

## ПУТИ СНИЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ТРУДОЁМКОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СПОСОБА ОПТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИИ

ФГБУ Федеральный исследовательский центр Тюменский научный центр Сибирского отделения РАН, 625026, Тюмень, Россия

*Оценена трудоёмкость (в часах) оптического способа подсчёта микробных клеток в суспензии по сравнению с методом подсчёта микробных клеток с использованием камеры Горяева. Актуальность оценки производственной трудоёмкости способов подсчёта микробных клеток в суспензии связана с необходимостью использовать их во многих исследованиях. Зачастую широко применяемые методы слишком трудозатратны, длительны или требуют применения дорогостоящего оборудования. Проведён сравнительный эксперимент ранее разработанного нами «Способ оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии» (приоритетная справка № 2016141859 от 25.10.2016 г) и способа подсчёта микробных клеток с использованием камеры Горяева. Производственная трудоёмкость выполняемых измерений рассчитывалась в часах по формуле:  $T_{пр} = T_m + T_{об}$ , где  $T_{пр}$  – трудоёмкость производственная,  $T_m$  – трудоёмкость технологическая,  $T_{об}$  – трудоёмкость обслуживания. Технологическая трудоёмкость измерений с использованием камеры Горяева составляла  $32,18 \pm 0,95$ , тогда как оптическим способом  $1,03 \pm 0,06$  (достоверность различий при  $p < 0,01$ ) при количестве измерений  $n = 100$ . Трудоёмкость обслуживания при оптическом способе  $0,24 \pm 0,03$ , при применении метода с использованием камеры Горяева  $0,15 \pm 0,01$  часов. Производственная трудоёмкость измерений концентрации микробных клеток в суспензии при применении метода измерения с использованием камеры Горяева остаётся ( $p < 0,01$ ) выше, чем при оптическом способе оценки,  $32,33 \pm 0,96$  и  $1,27 \pm 0,05$  часов соответственно. При применении оптического способа оценки концентрации в суспензии необходимо проводить не малый объём необходимых математических вычислений, что в будущем, возможно, скорректировать путём создания специальной программы для персональных ЭВМ. Производственная трудоёмкость результатов получаемых при выполнении измерений способом оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии ниже, чем при применении метода измерения с использованием камеры Горяева. Принимая во внимание, что его осуществление не требует, как при турбидиметрии, закупки специального оборудования, то его экономическая эффективность перед существующими очевидна.*

**Ключевые слова:** микроорганизм; штамм; измерения; концентрация; КОЕ; камера Горяева; турбидиметрия; трудоёмкость.

**Для цитирования:** Симонов О.А., Симонова Е.О., Мальчевский В.А. Пути снижения производственной трудоёмкости применения способа оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 476-479. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-476-479>

**Для корреспонденции:** Симонова Екатерина Олеговна, мл. науч. сотр. отдела биоресурсов криосферы; e-mail: [mailsimonova@gmail.com](mailto:mailsimonova@gmail.com)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 04.03.2022

Принята к печати 24.06.2022

Опубликовано 15.08.2022

*Simonov O.A., Simonova E.O., Malchevskiy V.A.*

### WAYS TO REDUCE THE LABOR INTENSIVENESS OF APPLYING THE METHOD OF OPTICAL ESTIMATION OF MICROBIAL CELL CONCENTRATION IN SUSPENSION

