

ПОРІВНЯННЯ ЕРГОНОМІЧНОСТІ МЕТОДІВ ІНОКУЛЯЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ НА ЩІЛЬНІ ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

Тарас П'ятковський, Олена Покришко

Тернопільський національний медичний
університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України

Вступ

Зазвичай для підтвердження клінічного діагнозу та в наукових цілях в мікробіологічних лабораторіях використовують бактеріологічний метод [1]. Досить часто першим важливим етапом наукового експерименту чи виділення мікроорганізмів з метою їх ідентифікації є підрахунок колоній бактерій на щільному поживному середовищі [2]. Мікроорганізми є убиквітарними і можуть стати джерелом можливого зараження в лабораторії чи контамінації. Ергономічність є важливою складовою безпеки та ефективності роботи в мікробіологічній лабораторії, тривалість мікробіологічних досліджень може впливати на результати та продуктивність роботи лабораторії. Рутинні мікробіологічні дослідження вимагають використання одноразових та багаторазових матеріалів та затрату часу [3-5]. Існують різні методи, які підтримують стерильність експериментальних матеріалів та дозволяють успішно виділити колонії бактерій. Для інокуляції рідких зразків від хворих чи бактеріальних суспензій в Україні найчастіше використовують одноразові пластикові чи скляні та металеві багаторазові шпатели Дригальського [6, 7]. За кордоном з цією метою крім шпательів також використовують метод Копакабана (відомий як Copacabana spreading method та bead method) із застосуванням стерильних скляних кульок [8-10].

Метою роботи було порівняти ергономічність, ефективність та якість інокулювання поверхні агару у чашці Петрі шпателем Дригальського та скляними стерильними кульками.

Матеріали та методи

Для експериментів використовували штами *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 6538 отримані з колекції культур Лабораторії мікробіологічних та паразитологічних досліджень ТНМУ. Для інокуляції суспензії мікроорганізмів використовували скляні шпатели Дригальського L-подібної форми з діаметром 3,6 мм та довжиною робочої поверхні 30,0 мм та скляні кульки діаметром 3,7 мм. Кульки у кількості 20 шт. насипали у пробірки перед стерилізацією автоклавуванням. Шпатели обгортали алюмінієвою фольгою і стерилізували сухим гарячим повітрям. Загальну площу контакту кульок та робочої поверхні шпателя з поверхнею середовища обчислювали за формулами площі сфери (Формула 1) та бічної поверхні циліндра (Формула 2) відповідно.

$$S = 4\pi r^2 \quad (1)$$

$$S = 2\pi rh \quad (2)$$

де r – радіус, h – висота (довжина) циліндра.

При інокуляції шпателем інокулят розтирали одною стороною шпателя, тому було прийнято, що лише третина циліндричної поверхні контактує з поверхнею агару ($S/3$).

Для експериментів готували суспензію кожного штаму з добової бульйонної культури (м'ясо-пептонний бульйон). Добові культури осаджували при 3000 об./хв на центрифугі Liston C 2204, осад ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині. Процес центрифугування повторювали ще раз для відмивання клітин від залишків живильного середовища, осад ресуспендували повторно. Стандартизацію суспензій здійснювали відповідно до оптичного стандарту мутності 0,5 одиниць за шкалою McFarland ($\sim 8 \log$ КУО/мл) за допомогою денситометра Biosan DEN-1. Проводили серійні розведення суспензій із інокуляцією аликвот об'ємом 100 мкл на м'ясо-пептонний агар (МПА) у пластикових чашках Петрі. Суспензію кишкової палички додатково інокулювали на середовище Ендо. У половині чашок інокулят розтирали по поверхні шпателем. У іншій половині стерильні кульки висипали у чашки Петрі, закривали кришками і легенько струшували з боку в бік для рівномірного розповсюдження інокуляту по поверхні агару. Чашки Петрі інкубували при 37 °C протягом 24-48 год з наступним підрахунком колоній. Час на підготовку та проведення експерименту засікали секундоміром CASIO HS-3V-1RET. Враховували час на обгортання шпательів, підготовку пробірок з кульками, час на розповсюдження інокуляту цими засобами. Час на стерилізацію сухим гарячим повітрям та автоклавуванням не враховували. При розрахунку середніх величин в якості похибки використовували середнє квадратичне відхилення ($M \pm sd$). Експеримент проводили тричі. Статистичний аналіз проводили за середніми значеннями кількості колонієутворюючих одиниць (КУО), виражених в логарифмічних значеннях, із використанням t-критерію Стюдента. Відмінності при $p < 0,05$ вважали значущими.

