

Оглавление	
<u>Тема работы</u>	2
<u>Состав коллектива</u>	2
<u>Научное содержание работы</u>	2
<u>1. Постановка задачи</u>	2
<u>2. Современное состояние проблемы</u>	3
<u>3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.</u>	5
a. Моделирование светорассеяния палочковидных и простых форм шаровидных бактерий	5
b. Решение обратной задачи светорассеяния.....	7
<u>4. Полученные результаты</u>	7
<u>5. Иллюстрации, визуализация результатов</u>	8
a. Моделирование светорассеяния парных и делящихся клеток палочковидных бактерий....	8
b. Экспериментальная проверка методов.....	9
Культуры клеток бактерий	9
Измерения на сканирующем проточном цитометре	9
Измерения на оптическом микроскопе	9
Статическая характеристика шаровидных и палочковидных бактерий	9
Список литературы	13
<u>Эффект от использования кластера в достижении целей работы.</u>	16
<u>Перечень публикаций, содержащих результаты работы (если есть).</u>	16
<u>Ваши впечатления от работы вычислительной системы и деятельности ИВЦ НГУ, а также</u>	
<u>Ваши предложения по их совершенствованию.</u>	16

Тема работы

Развитие метода решения обратной задачи светорассеяния характеристики шаровидных и палочковидных бактерий с помощью сканирующей проточной цитометрии

Состав коллектива

Конохова Анастасия Игоревна, магистрант ФФ НГУ, лаборант ИХКГ СО РАН

Научный руководитель: Юркин М.А., к.ф.-м.н., с.н.с. ИХКГ СО РАН

Научное содержание работы

1. Постановка задачи

Бактерии являются важным для изучения объектом прежде всего потому, что жизнь и деятельность человека неразрывно связана с ними. Многие бактерии являются возбудителями различных опасных инфекций. Другие бактерии наоборот находятся в симбиотических отношениях с организмом человека и играют важную роль в регуляции многих физиологических процессов, включая метаболические и иммунные реакции. Также бактерии широко используются в различных отраслях промышленности. Например, молочнокислые бактерии *Lactobacillales* являются незаменимыми в пищевой, а бактерии *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* – в фармацевтической отрасли. Кроме того, благодаря простоте своего строения, быстрому росту и размножению бактерии служат хорошими модельными объектами для изучения разнообразных биохимических процессов.

Задача идентификации и характеристики бактерий в составе сложных полидисперсных систем является первостепенной для многих областей и затрагивает широкий спектр решаемых в них вопросов, включая:

- медицинскую диагностику инфекционных заболеваний человека и животных;
- исследование антибиотикорезистентности бактериальных штаммов для проверки существующих и разработки новых лекарственных препаратов;
- проведение фундаментальных научных исследований;
- стандартизацию микробиологических коллекций на основе быстрого сравнения и классификации штаммов из различных изолятов;
- проведение бактериологического анализа различных смывов и пищевых продуктов на предмет микробиологического загрязнения патогенными и условно-патогенными микроорганизмами на разных стадиях производства в пищевой промышленности.

Далеко не все из существующих методов и подходов микробиологического анализа обладают достаточно высокой скоростью или точностью, необходимых для решения вышеупомянутых вопросов, что является особенно критичным для медицинской диагностики и при проведении микробиологического контроля безопасности в сфере пищевой промышленности. Актуальным направлением развития в данной области является разработка новых, быстрых и точных методов характеристики бактериологических культур в различных биологических образцах.

Данная работа посвящена разработке метода характеристики шаровидных и палочковидных бактерий по индикатрисам светорассеяния, измеренным на сканирующем проточном цитометре (СПЦ). Разрабатываемый метод требует решения фундаментальных проблем взаимодействия электромагнитного излучения с клетками бактерий. Для определения характеристик одиночных частиц по светорассеянию необходимо решить ряд сложных задач, которые объединяются в так называемые прямую и обратную задачи светорассеяния. Восстановления информации об объекте методом СПЦ в общем случае сводится к решению параметрической обратной задачи, которое достигается путем сравнения экспериментально измеренной картины светорассеяния с результатами моделирования. При этом для получения точных и надежных результатов анализа важную роль играют не только объем и качество измеряемой оптической информации, но и различные используемые предположения и методы, применяемые для ее обращения.

В работе рассматриваются основные вопросы, связанные с решением прямой и обратной задач светорассеяния и характеристикой палочковидных бактерий методом СПЦ, а именно:

- оптические модели исследуемых в работе объектов и их параметризация;
- методы моделирования светорассеяния одиночными частицами;
- методы решения обратной задачи светорассеяния для частиц сферической и несферической формы.

Особое внимание уделяется вопросу точности определения формы и характеристик исследуемых объектов, который играет первоочередную роль при анализе многокомпонентных сред, содержащих популяции частиц, различные по статическим или динамическим характеристикам.

Возможности СПЦ для анализа бактериальных культур рассматривались на примере анализа культур палочковидных и шаровидных бактерий в форме одиночных микрококков и их димеров. На основе полученных экспериментальных данных исследовалась возможность идентификации микроорганизмов в составе гетерогенных популяций, включающих как коккообразные, так и палочковидные формы клеток. Возможность перехода от статической к динамической характеристике полидисперсных систем рассматривалась на примерах характеристики роста палочковидных бактерий *Escherichia coli*.

2. Современное состояние проблемы

Классическими методами микробиологического анализа являются культуральные методы, основанные на посевах исследуемого биологического материала на селективных питательных средах, которые направлены на получение чистых культур в виде отдельных колоний микроорганизмов с целью их последующей идентификации на основе морфологических, биохимических и серологических критериев. Уже более 100 лет культуральные методы служат «золотым стандартом» микробиологического анализа, и до сих пор считаются наиболее надежными и востребованными для многочисленных применений [1,2]. Но несмотря на высокую точность и специфичность, они не лишены существенных недостатков, среди которых основными являются длительность исследования (от 48 до 96 ч) и высокие требования к забору материала. И именно время, отводимое на микробиологический анализ, является наиболее критичным, особенно в медицинской диагностике, при выявлении возбудителя инфекции и его исследовании на устойчивость к антибиотикам, когда с каждым часом откладываемое лечение угрожает жизни пациента.

В качестве альтернативных методов микробиологического анализа широкое развитие получили следующие три основных направления: 1) методы биохимического анализа и детекции, 2) молекулярные методы идентификации микроорганизмов, включающие главным образом генетический анализ с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3,4], и 3) спектральные методы протеомного и метаболомного анализа, включающие методы газовой хроматографии, масс-спектрометрии, Фурье-спектроскопии в инфракрасной области [5] и матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF) [6].

Спектральные методы, такие как MALDI-TOF, считаются одним из наиболее перспективных экспресс-решений задачи идентификации бактерий. Они обладают высокой специфичностью и требуют всего несколько часов на анализ. При этом точность идентификации микроорганизмов на уровне семейств, родов, отдельных видов и подвидов достигает практически 97% [7]. Анализ основывается на получении масс-спектра высоко консервативных и видоспецифичных рибосомальных белков исследуемого объекта, и его сравнении с масс-спектрами, содержащимися в базе данных. Как правило, для исследования используется материал чистой культуры, выращенный на твердой питательной среде, но также возможна идентификация микроорганизмов в жидких питательных средах и биологических жидкостях [8,9]. Главным ограничением метода является его неприменимость для анализа сред, потенциально содержащих несколько видов бактерий, из-за невозможности разделения перекрывающихся спектров.