Tyumen Scientific Centre SB RAS, 625026, Tyumen, Russia

*The labor intensity (in hours) of the optical method of microbial cell counting in suspension compared to the method of microbial cell counting using a Goryaev chamber is evaluated. The relevance of assessing the production labor intensity of microbial cell counting methods in suspension is related to the need to use them in many studies. Often the commonly used methods are too labour-intensive, time-consuming, or require expensive equipment. A comparative experiment was carried out with our previously developed “Method for optical estimation of microbial cell concentration in suspension” (Priority certificate No. 2016141859 dated 25.10.2016) and the method of microbial cell counting using a Goryaev chamber. Production labor intensity of the measurements performed was calculated in hours according to the formula:  $T_p = T_t + T_{ob}$ , where  $T_p$  is production labour input,  $T_t$  is technological labour input,  $T_{ob}$  is maintenance labour input. Technological labour input of measurements with use of Goryaev's chamber made up  $32,18 \pm 0,95$ , whereas with optical method –  $1,03 \pm 0,06$  (reliability of differences at  $p < 0,01$ ) at amount of measurements  $n = 100$ . Labour input of service at optical method  $0,24 \pm 0,03$ , at application of method with use of Goryaev chamber  $0,15 \pm 0,01$  hours. Labour input of measurements of concentration of microbial cells in suspension at application of method of measurement with Goryaev chamber remains ( $p < 0,01$ ) higher than at an optical method of estimation,  $32,33 \pm 0,96$  and  $1,27 \pm 0,05$  hours accordingly. When using the optical method of concentration estimation in the suspension it is necessary to carry out not a small amount of necessary mathematical calculations, which in the future, probably, corrected by creating a special program for a personal computer. The labour input of results obtained by measuring by optical evaluation of the concentration of microbial cells in suspension is lower than that obtained by using a measurement method using a Goryaev chamber. Taking into consideration that its implementation does not require purchase of special equipment as in turbidimetry, its cost-effectiveness compared to existing ones is obvious.*

**Key words:** microorganism; strain; measurements; concentration; CFU; Goryaev chamber; turbidimetry; labour intensity.

**For citation:** Simonov O.A., Simonova E.O., Malchevskiy V.A. Ways to reduce the labor intensiveness of applying the method of optical estimation of microbial cell concentration in suspension. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 476-479 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-476-479

**For correspondence:** Simonova Ekaterina Olegovna, Junior Researcher, Department of Cryosphere Bioresources; e-mail: mail-simonova@gmail.com

**Information about authors:**

Simonov O.A., <https://orcid.org/0000-0003-2362-3588>;  
Simonova E.O., <https://orcid.org/0000-0002-0238-6993>;  
Malchevskiy V.A., <https://orcid.org/0000-0002-1308-2899>.

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 04.03.2022  
Accepted 24.06.2022  
Published 15.08.2022

**Введение.** В процессе выполнения медицинских [1], микробиологических и биотехнологических исследований возникает необходимость определения количества микробных клеток в различных средах [2,3]. Широко применяемые на сегодняшний день методики определения количества микробных клеток в суспензиях не требующие специального дорогостоящего оборудования, например с использованием счётной камеры Горяева<sup>1</sup> весьма трудозатратны. Для определения количества микробных клеток в суспензиях при помощи специального оборудования используется метод турбидиметрии. Перед его выполнением необходимо составить калибровочные графики индивидуальные для каждого исследуемого микроорганизма, что достаточно трудоёмко, длительно, требует привлечения других методов для получения образцов с известным количеством микробных клеток в единице объёма. Требуется закупка и техническое обслуживание дорогих, узкоспециализированных приборов, что ведёт к повышению себестоимости проводимых работ. Для решения сложившейся проблемы нами разработан «Способ оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии» приоритетная справка № 2016141859 от 25.10.2016 г., не требующий наличия дорого узкоспециализированного оборудования основанный на использовании асимптотического приближения теории светорассеяния.

В связи с вышеизложенным, оценка производственной трудоёмкости результатов получаемых при применении способа оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии актуальна.

Цель исследования: оценить производственную трудоёмкость результатов получаемых при применении способа оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии.

**Материал и методы.** Для достижения поставленной цели проведён сравнительный эксперимент по определению концентрации микроорганизмов в суспензии способом с использованием камеры Горяева и предложенным способом оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии.

В качестве материала для исследования выбран, идентифицированный методом сиквенса по 16S RNA, штамм MG8 – *Bacillus sp. (cereus)*. Бактерии высевали

в пробирки на скошенный агар и культивировали 24 ч в термостате при температуре +26°C, после чего микроорганизмы смывали с поверхности питательной среды дистиллированной водой в объёме 5 мл. Каждым из сравниваемых способов определены концентрации микроорганизмов в 100 различных суспензиях.

