Удмуртская Республика
Автономное образовательное учреждение Удмуртской Республики
«Региональный образовательный центр одаренных детей»
Объединение «Основы биотехнологии»

Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды «Открытия 2030» (с международным участием)

Номинация «Клеточная биология, генетика и биотехнология»

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА

«Методы хранения кишечной палочки (Escherichia coli) в условиях лаборатории Регионального образовательного центра одаренных детей»

Выполнила:
Пыхтеева Марина Сергеевна,
обучающаяся АОУ УР «РОЦОД»,
ученица 11 класса ГБОУ УР «Лицей №14»
г. Ижевска

Руководитель:
Иванова Марина Александровна,
педагог дополнительного образования
АОУ УР «РОЦОД»

Ижевск, 2022

Оглавление

Введение 3
1. Обзор источников 5
1.1. Общая информация о кишечной палочке 5
1.2. Для чего биотехнологам нужна кишечная палочка? 5
1.3. Методы хранения микроорганизмов 6
2. Методика исследований 8
2.1. Методика консервирования микроорганизмов 8
2.2. Методика проверки жизнедеятельности законсервированных микроорганизмов 10
3. Результаты исследований 11
Выводы 13
Заключение 14
Список источников информации 15
Приложение 16

Введение

В последнее десятилетие негативное отношение к миру микробов сменилось пониманием их жизненно важной роли в поддержании здоровья человека. Исторически сложившееся сообщество разных микроорганизмов (микробиота), обитающих, например, на коже, в мочеполовой системе или в желудочно-кишечном тракте, — не просто нормальный, но и необходимый компонент жизнедеятельности нашего организма. Кишечная палочка является нормальным обитателем кишечника человека и теплокровных животных и важной частью кишечной микрофлоры, поддерживающих нормальное физиологическое состояние у здоровых людей. Уже в первые дни после рождения в кишечнике человека появляется *Escherichia coli* и сохраняется на протяжении всей жизни [4].

E. coli не всегда обитают только в желудочно-кишечном тракте, способность некоторое время выживать в окружающей среде делает их важным индикатором для исследования образцов на наличие фекальных загрязнений. Бактерии легко могут быть выращены в лабораторных условиях, поэтому кишечная палочка играет важную роль в генетических исследованиях. E. coli является одним из самых изученных прокариотических микроорганизмов и одним из самых важных объектов биотехнологии и микробиологии. Кишечную палочку считают универсальным организмом для синтеза чужеродных белков.

Центру одаренных детей «ТАУ» была подарена музейная культура непатогенного штамма кишечной палочки со встроенным геном устойчивости к ампициллину. В Центре работают такие объединения как: «Генная инженерия», «Основы биотехнологии», «Микробиология», в их образовательном процессе подразумевается работа с непатогенными для человека микроорганизмами, а для изучения генной инженерии эта бактерия подходит, как никто другой.

Поэтому тема сохранения бактерий в лаборатории очень **актуальна.** Но метод субкультивирования для центра крайне неудобен. В литературных источниках нам удалось найти достаточно информацию о методах хранения микроорганизмов, однако многие из них довольно сложны и их трудно воспроизвести в условиях нашей лаборатории, особенно для школьников. Поэтому мы перед собой поставили следующую цель.

Цель: выявить наиболее эффективные способы хранения кишечной палочки (Escherichia coli) в условиях лаборатории Регионального центра одаренных детей.

Задачи:

1. Проанализировать существующие методы сохранения бактерий.
2. Выявить недостатки методов, найти способы упрощения некоторых условий методов.
3. Произвести консервирование бактерий несколькими способами.
4. Проверить на жизнеспособность через разный период времени.

Гипотеза: наиболее эффективным методом сохранения бактерии будет заморозка с глицерином.

Объект исследования: музейная культура непатогенного штамма кишечной палочки со встроенным геном устойчивости к ампициллину.

Предмет исследования: жизнедеятельность бактерий после длительного хранения различными способами.

Место и сроки поведения исследования.

Исследования проводились на базе Регионального образовательного центра одаренных детей в период с апреля 2022 по январь 2023 года. Планируются продолжение работы и дальнейшее наблюдения за жизнедеятельностью бактерий.

Закладка на хранение микроорганизмов осуществлялось в апреле 2022 года. Посев на питательные среды для проверки жизнедеятельности проводилось 2 раза в августе и октябре.

