/40 с28/11	п54/28 с20/12	п66/30 с22/11	0,1742
3.5	п65 с31	п65/32 с14/8	п70/35 с12/9	п40/30 с10/11	п65/36 с19/11	0,7179
4	п53 с40	п58/26 с60/28	п67/34 с70/36	п66/34 с67/36	п54/28 с55/21	0,4969
5	п68 с11	п117/75 с29/19	п85/63 с40/12	п74/40 с29/11	п71/36 с24/12	0,0415
6	п90 с23	п322/80 с10/7	п390/95 с12/8	п208/68 с10/8	п109/74 с20/7	0,1742
7	п446 с8	п819/428 с2/1	п883/498 с7/3	п485/272 с8/8	п335/133 с4/1	0,1742
8	п619 с8	п1030/588 с8/2	п938/357 с7/1	п452/238 с7/2	п426/203 с6/1	0,0415
9	п724 с9	п1324/889 с7/4	п1474/1002 с7/2	п530/291 с4/1	п536/343 с7/1	0,4969
10	п882 с7	п2105/1555 с5/1	п1983/1390 с5/1	п1220/724 с5/1	п1045/567 с7/1	0,0415
24	монослой					

Примечание: п — *Pseudomonas aeruginosa*, с — *Staphylococcus aureus*.

зрения с монослоем всегда преваляло по сравнению со 2 и 3 секторами с диаметрами борозд 78 и 23 мкм соответственно. А монослой на 4 секторе с углублениями диаметром 7.8 мкм образовывался только на 10 часу экспозиции (рис. 4) Следует отметить, что на контрольном секторе монослой не наблюдался до последних часов экспозиции — 24 часа, тогда как на секторах с неровным рельефом монослой начинал развиваться уже на 8–10 часах (смешанная культура). На последнем часе экспозиции монослой наблюдался на всех секторах, также, как в монокультуре *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 3). Таким образом, можно констатировать опережающее развитие роста клеток в виде формирования монослоя, как первой стадии развития биопленки преимущественно на 1 и 2 секторах, отличающихся наибольшими размерами борозд (78–235 мкм). При этом на 10 часу экспозиции выявлена статистически значимая положительная корреляция между увеличением размера борозд и количеством полей зрения с монослоем в этих бороздах ($p=0.04$). Тогда как на 8 ($p=0.22$) и 9 ($p=0.6$) часах статистически достоверной связи выявлено не было. То есть, чем шире были углубления на стекле, тем быстрее там образовывался монослой формирующей в дальнейшем биопленку. Однако, в динамике роста клеток *Pseudomonas aeruginosa* в моно- и поликультуре наблюдались прямо противоположные тенденции освоения секторов. Так в монокультуре *Pseudomonas aeruginosa* в первые часы развития численность клеток достоверно ($p=0,04$) увеличивалась

с уменьшением размера углублений (табл. 1). В поликультуре плотность клеток *Pseudomonas aeruginosa* наоборот статистически значимо увеличивалась на 2, 5, 10 часах с увеличением размера углублений (табл. 3).

Заключение

Таким образом, степень изменения рельефа поверхности стекла влияет на развитие моно- и поликультур микроорганизмов. Чем больше диаметр борозд, тем быстрее в них формируется монослой бактерий, как предшествующая стадия развития биопленки. Численность клеток бактерий в бороздах всегда выше, чем между борозд, что может свидетельствовать о более интенсивном накоплении там питательной среды. При этом численность клеток в углублениях на первых часах экспозиции (5–7 часов) выше, чем в контроле, а в последующие часы численность в контроле наоборот начинает превалять над остальными секторами. Это может объясняться тем, что неровные углубления на стекле являются катализатором развития бактерий ввиду накопления там питательных веществ и местом удобным для прикрепления клеток. То есть являются энергетическим стимулятором развития для последующего развития колоний. В поликультуре микроорганизмов наблюдалась аналогичная картина при подавлении на 4–5 часах культурой синегнойной палочкой золотистого стафилококка. Также выявлены индивидуальные предпочтения различных культур к различным секторам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корляков К.А., Арсентьева Н. Ю., Нохрин Д. Ю. Влияние сложности рельефа стекол на формирование монокультур микроорганизмов // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. № 4/1 (38). С. 35.
2. Корляков К.А., Нохрин Д. Ю., Арсентьева Н. Ю. Влияние неровностей рельефа стекол на формирование сообществ и монокультур обрастаний // Биология внутренних вод, 2015. № 1. С. 96–104.
3. Yoshioka K. KyPlot — a user-oriented tool for statistical data analysis and visualization // Computational Statistics. 2002. V. 17, № 3. P. 425–437.

© Корляков Константин Александрович (korfish@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»