Молекулярно-генетические методы, основанные на ПЦР (полимеразная цепная реакция), также обладают высокой специфичностью и позволяют сократить время, необходимое на проведение микробиологического анализа: весь процесс, от поступления биологического материала до получения конечного результата, обычно занимает не более дня. Но несмотря на высокую скорость и

производительность ПЦР, достоинством и, вместе с тем, главным недостатком метода является крайне высокая чувствительность [10]. С одной стороны, это позволяет детектировать наличие даже одного микроорганизма в образце, когда стандартные серологические и бактериологические исследования не дают положительного результата вследствие недостаточной для обнаружения концентрации клеток (например, при контроле инфекционной безопасности донорской крови). С другой стороны, экстремальная чувствительность метода может приводить к ложно-положительным результатам вследствие даже небольшого загрязнения исследуемого материала [11]. Более того, положительные результаты не обязательно свидетельствуют о наличии в образце живых микроорганизмов, подтверждая лишь наличие их нуклеиновых кислот, которые могут быть дериватами погибших клеток [12].

Несмотря на высокую специфичность и скорость анализа, существенным ограничением рассмотренных методов является, во-первых, значительная потеря в точности анализа при изучении полидисперсных систем, содержащих неизвестный вид микроорганизмов, или систем, включающих несколько культур клеток. Во-вторых, их применимость ограничивается достаточно узким спектром задач, куда не входит проведение исследований, подразумевающих определение жизнеспособности клеток или отслеживание некоторой динамики их роста, например, при изучении резистентности микроорганизмов к противомикробным препаратам [13–15], оценке эффективности и стабильности процессов производственной ферментации [16,17], или при идентификации или селекции микроорганизмов, обладающих определенными характеристиками, например, лучшими показателями роста при заданных условиях [18,19].

Отдельного внимания заслуживают оптические неинвазивные методы, включающие, помимо упоминавшейся выше Фурье-спектроскопии в инфракрасном диапазоне, измерения светорассеяния, флуоресцентный анализ, комбинационное рассеяние света и флуоресцентную спектроскопию [20,21]. Условно все эти оптические методы можно разделить на методы, анализирующие (1) колонии бактерий [22–24], (2) суспензии микроорганизмов [25–27] и (3) отдельные клетки [28–32]. При этом все большее значение отводится методам, позволяющим проводить исследования популяции бактерий на уровне одиночных клеток. Основным преимуществом данного подхода к анализу бактериальных культур является повышение эффективности анализа за счет уменьшения эффекта усреднения наблюдений при изучении культуры как одного целого, и повышения чувствительности за счет возможности детекции изменений, происходящих на уровне одной клетки [33,34]. Помимо этого, только с помощью такого подхода можно надежно решать задачи детекции и идентификации бактерий, особенно в малых примесях. Методы анализа сложных дисперсных систем в одночастичном режиме основаны главным образом на принципах проточной цитометрии, и в настоящее время представляют реальную альтернативу стандартным микробиологическим тестам [35,36]. В литературе неоднократно предполагалось и обосновывалось, что в комбинации с измерением пространственного распределения характеристик рассеянного света, включая его интенсивность и поляризацию, которые содержат в себе полную информацию о морфологии объекта, эти методы несут в себе большой потенциал для решения задач идентификации и характеристики бактерий [25,37–43]. К сожалению, проточные цитометры стандартной конфигурации не позволяют измерять светорассеяние с пространственным разрешением, достаточным для характеристики морфологии одиночных клеток [44]. Для измерения большого объема оптической информации существует несколько других подходов [32,45], в том числе применяемая в данной работе технология сканирующей проточной цитометрии [46].

Возможность дифференциации четырех видов бактерий по светорассеянию была продемонстрирована в работах [28] и [29], где авторы модифицировали проточный цитометр для измерения светорассеяния в четырех разных кольцевых диапазонах телесного угла. В работе [32] дифференциация четырех типов бактерий была осуществлена на основании измерения углового распределения интенсивности рассеянного света, восстановленного с помощью преобразования Фурье фазовых изображений одиночных клеток бактерий. Индикатрисы светорассеяния одиночных бактерий *E. coli* в логарифмической и стационарной фазах роста были впервые измерены в широком угловом диапазоне на сканирующем проточном цитометре в работе [47]. Авторы показали качественные отличия в индикатрисах бактерий этих двух фаз. Так же были приведены примеры моделирования светорассеяния одиночными клетками, но из-за большой вычислительной сложности осуществить их характеристику по индикатрисе в то время оказалось невозможным.

В настоящее время наиболее продвинутой технологией с точки зрения объема оптической информации, измеряемой для отдельных частиц, является сканирующая проточная цитометрия (СПЦ).

Данная технология позволяет измерять зависимость интенсивности рассеянного излучения от угла (индикатрису светорассеяния) для одиночных частиц в потоке с большой скоростью (до 1000 частиц в секунду). Использование большого объема информации, содержащейся в каждой индикатресе, в комбинации с передовыми методами решения прямой и обратной задачи светорассеяния, позволяет характеризовать морфологию (размер, форму, внутреннюю структуру и показатель преломления) этих частиц с субдифракционным разрешением, используя некоторую оптическую модель, описываемую несколькими параметрами. Целью настоящей работы является развитие метода СПЦ для характеристики бактериальных культур, содержащих палочковидные и шаровидные формы клеток.

3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.

а. Моделирование светорассеяния палочковидных и простых форм шаровидных бактерий

Для морфологии бактерий характерны три основных формы: сферическая (шаровидная), цилиндрическая (палочковидная) и извитая, причем преобладающее число видов микроорганизмов представлено именно первыми двумя.

Кокки, или сферические бактерии, после деления образуют характерные структуры, в виде различных скоплений одиночных шаровидных клеток, которые по своему взаимному расположению разделяются на так называемые микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины и стафилококки. В данной работе клетки исследуемых штаммов бактерий *Micrococcus spp.* были представлены наиболее простыми из перечисленных форм, в виде отдельно расположенных клеток сферической формы – микрококков - и их пар – диплококков. В качестве оптических моделей для их описания соответственно были предложены:

- модель гомогенной сферы, описываемая двумя параметрами: размером d и показателем преломления n ;
- димер, состоящий из двух идентичных сфер, описываемый тремя параметрами: размером d и показателем преломления n образующих его мономеров и углом ориентации β (угол ориентации клетки в потоке СПЦ).

Варьирование размера и показателя преломления одиночных кокков в составе диплококков было сочтено нецелесообразным и не имеющим биологического смысла, так как в процессе деления бактерий образуются две идентичные дочерние клетки.