1. Обзор источников

1.1. Общая информация о кишечной палочке

Кишечная палочка (лат. *Escherichia coli*; общепринятое сокращение *E. coli*) — вид грамотрицательных палочковидных бактерий (рис. 1), факультативных анаэробов, входящий в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Эти бактерии устойчивы во внешней среде, длительное время сохраняются в почве, воде, фекалиях. Хорошо переносят высушивание.

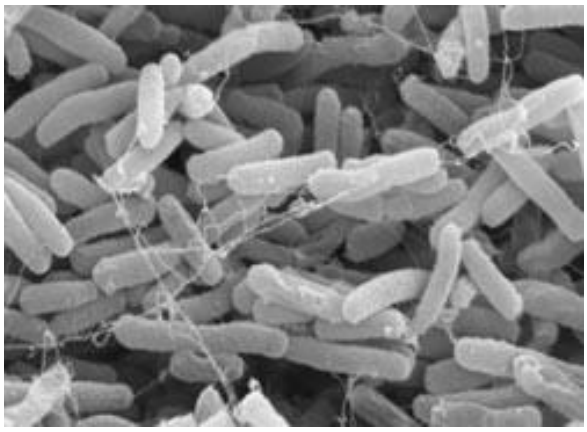


Рис.1 Микрофотография *Escherichia coli*

Кишечные палочки обладают способностью к размножению в пищевых продуктах, особенно в молоке. Быстро погибают при кипячении и воздействии дезинфицирующих средств (хлорной извести, формалина, фенола, сулемы, едкого натра и др.). Кишечные палочки более устойчивы во внешней среде по сравнению с другими энтеробактериями. Прямой солнечный свет убивает их в течение нескольких минут, температура 60°С и 1 % раствор карболовой кислоты — в течение 15 минут. Часть кишечных палочек имеет жгутики и подвижны. У других кишечных палочек жгутики и способность к движению отсутствуют [1].

1.2. Для чего биотехнологам нужна кишечная палочка?

Кишечная палочка неприхотлива и быстро размножается. Содержать их в лаборатории легко и дешево, поэтому они являются излюбленной моделью для изучения молекулярных процессов, общих для широких групп организмов. Эти бактерии сыграли важную роль в исследовании трансляции, транскрипции, репликации. Конъюгацию впервые заметили именно на палочках. Ферменты рестрикции тоже впервые нашли у E. coli. Генные инженеры используют бактерии как «живую фабрику» для производства плазмид, биотехнологи заставляют их вырабатывать лекарства.

Кишечная палочка – универсальный организм для синтеза чужеродных белков. Посредством плазмид в неё вводятся чужие гены, что позволяет осуществить биосинтез белков для промышленной ферментации. Также разработаны системы для синтеза E. coli рекомбинантных белков.

Модифицированные культуры клеток используют при разработке вакцин, для синтеза иммобилизованных ферментов и решения многих других производственных задач.

1.3. Методы хранения микроорганизмов

Согласно статье В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев «Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития» существуют следующие распространение методы хранения микроорганизмов:

1. Консервация замораживанием при низких температурах. Самый простой из изучаемых способов сохранения бактерий. Суть метода заключается в помещении чашки Петри в морозильную камеру, с температурой около -20 °С.

2. Хранение под минеральным маслом. Масло стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 1–2 ч. Культуры выращивают в пробирках – на скошенном питательном агаре (косячках), в толще агаризованной среды (столбиках) или в жидкой питательной среде соответствующего состава. В пробирки с выросшими микроорганизмами стерильно наливают слой минерального масла высотой не менее 2 см (косячки должны быть покрыты полностью). Слой масла служит защитой культур от высыхания, одновременно понижая их метаболизм. Покрытые маслом культуры хранят в вертикальном положении в холодильнике. Для проверки сохранности культур периодически определяют их жизнеспособность. Обычно культуры пересевают 1–2 раза в год на свежую среду.