Определение концентрации микроорганизмов с использованием камеры Горяева осуществляли следующим образом: в камеру Горяева помещали суспензию, полученную методом серийных разведений, концентрацией 1/10000 от концентрации смыва. Далее проводили фотофиксацию сеток камеры, подсчёт количества микроорганизмов на полученных снимках и обработка данных по методике ОФС<sup>1</sup>.

Определение концентрации микроорганизмов в суспензии предложенным способом выполняли по следующему алгоритму: подготавливали две дисперсионные среды с различными показателями преломления, а именно 10% и 40% растворы глюкозы и исследуемые суспензии микроорганизмов. Для этого в девять частей дисперсионной среды помещали одну часть микробной суспензии. Суспензии хорошо перемешивали. Далее, измеряли показатели преломления полученных суспензий с использованием рефрактометра RL3 производства фирмы Polskie Zaklady Optyczne по методике, изложенной в инструкции производителя. Получали значения показателя преломления первой ( $\mu_{s1}$ ) и второй ( $\mu_{s2}$ ) дисперсионной среды.

Полученные суспензии помещали в кюветы спектрофотометра ПЭ-5400УФ производства ООО «Экохим» (Россия), которые устанавливали в измерительную камеру спектрофотометра. Третья кювета являлась контрольной, в неё помещали дистиллированную воду.

Проводили измерения оптической плотности суспензий (относительно контрольной кюветы) на двух длинах волн  $\lambda_1=450$  нм и  $\lambda_2=600$  нм, получали значения  $D_{\lambda_1}$  и  $D_{\lambda_2}$ . Используя определение волнового экспонента по формуле:

$$n = \frac{-\lg D_{\lambda_1} - \lg D_{\lambda_2}}{\lg \lambda_1 - \lg \lambda_2},$$

рассчитывали волновые экспоненты для исследуемых суспензий  $n_1$  и  $n_2$ .

Применяя асимптотическое приближение определяли безразмерный параметр  $p$  [4] для каждой из двух дисперсионных сред используя формулы [5]:

$$p(n) = a/(b+n-2) + c, \text{ для } 2 \leq n \leq 3,5;$$

<sup>1</sup>Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание 2015; 2: 624-627. Определение концентрации микробных клеток ОФС.1.7.2.0008.15.

$$p(n) = 3(y+n \cdot q)/(h+y)^{1/2}, \text{ для } 1 \leq n \leq 2.$$

Где  $y, a, b, c, d, e, q, h$  определяли следующим образом ( $m_1 = m - 1; m = \mu_b / \mu_s$ ) [6]:

$$y = 2 - n - (2 - n)^2 / 20;$$

$$a = b \cdot d;$$

$$b = 1,5 \cdot (d/e - 1);$$

$$q = m_1 \cdot (1 - 0,8 \cdot \exp(-11 \cdot m_1)) / 3;$$

$$h = (2 \cdot q)^{1/3};$$

$$c = 3 \cdot h - d;$$

$$d = e \cdot (3 \cdot h - \rho_1) \cdot (1,5 - \rho_1) / (1,5 \cdot (3 \cdot h - \rho_1) - e \cdot \rho_1);$$

$$e = 3 \cdot h - 2 \cdot m_1 \cdot (0,22 + 0,58 \cdot m);$$

$$\rho_1 = 0,1 + m_1 \cdot (3,9 - 5 \cdot m_1 + 0,5 / (1 + 1000 \cdot (m_1 - 0,05)^2)).$$

По известным  $n_1$  и  $n_2$  рассчитывали значения  $\rho(n_1)$  и  $\rho(n_2)$ .