Клетки палочковидных бактерий, считающихся самой многочисленной группой прокариот, как правило, имеют осевую симметрию и цилиндрическую форму с округлыми или заостренными концами. Так, например, модель цилиндра с полусферическими концами была ранее предложена в работе [48] для моделирования светорассеяния палочкообразными клетками *Escherichia coli*. Согласно микроскопическим наблюдениям, ее можно использовать для описания формы и других палочковидных бактерий, которые изучались в данной работе, включая *Bacillus subtilis* и *Ochrobactrum sp.* Предлагаемая модель описывается четырьмя параметрами: тремя морфологическими (длина l ,

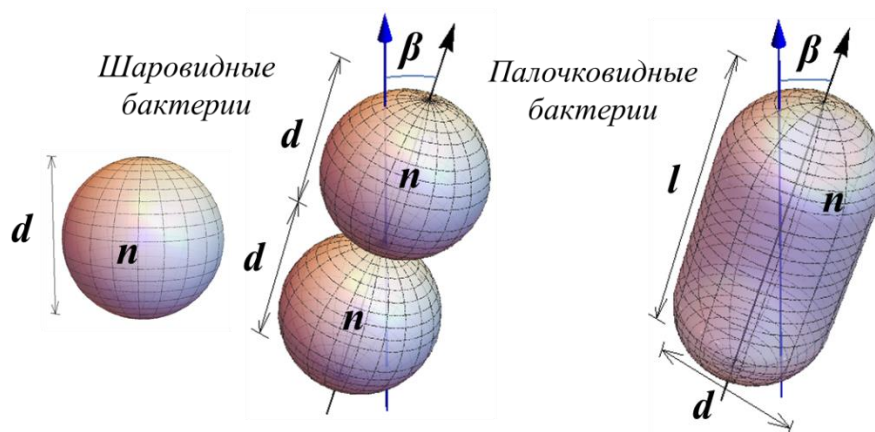


Рис. 1. Оптические модели шаровидных (микрококки и диплококки) и палочковидных бактерий.

диаметр d и показатель преломления n) и одним вспомогательным (угол ориентации β клетки в потоке СПЦ). При этом наибольший интерес представляют параметры длины и диаметра, с помощью которых можно описать размер клетки, а также проследить за его изменением в процессе роста.

Иллюстрации оптических моделей коккообразных и палочковидных форм бактерий представлены на Рис. 1.

Моделирование светорассеяния для сферических клеток бактерий осуществлялось с помощью теории Ми [49]. Моделирование светорассеяния частицами несферической формы (димеры, цилиндры) производилось с помощью метода дискретных диполей (МДД), используя программу с открытым исходным кодом ADDA v.1.0 [50]. Для ускорения решения обратной задачи светорассеяния, требующей многократного решения прямой задачи, для несферических частиц рассчитывались базы данных теоретических индикатрис. Вычисления производились на вычислительном кластере Суперкомпьютерного центра Новосибирского Государственного Университета [51].

Индикатрисы рассчитывались для углов рассеяния θ от 5° до 70° с шагом 0.5° , используя стандартную дискретизацию 12 диполей на длину волны, с интегрированием по азимутальному углу φ от 0° to 360° по 64 точкам. При расчетах на различных длинах волн, значение для показателя преломления окружающей среды n_0 (0.9% водный раствор хлорида натрия) устанавливалось согласно дисперсионному соотношению, приведенному в [52]. В частности, для длин волн 660, 488 и 405 нм его значение составило 1.333, 1.339 и 1.345, соответственно.

На примере расчета базы данных палочковидных бактерий, описываемых моделью цилиндра с полусферическими концами, командная строка выглядела следующим образом:

```
adda -shape capsule RAT -lambda WLEN -size DIAM -m REL_REF_INDEX 0.00000 -scat_grid_inp 1.txt -phi_integr 7 -dir DIRECTORY -orient 0 BETA 0 -dpl 12
```

где RAT - h/d отношение длины цилиндра к его диаметру, WLEN –длина волны в среде, DIAM – диаметр цилиндра, REL_REF_INDEX – относительный показатель преломления частицы, DIRECTORY – директория для сохранения файлов расчета, BETA – угол ориентации β .

Диапазоны, в которых были насчитаны базы данных из 200 000 индикатрис для коккообразных бактерий и 300 000 индикатрис для палочковидных бактерий, приведены в следующих таблицах:

Таблица 1. Границы базы данных для бактерий в форме диплоков.

	Нижняя граница	Верхняя граница
Диаметр мономера в составе димера d	0.1 мкм	1.5 мкм
Показатель преломления n	1.35	1.55
Угол ориентации β	0°	90°

Таблица 2. Границы базы данных для палочковидных бактерий.

	Нижняя граница	Верхняя граница
Длина l	0.5 мкм	8 мкм
Диаметр d	0.3 мкм	2.2 мкм
Показатель преломления n	1.39	1.41
Угол ориентации β	0°	30°

Границы баз данных были выбраны таким образом, чтобы покрыть все возможные значения параметров изучаемых клеток. Но для показателя преломления палочковидных бактерий мы намеренно выбрали более узкий диапазон [1.39, 1.41] на основании имеющихся в литературе данных [53–56] (которые впоследствии были подтверждены результатами характеристики кокковых форм бактерий, полученными в данной работе). Ограничив таким образом показатель преломления, мы фактически зафиксировали данный параметр, чтобы избежать проблемы компенсации параметров, которая более подробно описана в [57] на примере тромбоцитов. Забегая вперед, стоит отметить, что ограничивая возможность получения дополнительной информации о показателе преломления из эксперимента, мы, тем не менее, значительно улучшаем точность определения других интересующих

нас характеристик клеток, особенно длины. Границы диапазона для угла ориентации β палочковидных бактерий были выбраны исходя из соображений об их гидродинамической ориентации в пуазейлевском потоке [46], полагая при этом, что большие значения угла ориентации для более вытянутых клеток физически маловероятны.

в. Решение обратной задачи светорассеяния

Решение обратной задачи светорассеяния осуществлялось методами глобальной оптимизации, основные идеи и подходы для которых были изначально описаны в [58] для характеристики сферических частиц, а затем развиты в работе [57] в общий метод решения обратной задачи светорассеяния для несферических частиц, описываемых несколькими параметрами. Согласно им, задача определения характеристик частиц по индикатрисам светорассеяния, измеренным на СПЦ, решается методом наименьших квадратов, т.е. сводится к минимизации взвешенной суммы квадратов отклонений (СКО) между теоретическим и экспериментальным сигналами. В частности характеристика бактерий сферической формы (одиночные кокки) осуществлялась с помощью алгоритма DiRect. Обратная задача светорассеяния для несферических форм бактерий, включая диплококки и палочковидные бактерии, решалась методом глобальной оптимизации с использованием предварительно насчитанных баз данных теоретических индикатрис.

Для анализа культур клеток, содержащих несколько форм частиц, в том числе для анализа шаровидных бактерий, представленных в форме одиночных сферических кокков и их димеров – диплококков, был предложен подход для идентификации клеток и частиц определенной формы по результатам решения обратной задачи светорассеяния с помощью различных оценок, отражающие степень согласия экспериментальных измерений с теоретическими расчетами, выполненными в рамках предполагаемой оптической модели (см. подразделы 3.2.3 и 3.2.4) При одновременном использовании двух и более оценок, включая погрешности определения параметров модели и различные критерии анализа регрессионных остатков, для более точного разделения частиц в пространстве параметров этих оценок на частицы, для которых реальная форма хорошо описывается предлагаемой моделью, и те, для описания морфологии которых она неприменима, предлагается использовать алгоритм EM-кластеризации (англ. expectation-maximization (EM) algorithm) [59].