3. Высушивание на желатине. Многие гетеротрофные бактерии можно хранить в высушенных каплях или дисках желатины. Обычно в таком виде бактерии лучше сохраняются при температуре минус 20 °С, чем при субнулевых и тем более чем при комнатной температуре. Желатиновые культуры готовят следующим образом. Культуры выращивают в подходящих для них средах. Осадок клеток, отделенный центрифугированием в стерильных условиях, ресуспендируют в малом количестве жидкой среды, переносят в пробирку с 2–5 мл расплавленной пищевой желатины и инкубируют при температуре 30 °С до плотности 108–1010 клеток/мл. Затем из пробирки отбирают с помощью стерильной пастеровской пипетки или шприца требуемое количество бактериальной суспензии и раскапывают ее на дно стерильной пластмассовой чашки Петри. Чашку Петри помещают в эксикатор, содержащий пятиокись фосфора, и вакуумируют. Высохшие капли желатины переносят в стерильные пробирки с завинчивающимися крышками и хранят в холодильнике.

4. Высушивание на бумаге. Сравнительно простым и недорогим способом хранения бактерий является их высушивание на полосках или дисках стерильной фильтровальной бумаги. В общей пробирке или в пузырьке с закручивающейся крышкой можно хранить много дисков, содержащих одну и

ту же культуру. При необходимости диск достают стерильным пинцетом и в стерильных условиях вносят его в соответствующую питательную среду. Техника этого метода заключается в следующем. Стерильную бумагу пропитывают суспензией бактерий, содержащей не менее 108 клеток/мл, и высушивают на воздухе или под вакуумом. Бактерии лучше выживают при высушивании под вакуумом. Полоски или диски бумаги хранят в запечатанных пробирках в эксикаторах, которые лучше всего поместить в холодильник.

5. Хранение в воде и водно-солевых растворах.

Техника проведения. Клетки с плотностью не более 109 КОЕ/мл вносят в пробирку с индифферентной жидкостью с физиологическим ионным составом и подходящим pH. Оптимальный pH для месячного сохранения E. Coli – 8 ед. Пробирки с инокулятом хранят в холодильнике при температуре 4–8 °C

6. Консервирование высушиванием из замороженного состояния.

Высушивание из замороженного состояния (лиофилизация, сублимационное высушивание, замораживание-высушивание) – широко распространенный способ высушивания биоматериалов из замороженного состояния, при котором вода испаряется в условиях вакуума без оттаивания льда, что позволяет полностью сохранять первичную структуру объекта сушки. При его использовании многие физиологически разнородные виды бактерий и бактериофаги удается сохранять в жизнеспособном состоянии 30 лет и более. Для этого высушенные клетки должны быть защищены от действия кислорода, влаги и света. По лиофилизации микробных культур и биопрепаратов имеются многочисленные разработки.

Проанализировав все методы, мы пришли к заключению, что попробуем сохранить наших микроорганизмов с помощью таких способов как:

- Консервация замораживанием при низких температурах
- Хранение под минеральным маслом
- Высушивание

Данные методы являются одними из самых простых, не требующих дорогостоящего оборудования и в то же время незаменимых в работе с микроорганизмами.

2. Методика исследований

2.1. Методика консервирования микроорганизмов

1. Замораживание. Бактерии в стерильных условиях были высажены методом истончающегося штриха на мясопептонный агар (далее питательная среда) в чашку Петри. Чашка была помещена в морозильную камеру, где температура достигала -20 °С (рис.2).

Рис.2 Чашка Петри с замороженными колониями кишечной палочки

2. Хранение в глицерине. Бактерии в стерильных условиях были смешаны с глицерином, а потом помещены в морозильную камеру с температурой -20 градусов по Цельсию (рис.3).

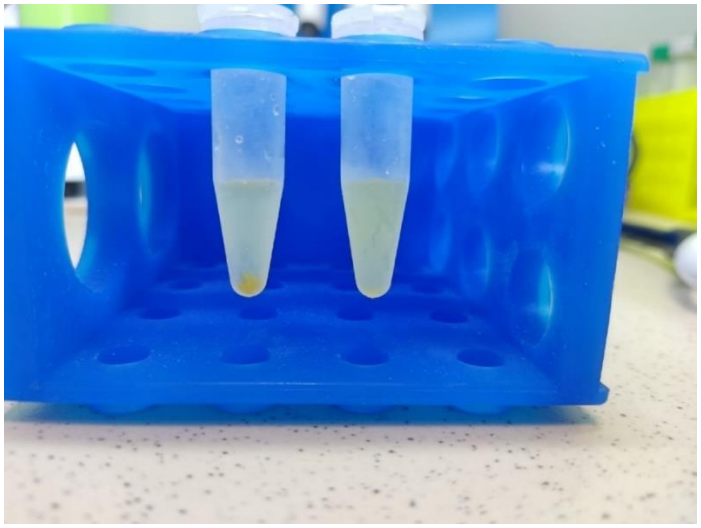


Рис.3 Микропробирки с кишечной палочкой смешанной с глицерином

3. Хранение под вазелином. Бактерии были посеяны на скошенный агар в пробирках в стерильных условиях. После того, как на питательной среде