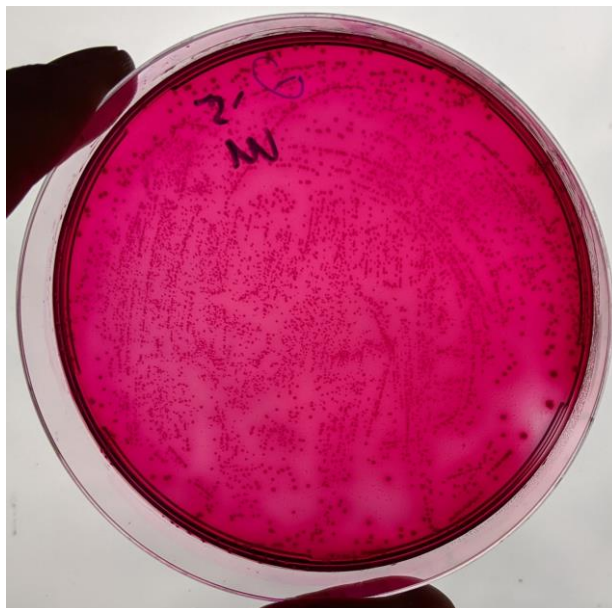
Результати та обговорення

На підготовку матеріалів та проведення інокуляції витрачалося менше часу при використанні шпательів (Таблиця 1.). У середньому для обгортання фольгою 5 шпательів було потрібно на 10 секунд менше, ніж на підготовку скляних кульок для інокуляції 5 чашок Петрі (внесення кульок у пробірки та їх закриття гумовими пробками). Приблизно така ж різниця (9,4 с) була при використанні шпательів та скляних кульок для інокуляції 5 чашок Петрі. Відповідно загальний час при використанні шпательів для інокуляції 5 чашок Петрі виявився коротшим в середньому на 19,4 секунди. Рівномірність інокулювання була візуально кращою при використанні кульок (Рис 1). При інокуляції суспензії з високою щільністю мікроорганізмів спостерігалися

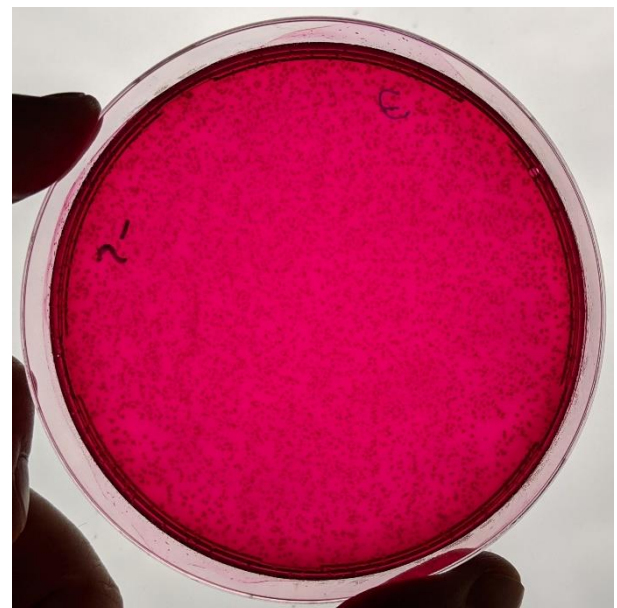
помітні скупчення колоній, які відповідали ходу рухів шпателя.

Таблиця 1. Витрати часу на експеримент.