В основе идеи EM-алгоритма лежит предположение, что в данном пространстве параметров исследуемое множество данных может быть смоделировано с помощью линейной комбинации многомерных нормальных распределений. Целью алгоритма является оценка параметров данных распределений и вероятности, с которой данное наблюдение принадлежит к тому или иному кластеру. Несмотря на предположение о нормальности измерений, которое не всегда выполняется, алгоритм обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами кластеризации, включая k-means, а именно линейное увеличение сложности при росте объема данных, устойчивость к шумам, возможность построения желаемого числа кластеров, и возможность эффективного разделения данных в случае перекрытия их распределений [60].

В данной работе использовалась программная реализация алгоритмов в виде пакетов 'mclust'[61] и 'emcluster'[62] в программной среде R.

4. Полученные результаты

В работе были разработаны алгоритмы характеристики простых форм шаровидных (кокки, диплококки) и палочковидных бактерий по индикатрисам светорассеяния, измеряемым на СПЦ, с использованием предварительно насчитанных баз данных теоретических индикатрис для несферических форм клеток (палочки, димеры шаров). Экспериментальная проверка работы алгоритмов проводилась на 4 штаммах шаровидных бактерий *Micrococcus spp.* и двух штаммах палочковидных бактерий *Bacillus subtilis* 1327 и *Ochrobactrum sp.* 1325 с одновременными измерениями на оптическом микроскопе. Было получено хорошее согласие между распределениями клеток по размерам (диаметр для шаровидных бактерий, диаметр и длина для палочковидных бактерий), построенными по результатам характеристики и по микроскопическим измерениям. Распределения по диаметру и показателю преломления шаровидных клеток в виде одиночных кокков

и в составе диплококков также продемонстрировали хорошее согласие, подтверждая надежность методов характеристики, используемых как для сферических, так и для несферических объектов. При этом медианная погрешность измерения морфологических характеристик клеток составила соответственно: 20 нм и 0.003 для размера и показателя преломления одиночных кокков; 55 нм и 0.008 для размера и показателя преломления диплококков; 400 и 40 нм для длины и диаметра палочковидных бактерий.

5. Иллюстрации, визуализация результатов

а. Моделирование светорассеяния парных и делящихся клеток палочковидных бактерий

Одним из возможных и наиболее вероятных отклонений для выбранной модели палочковидных бактерий может послужить наличие перетяжки у делящихся бактерий, которая образуется, как правило, посередине клетки перед ее делением на дочерние [63], а также присутствует у некоторых форм палочковидных бактерий, клетки которых представлены не одиночными палочками, а их парами (диплобациллы). Отделяя по светорассеянию клетки, которые находятся на стадии деления, от других клеток, или идентифицируя морфологию бактерий, принципиально представленную парами клеток, можно было бы получить дополнительную и весьма важную информацию об исследуемой популяции. Поэтому, для оценки влияния формирования перетяжек у бактерий на сигнал светорассеяния, а также для проверки возможности выявления делящихся клеток и диплобацилл по индикатрисам, мы сравнили индикатрисы пяти разных клеток с перетяжкой и без нее.

Типичный результат сравнения индикатрис делящейся/парной и неделящейся/одиночной клетки и соответствующие им модели приведены на Рис. 2. С одной стороны, различия между двумя рассчитанными индикатрисами составляют менее 10%, что при учете имеющегося экспериментального шума не дает нам возможности выявить наличие перетяжки у измеренной бактерии или идентифицировать отдельные виды диплобацилл. С другой стороны, из этого можно сделать вывод, что выбранная нами модель одинаково подходит для характеристики как делящихся (парных), так и не делящихся (одиночных) бактерий. Поэтому, в дальнейшем мы полагаем, что делящиеся и парные клетки характеризуются как одна неделящаяся или одиночная, но с удвоенным объемом.

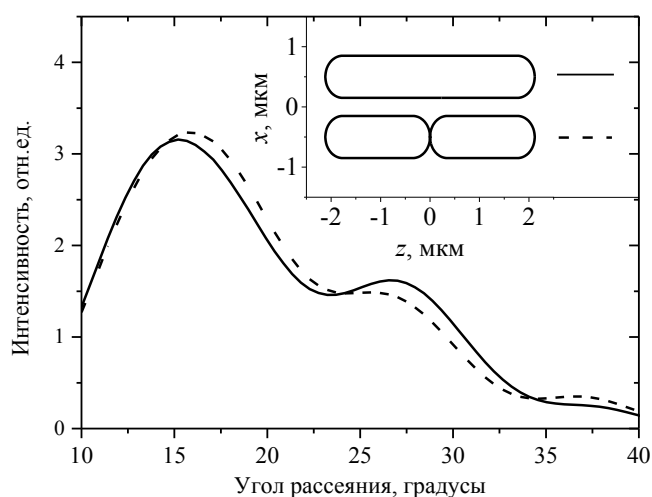


Рис. 2. Пример сравнения теоретических индикатрис палочковидных бактерий с перетяжкой и без нее для клетки с параметрами $l = 4$ мкм, $d = 0.7$ мкм, $n = 1.40$, $\beta = 10^\circ$.

б. Экспериментальная проверка методов

Культуры клеток бактерий

В работе использовались грамположительные сферические бактерии *Micrococcus spp.* (штаммы 386, 387, 389, 392) и грамотрицательные палочковидные бактерии, включая небольшие, не образующие спор бактерии *Ochrobactrum sp.* штамм 1326 и более крупные палочки вида *Bacillus subtilis* штамм

1327, из состава музея природных изолятов «Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»». Готовые для измерений на СПЦ суточные культуры штаммов микроорганизмов были любезно предоставлены Андреевой Ириной Сергеевной в виде суспензий, приготовленных с использованием стерильного 0.9% водного раствора хлорида натрия.

Измерения на сканирующем проточном цитометре

Измерения индикатрис светорассеяния одиночных частиц проводились на длине волны 405 нм. Рабочий угловой диапазон измерений был определен по анализу 2 мкм полистирольных микросфер в пределах от 8° до 60°.

Измерения на оптическом микроскопе

Микрофотографии клеток бактерий были получены на оптическом микроскопе Carl Zeiss Axio Imager.A1 с использованием иммерсионного объектива с увеличением $\times 100$ и числовой апертурой $NA = 1.3$. Полученные изображения были обработаны с помощью программного пакета MicrobeTracker [64], написанного в среде MATLAB и способного автоматически идентифицировать отдельные бактерии в поле зрения микроскопа и определять их границы и размеры с субпиксельной точностью.

Для обработки изображений клеток *Micrococcus spp.* использовался алгоритм обработки изображений клеток произвольной формы с набором параметров *alg1.set*. Микрофотографии клеток *Ochrobactrum sp.* 1326 и *Bacillus subtilis* 1327 были обработаны с использованием алгоритма с набором параметров *alg4ecoli.set*, оптимизированным для обработки изображений палочковидных бактерий.