появились колонии бактерии, их заливают простерилизованным вазелином и помещают в холодильник (рис.4).

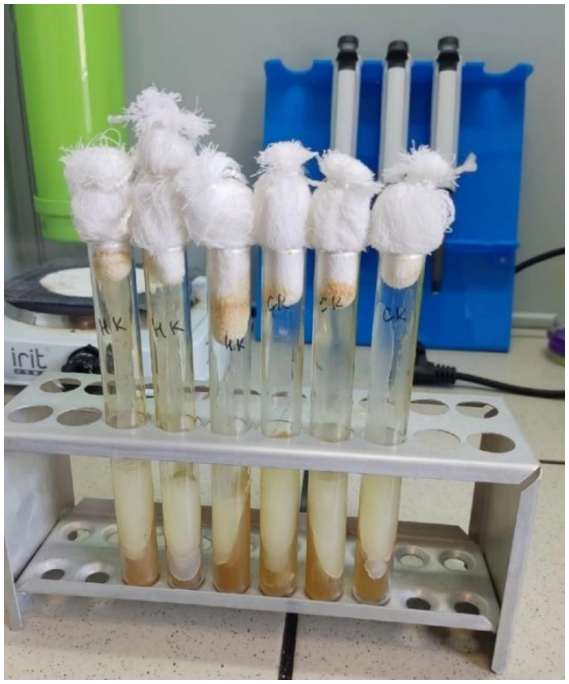


Рис.4 Пробирки с кишечной палочкой, залитые вазелином

4. Высушивание на агарозе. Бактерии в стерильных условиях были смешаны с дистиллированной водой, а далее с расплавленной агарозой. Получился большой желейный пласт с бактериями, который был разрезан и высушиваются (рис 5). Получившиеся пластинки помещаются в стерильную емкость (рис 6).

Рис.5 Сушка агарозной пластинки

Рис.6 Емкость с высушенным пластинками

Данный метод не описан в литературе и был разработан нами на основе таких методов как: высушивание на бумаге и высушивание на желатине. С

нашей точки зрения, два эти метода имеют как плюсы, так и минусы. Проанализировав их, мы выяснили, что для высушивания лучше подойдет желатин чем бумага, однако метод высушивания на желатине очень трудоемкий и требует технического оборудования которого нет в нашем центре.

2.2. Методика проверки жизнедеятельности законсервированных микроорганизмов

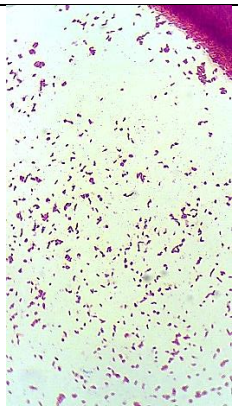
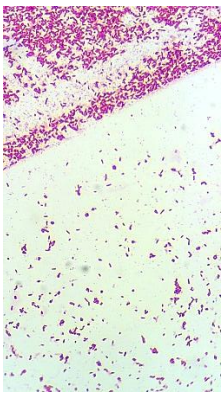
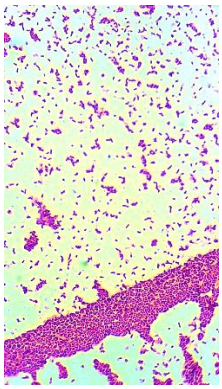
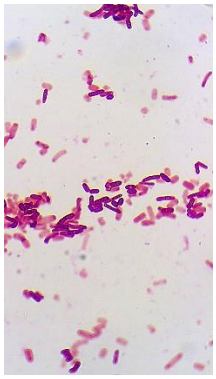
Посев для проверки жизнедеятельности бактерий проводился методом истончающегося штриха в чашки Петри на мясопептонный агар. Агарозные пластинки с высушенными микроорганизмами изначально размачивались в стерильной воде, а потом были положены на мясопептонный агар в чашки Петри.