	Інокуляція скляними кульками ($M \pm sd$)	Інокуляція шпателем ($M \pm sd$)
Час на підготовку, с	$32,0 \pm 1,7$	$22,0 \pm 2,6$
Час на інокуляцію, с	$61,7 \pm 2,5$	$52,3 \pm 3,2$
Загальний час, с	$93,7 \pm 4,0$	$74,3 \pm 5,9$



А



Б

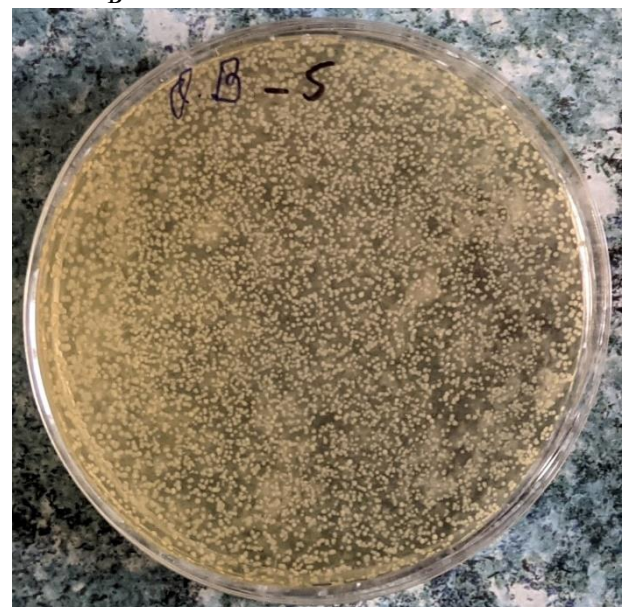
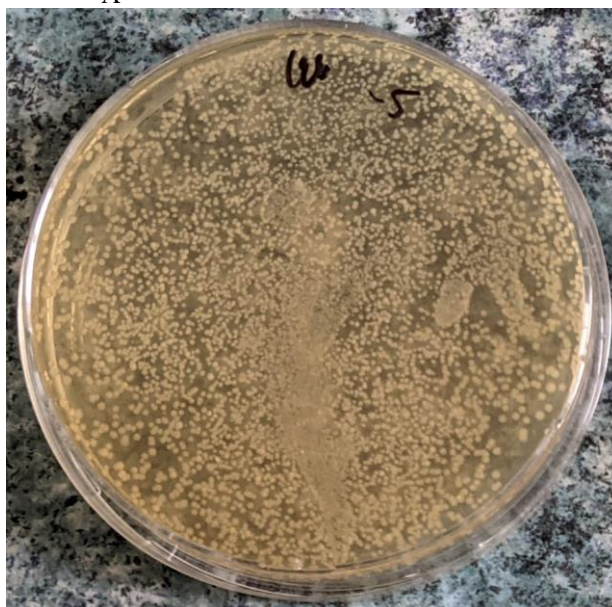


Рис. 1. А. Інокуляція шпателем Дригальського. Б. Інокуляція методом Копакабана. Середовища Ендо (вгорі) та МПА (внизу).

При майже однаковому діаметрі кульок та поперечника шпателів (3,7 мм та 3,6 мм відповідно) загальна площа контакту кульок з поверхнею середовища перевищувала площу контакту робочої

поверхні шпателя у приблизно 7,7 разів. Для шпателя вона становила 112,6 мм², для кульок – 866,8 мм². Така різниця могла б призвести до того, що частина інокуляту залишалась би на поверхні кульок і не потрапляла на

поверхню середовища. Проте результати підрахунку колонієутворюючих одиниць не показали статистично достовірної різниці при інокуляції суспензії *S. aureus* ATCC 6538 на МПА ($p = 0,48$) та суспензії *E. coli* ATCC 25922 на МПА та середовище Ендо ($p = 0,43$). Кількість КУО для обох тест-штамів становила приблизно $8 \log$

КУО/мл, що відповідало очікуванням при використанні оптичного стандарту мутності 0,5 одиниць за шкалою McFarland, і була статистично рівною при використанні обох методів інокуляції мікроорганізмів на щільні живильні середовища (Таблиця 2.).