На Рис. 3(a-d) приведены характерные обработанные микрофотографии кокообразных бактерий *Micrococcus spp.*, представленных преимущественно в форме отдельно лежащих кокков (микрококков) и парных кокков (диплококков). Результаты обработки микрофотографий палочкообразных бактерий *Ochrobactrum sp.* 1326 и *Bacillus subtilis* 1327 продемонстрированы на Рис. 3e и Рис. 3d, соответственно.

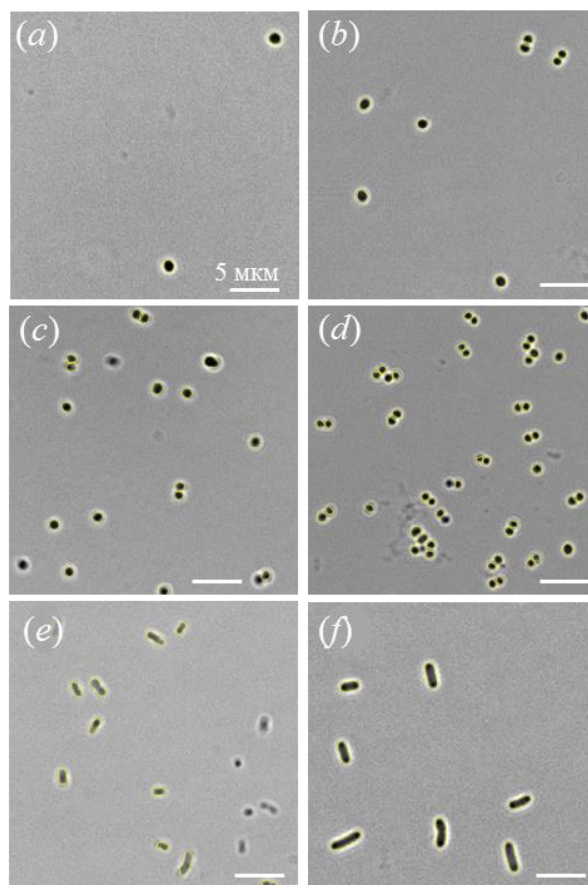


Рис. 3. Характерные микрофотографии шаровидных и палочковидных бактерий, обработанные с помощью MicrobeTracker: (a) *Micrococcus sp.* 386, (b) *Micrococcus sp.* 388, (c) *Micrococcus sp.* 389, (d) *Micrococcus sp.* 392, (e) *Ochrobactrum sp.* 1326, (f) *Bacillus subtilis* 1327.

Статическая характеристика шаровидных и палочковидных бактерий

Характеризация культур шаровидных бактерий *Micrococcus spp.*, клетки которых преимущественно представлены в виде двух форм, одиночных микрококков и диплококков, осуществлялась в несколько этапов. На первом этапе среди всех измеренных частиц на основании решения обратной задачи светорассеяния с использованием теории Ми идентифицировались одиночные частицы, форма которых действительно наилучшим образом описывалась моделью гомогенной сферы.

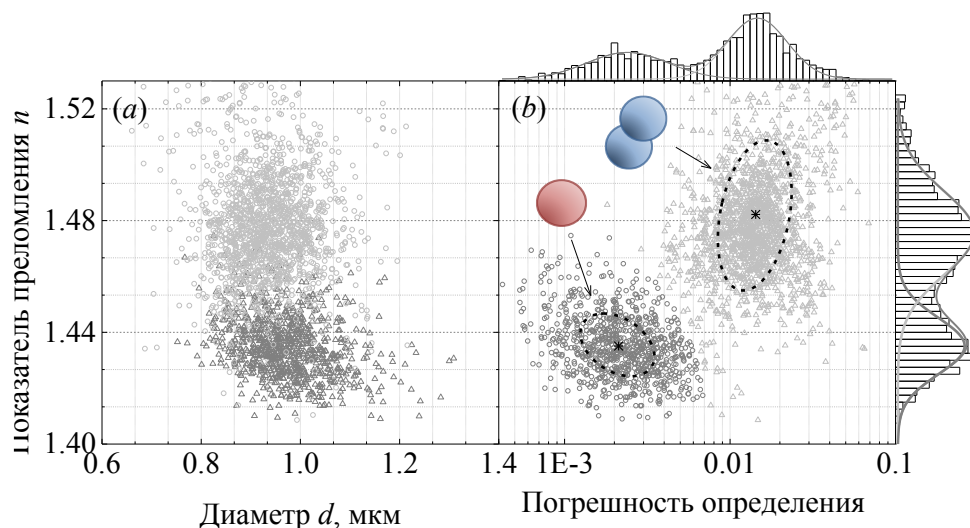


Рис. 4. Идентификация сферических (микрококки) и несферических (диплококки) форм бактерий по результатам решения обратной задачи светорассеяния с использованием теории Ми. В качестве примера приведены результаты характеризации *Micrococcus sp.* 392: (a) распределение частиц по размеру и показателю преломления, (b) распределение частиц по показателю преломления и погрешности его определения. Субпопуляции микрококков и диплококков разделялись в параметрах ($n \times \sigma_n$) с помощью EM-алгоритма кластеризации. Идентифицированные субпопуляции обозначены на соответствующих распределениях разными цветами.

Поскольку морфология парных кокков и других несферических форм бактерий не может быть описана сферической моделью, использование теории Ми для их характеризации при решении обратной задачи, во-первых, приводит к некорректной оценке характеристик частиц (в частности, к завышению показателя преломления, который компенсирует более высокий уровень интенсивности рассеяния агрегатами сферических частиц по сравнению с одиночными клетками a), во-вторых, отражается в высоких погрешностях определения параметров бактерий, таким образом косвенно свидетельствуя о несоответствии применяемой модели для описания их морфологии.

Используя смещение оценок характеризации и точность их определения в качестве критерия применимости сферической модели частицы для описания клеток бактерий, разделение *Micrococcus spp.* на микрококки и диплококки осуществлялось в параметрах показателя преломления и погрешности его определения с использованием теории Ми, в которых субпопуляции соответствующих частиц, как видно из Рис. 4b, хорошо описываются двумерными гауссовыми распределениями, что позволяет применить для их разделения алгоритм EM-кластеризации. При этом для каждой идентифицируемой частицы рассчитывается вероятность, с которой она может быть отнесена к тому или иному классу, поэтому ее можно рассматривать как некоторую оценку точности разделения бактерий на сферические и несферические частицы. Так, можно отметить, что для четырех штаммов измеренных шаровидных бактерий ее среднее значение составило 95.4%, а медиана 98.4%.

После идентификации (или подтверждения отсутствия) в популяции сферических клеток с помощью теории Ми, на втором этапе характеризации, клетки бактерий, идентифицированные как несферические частицы, описывались моделью димера и характеризовались диаметром и показателем преломления входящих в его состав мономеров.

Результаты характеризации популяций бактерий *Micrococcus spp.* (штаммы 386, 388, 389 и 392) приведены на Рис. 6 и Рис. 7 в виде распределений по размеру и показателю преломления, определенными для идентифицированных одиночных кокков и их димеров.