Для каждого метода использовалось три повторности. А также закладывались незасеянные чашки Петри для отрицательного контроля.

3. Результаты исследований

Жизнедеятельность хранящихся бактерий провеялось с помощь посева на питательную среду.

Первый посев 04.08.2022

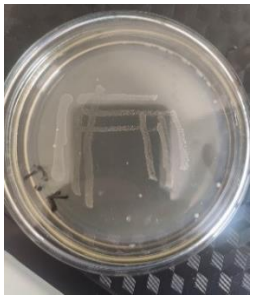
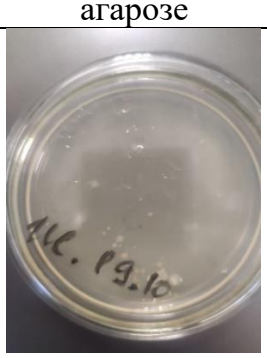
	Замораживание	Хранение в глицерине	Хранение под вазелином	Высушивание на агарозе
фото				
Окраска по Грамм				

Таб. 1 Фотографии чашек Петри с выросшими колониями E. coli и окраска бактерии по Граму с данных чашек (срок хранения бактерий 4 месяца)

Первый посев показал, что во всех чашках Петри оказались жизнеспособные клетки бактерий, которые дали начало колониям. Со всех чашек Петри были сделаны микропрепараты и окрашены по Граму.

Окраска показала наличие грамотрицательных палочковидных бактерий. Таким образом спустя 4 месяца удалось получить новые колонии кишечной палочки из законсервированных образцов.

Второй посев. 19.10.2022

Замораживание	Хранение в глицерине	Хранение под вазелином	Высушивание на агарозе
			

Таб. 2 Фотографии чашек Петри с выросшими колониями E. coli и окраска бактерии по Граму с данных чашек (срок хранения бактерий 6 месяца)

Второй посев показал, что все бактерии перенесли консервацию. Спустя 6 месяцев удалось получит новые колонии кишечной палочки. Окраска по Граму, также показала наличие грамотрицательных палочек. Однако в образце бактерий, взятых из чашки, куда были посеяны бактерии хранившиеся высушенными, были обнаружены и небольшое количество грамположительных бактерий (рис.7), что говорит о контаминации пробы. На каком этапе это произошло, нам предстоит еще выяснить.

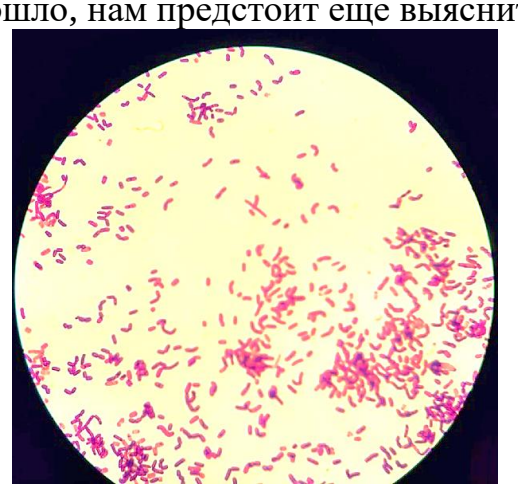


Рис. 7 Фото временного микропрепарата кишечной палочки. Окраска по Граму.

Метод хранения	Появление колоний		Примечание
	Август	Октябрь	
Замораживание	+	+	
Хранение в глицерине	+	+	
Хранение под вазелином	+	+	
Высушивание на агарозе	+	+	Появились посторонние бактерии
Контроль	-	-	

Таб. 3 Сравнительная таблица проверки на жизнеспособность кишечной палочки после консервирования различными способами.

Таким образом можно сказать, что по истечении 6 месяцев все способы хранения бактерий показали себя эффективно, в том и числе и метод высушивания, который мы изменили для простоты применения.