Так как, по определению  $\rho = 4 \cdot \pi \cdot R_{cp} \cdot \mu_s \cdot (\mu_b / \mu_s - 1) / \lambda$  [5], при одинаковой длине волны этот параметр зависит только от соотношений показателей преломлений бактерий и среды, то, по известным значениям  $\rho(n_1)$  и  $\rho(n_2)$  мы определяли значение показателя преломления бактерий:

$$\rho(n_1) / \rho(n_2) = (\mu_b - \mu_{s1}) / (\mu_b - \mu_{s2});$$

откуда:

$$\mu_b = \mu_{s2} \cdot \rho(n_1) / \rho(n_2) - \mu_{s1} / \mu_{s2} \cdot \rho(n_1) / \rho(n_2) - 1,$$

где:

$\mu_{s1}$  – показатель преломления 1-й дисперсионной среды;

$\mu_{s2}$  – показатель преломления 2-й дисперсионной среды;

$\rho(n_1)$  – безразмерный параметр  $\rho$  для 1-й дисперсионной среды, определённый по волновому экспоненту  $n_1$ ;

$\rho(n_2)$  – безразмерный параметр  $\rho$  для 2-й дисперсионной среды, определённый по волновому экспоненту  $n_2$ ;

$\mu_b$  – показатель преломления бактерий.

Используя значение параметра  $\rho$  и найденный показатель преломления бактерий, для любой из дисперсионных сред оценивался средний размер бактерий исходя из определения  $\rho$  [4];

$$R_{cp} = \rho \cdot \lambda / (4 \cdot \pi \cdot (\mu_b - \mu_s)),$$

С помощью асимптотического приближения [5] находили коэффициент светорассеяния;

$$K_s = K_2 \cdot \left\{ 1 + \frac{0,3724 - 0,2974 \cdot m}{[\alpha + 4 \cdot (\alpha - 0,8)^3 - 0,7444]} \right\}; \text{ для } 2 \leq n \leq 3,3;$$

$$K_s = Q(\rho) \cdot \frac{m - m_1^2}{\left[ 1 + (0,3 \cdot m - 0,28) \cdot \left( \frac{3h}{\rho} \right)^3 \right]}; \text{ для } -1 \leq n \leq 2;$$

где:

$$K_2 = A \cdot \alpha \cdot [3,25m + 1,55] \cdot \alpha - 3,4;$$

$$A = \left[ \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2^2} \right];$$

$$\alpha = 2 \cdot \pi \cdot R_{cp} \cdot \mu_s / \lambda.$$

Определяли концентрацию микроорганизмов (N) в исследуемой суспензии по формуле:

$$N = \pi \cdot R_{cp}^2 \cdot K_s,$$

которая выведена нами из формулы [6]:

$$\tau = \pi \cdot r^2 \cdot K_s(r, \lambda, m) \cdot N,$$

где мутность суспензии ( $\tau$ ) вычисляли по ранее измеренной оптической плотности среды:

$$\tau = 2,3 \cdot D \left( \frac{1}{cm} \right).$$

Концентрацию микроорганизмов в неразведённой суспензии рассчитывали по формуле:

$$x = 10 \cdot N.$$

Производственная трудоёмкость выполняемых измерений вычисляли в часах:

$$T_{пр.} = T_{т.} + T_{об.},$$

где:

$T_{пр.}$  – трудоёмкость производственная;

$T_{т.}$  – трудоёмкость технологическая;

$T_{об.}$  – трудоёмкость обслуживания.

Статистический обшчт материала проводил согласно международным требованиям, предъявляемым к обработке результатов данных научных исследований, при помощи программы для персональных компьютеров «SPSS 11,5 for Windows» (среднее значение, дисперсия средних, параметрическое сравнение по критерию Стьюдента, частотный анализ).

**Результаты и обсуждение.** Трудоёмкость (в часах) измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии представлена в таблице.

Технологическая трудоёмкость измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии при применении метода измерения с использованием камеры Горяева статистически достоверно ( $p < 0,01$ ) выше чем при оптическом способе оценки. В то же время, трудоёмкость обслуживания при оптическом способе оценки достоверно ( $p < 0,01$ ) выше, чем при применении метода измерения с использованием камеры Горяева. В общем, несмотря на более низкую трудоёмкость обслуживания, производственная трудоёмкость измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии при применении метода измерения с использованием камеры Горяева остаётся ( $p < 0,01$ ) выше, чем при оптическом способе оценки.