Следует отметить хорошее согласие результатов характеризации кокков в виде одиночных частиц и в составе диплококков, воспроизводящееся для трех измеренных штаммов. Результаты характеризации популяции бактерий *Micrococcus sp.* 386, представленные в виде распределений только для одиночных форм клеток (Рис. 6a и Рис. 7a), говорят о том, что алгоритму идентификации, применяемому для разделения сферических и несферических частиц, не удалось выявить наличие диплококков среди клеток бактерий этого штамма ввиду их полного отсутствия, либо их доля была

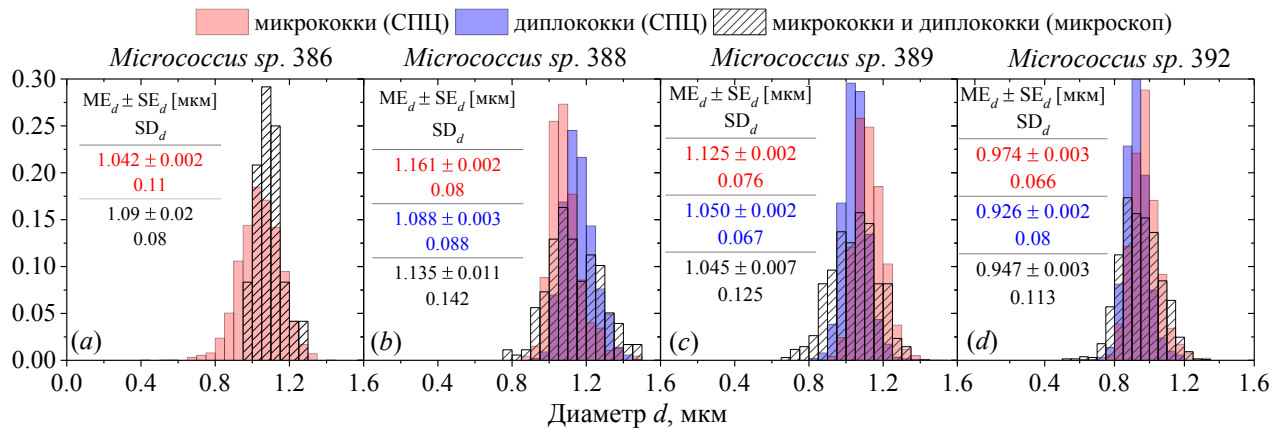


Рис. 6. Результаты характеристики популяций *Micrococcus* spp. (штаммы 386, 388, 389 и 392) по диаметру для одиночных кокков (красный) и кокков в составе диплококков (синий) в сравнении с микроскопическими измерениями (черный).

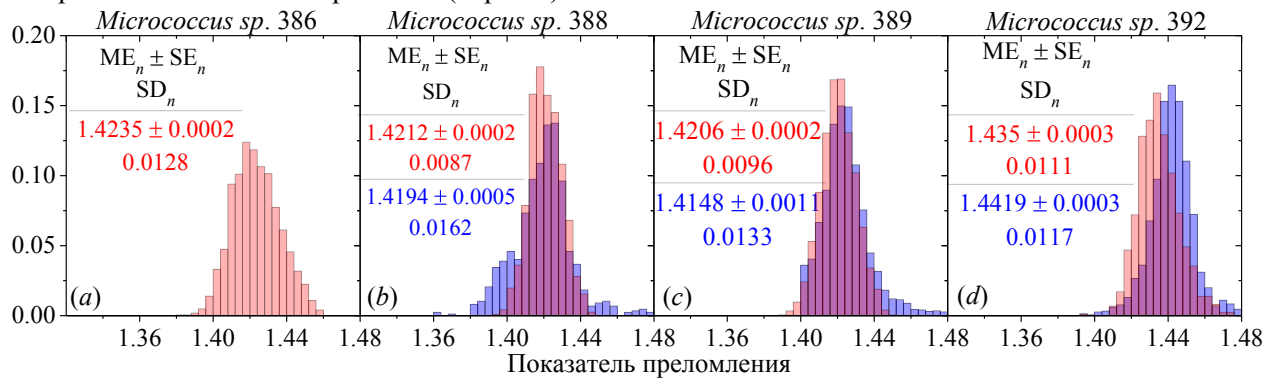


Рис. 7. Результаты характеристики популяций *Micrococcus* spp. (штаммы 386, 388, 389 и 392) по показателю преломления для одиночных кокков (красный) и кокков в составе диплококков (синий).

недостаточно велика для статистически достоверного разделения, что не противоречило микроскопическим наблюдениям (Рис. 3a).

Типичные результаты решения обратной задачи для одиночного микрококка и диплококка приведены на Рис. 5a и Рис. 5b вместе с оценками характеристик клеток. На Рис. 5b наглядно показано, как в данном конкретном случае несферическая модель более подходит для описания формы клетки по сравнению с теорией Ми, обеспечивая лучшее согласие с экспериментальными данными на всем диапазоне измеряемых углов.

Характеризация культур палочковидных бактерий осуществлялась в результате решения обратной задачи светорассеяния для каждой измеренной клетки с использованием базы данных, предварительно насчитанной для модели в виде цилиндра с полусферическими концами.



Рис. 5. Типичные экспериментальные и ближайшие теоретические индикатрисы для (a) микрококка (модель сферы) и (b) диплококка (модель димера) *Micrococcus* spp. 389. Для диплококка также приведена ближайшая теоретическая индикатриса по теории Ми. Также приведены характеристики клеток (ближайшие, математическое ожидание и стандартное отклонение).

Результаты характеристики палочковидных бактерий *Ochrobactrum sp.* 1326 и *Bacillus subtilis* 1327 представлены на Рис. 8 распределениями по длине и диаметру клеток. Для сравнения также приведены распределения, полученные в результате измерений на оптическом микроскопе, во время которых было измерено до 500 клеток бактерий каждого вида. Несовпадение распределения клеток бактерий *Ochrobactrum sp.* 1326 по длине с микроскопическими данными (Рис. 8a), несмотря на хорошее согласие результатов измерений диаметра, вероятнее всего вызвано очень небольшим размером данных клеток и их свободной ориентацией в поле зрения микроскопа, из-за которой вместо длины клетки оценивается ее проекция. Если предположить, что все наблюдаемые клетки ориентированы случайным образом, то данный эффект приводит к занижению оценки длины в среднем в $\pi/2$ раз. Введение этого коэффициента в виде поправки к оценке длины бактерий по микрофотографиям, компенсирует различия как в средних значениях, так и в распределениях клеток бактерий по длине.

В целом, полученное согласие как в распределениях, так и в средних значениях для обоих видов бактерий по длине и диаметру является убедительным доказательством адекватности применяемого метода.