Выводы

На основании проведенного нами исследования, можно сделать следующие выводы:

1. Проанализировав существующие методы сохранения бактерий, нами были выбраны 4 способа. Это замораживание, хранение под вазелином, хранение в глицерине и высушивание.
2. Наибольшие затруднения вызвал способ высушивания на желатине. Он включал в себя много условий, которые мы не могли выполнить. Поэтому было принято решение его модифицировать.
3. С помощью известных методик и одной изменённой нами, были заложены на хранения бактерии кишечной палочки.
4. Через 4 и 6 месяцев законсервированные пробы бактерий были проверены на жизнеспособность. Как показал эксперимент все во всех образцах были живые клетки, которые при пересеве на питательную среду образовали колонии. При окрашивании их по Граму, они показали наличие грамотрицательных палочек.

Заключение

Таким образом, все способы сохранения показали себя эффективно через 6 месяцев хранения. Наша гипотеза подтвердилась частично.

Мы собираемся продолжать наш эксперимент:

- хранить и проверять на жизнеспособность бактерии как минимум в течении 1 года;
- выяснить причины «загрязнения» другими бактериями.

Так же в наших планах проверить бактерии на наличие гена устойчивости к ампициллину, чтобы понять не происходит ли потеря каких-либо качеств у бактерий при их длительном хранении.

Список источников информации

1. Escherichia coli (кишечная палочка): сайт Гастроскан [Электронный ресурс]// URL: https://www.gastroscan.ru/handbook/118/3200 (дата обращения: 20.10.2022).
2. Брюханов, А. Л. Длительное хранение строго анаэробных микроорганизмов в глицерине / А. Л. Брюханов, А. И. Нетрусов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – № 2. – С. 2000–2003.
3. Герна, Р. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии: пер. с англ. / Р. Герна ; под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1983. – С. 512–534.
4. Кишечная палочка: сайт СМ-Клиника [Электронный ресурс]// Статья опубликована: 26.12.2013 г. Последнее обновление: 05.10.2022 г. URL: https://www.smclinic-spb.ru/doctor/gastroenterolog/zabolevania/1195-kishechnya-palochka (дата обращения: 20.10.2022).
5. Похиленко, В. Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121.
6. Сидякина, Т. М. Консервация микроорганизмов / Т. М. Сидякина. – Пущино: ОНТИ НЦБИ, 1985. – 63 с.
7. Суворов А. Н. Мир микробов и человек [Электронный ресурс]// «Природа» №5, 2015 URL: https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/433058/Mir_mikrobov_i_chelovek?ysclid=l9bsqzhmox733128123 (дата обращения: 20.10.2022).
8. Троицкая, Е. Н. Сравнение методов хранения культур штаммов Bac. Thuringiensis var.galleriae / Е. Н. Троицкая // Прикладная биохимия и микробиология. – 1979. – Т. 15. – № 3. – С. 402–408.
9. Тутова, Э. Г. Консервация микробиологических препаратов и штаммов-продуцентов / Э. Г. Тутова, М. С. Идельчик. – М.: НИИТЭХИМ, 1986. – Вып. 10 (197). –84 с.
10. Юшин Ю.В. Обзор питательных сред, используемых для культивации рекомбинантной Escherichia coli/ Юшин Ю.В., Подкопайло Р.В., Петрова Д.А., Егоров К.А., Трухин В.П. – С. 445

Приложение

Рис.8 Приготовление питательной среды

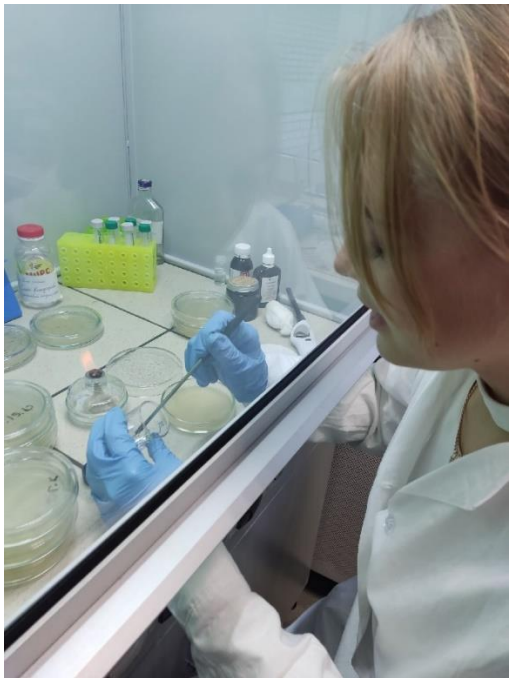


Рис.9 Посев кишечной палочки на питательную среду