Таблиця 2. Кількість КУО при інокуляції шпателем та методом Копакабана.

Тест штаб	Інокуляція скляними кульками, ($M \pm sd$)	Інокуляція шпателем, ($M \pm sd$)	t-критерій Стюдента
<i>S. aureus</i> , log КУО/мл	$8,08 \pm 0,18$	$8,07 \pm 0,09$	$p = 0,48$
<i>E. coli</i> , log КУО/мл	$8,04 \pm 0,11$	$8,06 \pm 0,15$	$p = 0,43$

Worthington та ін. (2001) повідомляли про використання методу Копакабана для інокуляції *E. coli* та *Saccharomyces cerevisiae* скляними кульками діаметром 4 мм. Вони при цьому використовували меншу кількість кульок (8-12 шт.). Ці ж дослідники повідомляли що час інокуляції мав тенденцію бути коротшим при методі Копакабана, хоча різниця не була статистично достовірною. Вони ж стверджували, що при методі Копакабана вдавалося отримати більше ізольованих колоній [8]. Sanders (2012) використовувала 10-12 кульок такого ж діаметру проте замість потрушування в різні боки спочатку застосовувала інокуляцію круговими рухами. При цьому вона повідомляла, що після такого способу інокуляції багато колоній росли вздовж зовнішнього краю середовища під бортиком чашок Петрі [9]. Це відповідає нашим спостереженням, найкращий результат інокуляції дає потрушування чашок Петрі у різні сторони з одночасним їх обертанням, що забезпечує рівномірне розповсюдження суспензії по поверхні агару. Prusokas та ін. (2021) у своїх експериментах застосовували 2, 5 та 10 кульок того ж діаметру 4 мм для інокуляції *E. coli* порівнюючи рухи для інокуляції вперед-назад та L-подібними рухами. Вони визнали останні як кращі для рівномірного розповсюдження інокуляту і рекомендували 25 повторів L-подібних рухів [10].

Крім ефективності застосування Worthington та ін. (2001) також вказали на економічність методу на момент написання рукопису їх статті. Скляні кульки є значно більш ударостійкими у порівнянні з ламкими скляними шпателями [8]. Проте використання металевих шпателів нівелює цю перевагу. Порівняння економічної складової методів інокуляції може бути перспективою подальших досліджень.

Висновки

Метод Копакабана займає більше часу для підготовки і у використанні, проте дає кращі результати у дисперсії бактерій по поверхні щільних середовищ для отримання ізольованих колоній. За результатами підрахунку колонієутворюючих одиниць інокуляція скляними кульками відповідає інокуляції шпателем. Цей метод може використовуватися при мікробіологічних

дослідженнях із застосуванням серійних розведень для інокуляції великої кількості чашок Петрі.

Comparison of ergonomic methods for inoculation of microorganisms on dense nutritional media

Pyatkovskyy T., Pokryshko O.

Introduction. Bacteriological method with plating techniques is often used for routine microbiological studies. Ergonomics is an important component of the safety and efficiency of work in a microbiological laboratory, the duration of microbiological studies can affect the results and productivity of the laboratory. Routine microbiological studies require the use of disposable and reusable materials and time consumption. Various methods maintain the sterility of experimental materials and allow the successful isolation of bacterial colonies. For plating of liquid samples from the patients or bacterial suspensions in Ukraine, disposable plastic or glass and metal reusable Drigalski spatulas are used. Abroad, for this purpose, in addition to spatulas, the Copacabana spreading method (also known as the bead method) is also used. **Material & methods.** Two strains of *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 6538 obtained from the culture collection of the Laboratory of Microbiological and Parasitological Research of TNMU were used for the experiments. Drigalski L-shaped glass spatulas with a diameter of 3.6 mm and a length of the working surface of 30.0 mm and glass beads with a diameter of 3.7 mm were used for plating of the suspension of microorganisms. For the experiments, a suspension of each strain was prepared from a broth. The cultures were centrifuged and the pellets were resuspended in sterile physiological solution. Serial dilutions of the suspensions were carried out with plating of 100 μ l aliquots on meat peptone agar (MPA) in plastic Petri dishes. *Escherichia coli* suspensions were additionally plated on Endo agar. Petri dishes were incubated at 37 °C for 24-48 h, followed by colony counting. The time for preparation and conducting the experiment was recorded. Time for wrapping spatulas, preparation of test tubes with balls, time for spreading the inoculum by these means was taken into account. Average values of the number of colony-forming units (CFU), expressed in logarithmic values, were used for statistical analysis. The experiment was performed in triplicates, comparison of means was performed using the Student's t-test. Differences at $p < 0.05$ were considered