Типичные результаты глобальной оптимизации для одиночных клеток каждого из видов продемонстрированы на Рис. 9a и Рис. 9b, соответственно. Для каждой клетки так же приведены

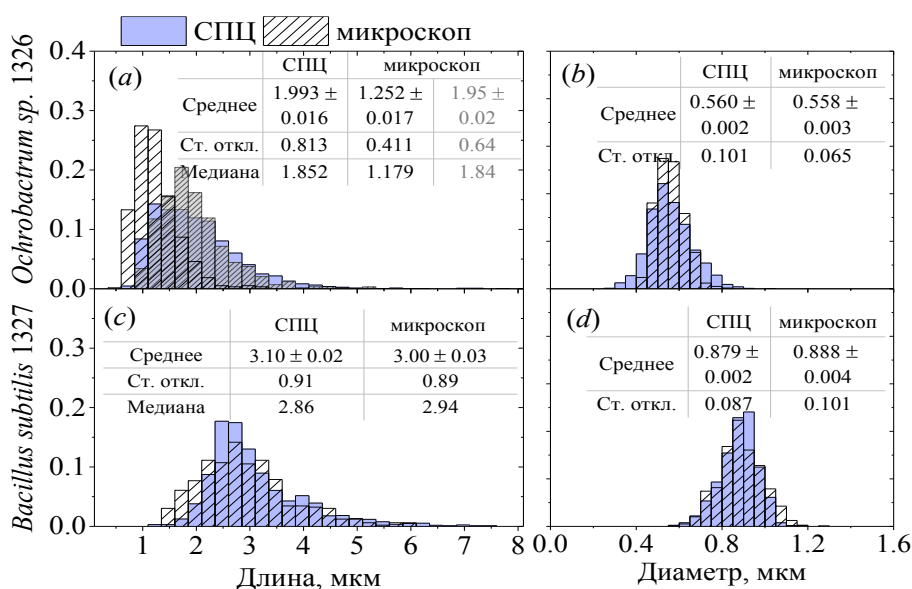


Рис. 8. Результаты характеристики популяций клеток *Ochrobactrum sp.* 1326 (сверху) и *Bacillus subtilis* 1327 (снизу) по длине и диаметру в сравнении с микроскопическими измерениями. Для характеристики популяции клеток *Ochrobactrum sp.* 1326 по длине на основании микроскопических наблюдений приведены как результаты прямых измерений (черный), так и результаты измерений, учитывающих свободную ориентацию клеток в поле зрения микроскопа (серый).

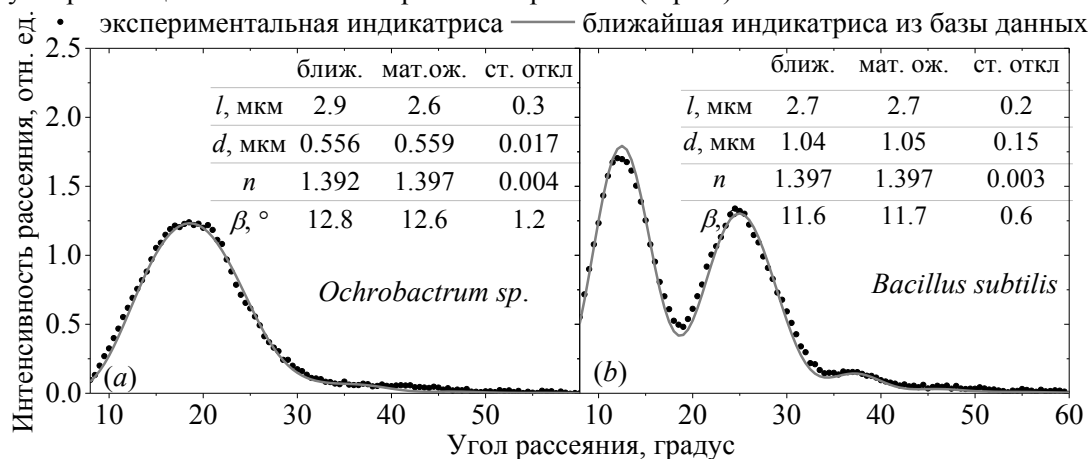


Рис. 9. Типичные экспериментальные и ближайшие теоретические индикатрисы палочковидных бактерий *Ochrobactrum sp.* 1326 (a) и *Bacillus subtilis* 1327 (b), полученные в результате глобальной оптимизации с использованием базы данных.

результаты характеристики, включая параметры ближайшей индикатрисы из базы данных, а также оценки математического ожидания и стандартного отклонения.

Точность определения морфологических характеристик (медиана распределения погрешности индивидуальных измерений) для сферических и несферических бактерий составили соответственно:

- 20 нм и 0.003 для размера и показателя преломления сферических клеток;
- 55 нм и 0.008 для размера и показателя преломления бактерий в виде димеров;
- 400 и 40 нм для длины и диаметра палочковидных клеток.

Список литературы

1. Nebe-von-Caron G. et al. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting // *J. Microbiol. Methods*. 2000. Vol. 42, № 1. P. 97–114.
2. Bridson E.Y., Gould G.W. Quantal microbiology // *Lett. Appl. Microbiol.* 2000. Vol. 30, № 2. P. 95–98.
3. Jordana-Lluch E. et al. Improving the Diagnosis of Bloodstream Infections: PCR Coupled with Mass Spectrometry // *BioMed Res. Int.* 2014. Vol. 2014.
4. Wiley: Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products, 3rd Edition - Richard K. Robinson [Electronic resource]. URL: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471385964.html> (accessed: 06.06.2016).
5. Nicolaou N., Xu Y., Goodacre R. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species // *J. Dairy Sci.* 2010. Vol. 93, № 12. P. 5651–5660.
6. Singhal N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis // *Front. Microbiol.* 2015. Vol. 6. P. 791.
7. Guo L. et al. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification // *J. Thorac. Dis.* 2014. Vol. 6, № 5. P. 534–538.
8. Prod'homme G. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets // *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48, № 4. P. 1481–1483.
9. Ferreira L. et al. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry // *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48, № 6. P. 2110–2115.
10. Mackay I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory // *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. Vol. 10, № 3. P. 190–212.
11. Bonne N. et al. Elimination of false-positive polymerase chain reaction results resulting from hole punch carryover contamination // *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.* 2008. Vol. 20, № 1. P. 60–63.
12. Rogers G.B. et al. The exclusion of dead bacterial cells is essential for accurate molecular analysis of clinical samples // *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. Vol. 16, № 11. P. 1656–1658.
13. Turner N. a. et al. Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents // *J. Appl. Microbiol.* 2000. Vol. 89, № 5. P. 751–759.
14. Suller M. t. e., Lloyd D. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry // *Cytometry*. 1999. Vol. 35, № 3. P. 235–241.
15. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review // *J. Pharm. Anal.* 2016. Vol. 6, № 2. P. 71–79.
16. Bunthof C.J., Abee T. Development of a Flow Cytometric Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. Vol. 68, № 6. P. 2934–2942.
17. Hewitt C.J., Nebe-Von-Caron G. The Application of Multi-Parameter Flow Cytometry to Monitor Individual Microbial Cell Physiological State // *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. Vol. 89. P. 197–223.
18. Katsuragi T., Tani Y. Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. Vol. 89, № 3. P. 217–222.
19. Stender H. et al. PNA for rapid microbiology // *J. Microbiol. Methods*. 2002. Vol. 48, № 1. P. 1–17.
20. Suchwalko A., Buzalewicz I., Podbielska H. Statistical identification of bacteria species // *Microb Pathog Strateg Combat Sci Technol Educ*. 2013. P. 711–721.