Необходимо учитывать, что при применении оптического способа оценки концентрации микробных клеток в суспензии, можно получить без отдельных трудовых затрат дополнительные важные для исследователей данные о бактериях данного штамма, такие как показатель преломления и их средний радиус.

При применении оптического способа оценки концентрации микробных клеток в суспензии выявлен его недо-

**Трудоёмкость (в часах) измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии (M±m)**

Виды трудоёмкости (в часах)	Методы измерения концентрации микробных клеток в суспензии	
	с использованием камеры Горяева (n=100)	оптическим способом оценки (n=100)
Технологическая	32,18±0,95 <sup>1</sup>	1,03±0,06
Обслуживания	0,15±0,01	0,24±0,03 <sup>1</sup>
Производственная	32,33±0,96 <sup>1</sup>	1,27±0,05

Примечание. n – число измерений; <sup>1</sup> - достоверность различий при  $p < 0,01$ .

статок, повышающий технологическую трудоёмкость измерений – не малый объём необходимых математических вычислений. Можно, в будущем, успешно реализовать данный резерв для дальнейшего повышения технологической трудоёмкости измерений путём создания специальной программы для персональных ЭВМ.

**Заключение.** Производственная трудоёмкость результатов, получаемых при выполнении измерений способом оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии ниже, чем при применении метода измерения с использованием камеры Горяева. Принимая во внимание, что его осуществление не требует, как при турбидиметрии, закупки специального оборудования, то его экономическая эффективность очевидна.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3 см. REFERENCES)

1. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Кравчук Э.С., Ганина Е.Б. Динамика изменчивости микробиоты полости рта и толстого кишечника юношей при перемене условий жизни. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(8): 507-12. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-8-507-512.
4. Щеголев С.Ю., Кленин В.И. Определение параметров сложных дисперсных полимерных систем из спектра мутности; *Высокомолекулярные соединения*; 1971; А13(12): 2809-15.
5. Рамазанов К.Р., Хлебцов Н.Г., Щеголев С.Ю., Кленин В.И. Характеристические функции светорассеяния полидисперсных систем. *Коллоидный журнал*. 1983, 45(3): 473-9.

6. Нестеров А.Н. Кинетика и механизм гидратообразования газов в присутствии поверхностно-активных веществ. Дис. ... д-ра. хим. наук. Тюмень; 2006.

#### REFERENCES

1. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Kravchuk E.S., Ganina E.B. Dynamics of variability of the microbiota of the oral cavity and large intestine of young men under changing living conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* 2019; 64(8): 507-12. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-8-507-512. (in Russian)
2. Yu C., Irudayara J., Debroy C., Schmilovtich Z., Mizrach A. Spectroscopic Differentiation and Quantification of Microorganisms in Apple Juice. *Journal of Food Science*. 2006; 69(7): 268–72. DOI:10.1111/j.1365-2621.2004.t.
3. Lee J., Kim H-S., Jo H.Y., Kwon M.J. Revisiting soil bacterial counting methods: Optimal soil storage and pretreatment methods and comparison of culture-dependent and -independent methods. *PLoS One*. 2021; 16(2). DOI:10.1371/journal.pone.0246142. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0246142>.
4. Shchegolev S.Yu., Klenin V.I. Determination of the parameters of complex dispersed polymer systems from the turbidity spectrum. *Vysokomolekulyarnye soedineniya*. 1971; А13(12): 2809-15. (in Russian)
5. Ramazanov K.R., Khlebtsov N.G., Shchegolev S.Yu., Klenin V.I. Characteristic functions of light scattering of polydisperse systems. *Kolloidnyy zhurnal*. 1983; 45(3): 473-9. (in Russian)
6. Nesterov A.N. Kinetics and mechanism of hydrate formation of gases in the presence of surfactants. Diss. Tyumen; 2006. (in Russian)