significant. **Results & discussion.** The time for preparing materials and carrying out inoculation was shorter for spatulas. The total time when using spatulas to inoculate five Petri dishes turned out to be shorter on average by 19.4 seconds. The colonies distribution was visually better with the beads method. Plating a dense suspension of microorganisms produced noticeable clusters of colonies. The total plating surface area of the beads exceeded the plating area of the working surface of the spatula by approximately 7.7 times. It was 112.6 mm^2 for the spatula, and 866.8 mm^2 for the beads. However, such a difference did not influence the numbers of counting colony-forming units produced by using these methods. There were no statistically significant difference when inoculating *S. aureus* ATCC 6538 suspension on MPA ($p = 0.48$) and *E. coli* ATCC 25922 suspension on MPA and Endo agar ($p = 0.43$). **Conclusion.** The Copacabana method takes more time to prepare and use, but gives better results in dispersing bacteria over the surface of solid culture media to obtain isolated colonies. According to the results of counting colony-forming units, plating with glass beads corresponds to plating with a spatula. The beads method can be used in microbiological studies using serial dilutions for plating large numbers of Petri dishes.

Keywords: ergonomic methods, inoculation of microorganisms, dense nutritional media

References

1. Zukowska ME. Advanced methods of bacteriological identification in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2021;15(2).
2. Ogunware AE, Adedigba PA, Oyende YE, Adekoya AA, Daramola AR. Physicochemical, bacteriological and biochemical assessment of water samples from unprotected wells in Lagos state metropolis. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. 2020 May 8;3(4):24-36.
3. Zhou P, Liu Z, Chen Y, Xiao Y, Huang X, Fan XG. Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: a matter of concern. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2020 Sep;41(9):1124-5.
4. Farnsworth CW, Wallace MA, Liu A, Gronowski AM, Burnham CA, Yarbrough ML. Evaluation of the risk of laboratory microbial contamination during routine testing in automated clinical chemistry and microbiology laboratories. *Clinical chemistry*. 2020 Sep 1;66(9):1190-9.
5. Sánchez-Romero MI, Moya JM, López JJ, Mira NO. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*. 2019 Feb 1;37(2):127-34.
6. Savelyev Y, Gonchar A, Movchan B, Gornostay A, Vozianov S, Rudenko A, Rozhnova R, Travinskaya T. Antibacterial polyurethane materials with silver and copper nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*. 2017 Jan 1;4(1):87-94.
7. Risandi A, Fuady R, Sukmawati D, Husna SN, Nurjayadi M, Enshasy HE, Ridawati R. Isolation and screening of amylolytic yeast from *Paphiopedilum* sp., originating from Bedugul Botanical Garden, Bali, Indonesia. *InJournal of Physics: Conference Series* 2019 Dec 1 (Vol. 1402, No. 3, p. 033060). IOP Publishing.
8. Worthington MT, Luo RQ, Pelo J. Copacabana method for spreading *E. coli* and yeast colonies. *BioTechniques*. 2001 Apr;30(4):738-42.
9. Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: plating methods. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2012 May 11(63):e3064.
10. Prusokas A, Hawkins M, Nieduszynski CA, Retkute R. Effectiveness of glass beads for plating cell cultures. *Physical Review E*. 2021 May 17;103(5):052410.