21. Robinson J.P. et al. Using Scattering to Identify Bacterial Pathogens // *Opt. Photonics News*. 2011. Vol. 22, № 10. P. 20–27.
22. Bayraktar B. et al. Feature extraction from light-scatter patterns of *Listeria* colonies for identification and classification // *J. Biomed. Opt.* 2006. Vol. 11, № 3. P. 34006.
23. Banada P.P. et al. Label-free detection of multiple bacterial pathogens using light-scattering sensor // *Biosens. Bioelectron.* 2009. Vol. 24, № 6. P. 1685–1692.
24. Suchwalko A. et al. Bacteria species identification by the statistical analysis of bacterial colonies Fresnel patterns // *Opt. Express*. 2013. Vol. 21, № 9. P. 11322–11337.
25. Wyatt P.J. Differential light scattering: a physical method for identifying living bacterial cells // *Appl. Opt.* 1968. Vol. 7, № 10. P. 1879–1896.
26. Wyatt P.J. Identification of Bacteria by Differential Light Scattering. 1969. P. 1257–1258.
27. Wyatt P.J., Phillips D.T. Structure of single bacteria from light scattering. 1972. P. 493–501.
28. Rajwa B. et al. Automated classification of bacterial particles in flow by multiangle scatter measurement and support vector machine classifier // *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 2008. Vol. 73, № 4. P. 369–379.
29. Venkatapathi M. et al. High speed classification of individual bacterial cells using a model-based light scatter system and multivariate statistics // *Appl. Opt.* 2008. Vol. 47, № 5. P. 678–686.
30. Pan Y.-L. et al. Measurement and autocorrelation analysis of two-dimensional light-scattering patterns from living cells for label-free classification // *Cytometry A*. 2011. Vol. 79A, № 4. P. 284–292.
31. Wilson B.K., Vigil G.D. Automated bacterial identification by angle resolved dark-field imaging // *Biomed. Opt. Express*. 2013. Vol. 4, № 9. P. 1692–1701.
32. Jo Y. et al. Label-free identification of individual bacteria using Fourier transform light scattering // *Opt. Express*. 2015. Vol. 23, № 12. P. 15792.
33. Barer M.R., Harwood C.R. *Bacterial Viability and Culturability* // *Advances in Microbial Physiology* / ed. Poole R.K. Academic Press, 1999. Vol. 41. P. 93–137.
34. Kell D.B. et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998. Vol. 73, № 2. P. 169–187.
35. Comas-Riu J., Rius N. Flow cytometry applications in the food industry // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 36, № 8. P. 999–1011.
36. Józwa W., Czaczyk K. Flow cytometric analysis of microbial contamination in food industry technological lines--initial study // *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2012. Vol. 11, № 2. P. 110–119.
37. Harding S.E. Applications of light scattering in microbiology. 1986. P. 489–509.
38. Fouchet P. et al. Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology // *Biol Cell*. 1993. Vol. 78, № 1–2. P. 95–109.
39. Diaspro A., Radicchi G., Nicolini C. Polarized light scattering: a biophysical method for studying bacterial cells // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1995. Vol. 42, № 10. P. 1038–1043.
40. Skarstad K., Steen H.B., Boye E. Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry. // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154, № 2. P. 656–662.
41. Steen H.B., Boye E. Bacterial growth studied by flow cytometry // *Cytometry*. 1980. Vol. 1, № 1. P. 32–36.
42. Steen H.B., Skarstad K., Boye E. Flow cytometry of bacteria: cell cycle kinetics and effects of antibiotics // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986. Vol. 468. P. 329–338.
43. Xu M., Katz A. Statistical interpretation of light anomalous diffraction by small particles and its applications in bio-agent detection and monitoring // *Light Scattering Reviews 3* / ed. Kokhanovsky A.A. Springer Berlin Heidelberg, 2008. P. 27–67.
44. Müller S., Nebe-von-Caron G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010.
45. Su X.-T. et al. 2D light scattering patterns of mitochondria in single cells // *Opt. Express*. 2007. Vol. 15, № 17. P. 10562–10575.
46. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis // *Rev. Sci. Instrum.* 2000. Vol. 71, № 1. P. 243–255.
47. Shvalov A.N. et al. Individual *Escherichia coli* cells studied from light scattering with the scanning flow cytometer // *Cytometry*. 2000. Vol. 41, № 1. P. 41–45.
48. Bronk B.V. et al. Measuring diameters of rod-shaped bacteria in vivo with polarized light scattering. // *Biophys. J.* 1995. Vol. 69, № 3. P. 1170–1177.
49. Bohren C.F., Huffman D.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. New York: Wiley, 1983. 544 p.

50. Yurkin M.A., Hoekstra A.G. The discrete-dipole-approximation code ADDA: Capabilities and known limitations // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 2011. Vol. 112, № 13. P. 2234–2247.
51. Supercomputing center of the Novosibirsk State University [Electronic resource]. URL: <http://nusc.nsu.ru/>.
52. Xu S., Liu J., Sun Z. Optical factors determined by the T-matrix method in turbidity measurement of absolute coagulation rate constants // *J. Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 304, № 1. P. 107–114.
53. Bateman J.B., Wagman J., Carstensen E.L. Refraction and absorption of light in bacterial suspensions // *Kolloid-Z. Z. Für Polym.* 1966. Vol. 208, № 1. P. 44–58.
54. Bryant F.D., Seiber B.A., Latimer P. Absolute optical cross sections of cells and chloroplasts // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. Vol. 135. P. 97–108.
55. Waltham C. et al. Light scattering and absorption caused by bacterial activity in water // *Appl. Opt.* 1994. Vol. 33, № 31. P. 7536–7540.
56. Balaev A.E., Dvoretzki K.N., Doubrovski V.A. Refractive index of escherichia coli cells // *SPIE Proc.* 2002. Vol. 4707. P. 253–260.
57. Moskalensky A.E. et al. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 1. P. 17001.
58. Strokotov D.I. et al. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 6. P. 064036.
59. Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm // *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 1977. Vol. 39, № 1. P. 1–38.
60. Королёв В.Ю. EM-алгоритм, его модификации и их применение к задаче разделения смесей вероятностных распределений. Теоретический обзор. М.: ИПИРАН, 2007.
61. Fraley C. et al. mclust: Gaussian Mixture Modelling for Model-Based Clustering, Classification, and Density Estimation. 2017.
62. Chen W.-C., Maitra R., Melnykov V. EMCluster: EM Algorithm for Model-Based Clustering of Finite Mixture Gaussian Distribution. 2016.
63. Begg K.J., Donachie W.D. Cell shape and division in Escherichia coli: experiments with shape and division mutants. // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 163, № 2. P. 615–622.
64. Sliusarenko O. et al. High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics // *Mol. Microbiol.* 2011. Vol. 80, № 3. P. 612–627.

Эффект от использования кластера в достижении целей работы.

Для расчетов одновременно использовались до 16 узлов. Таким образом, одновременно было задействовано до 128 процессоров, что позволило рассчитывать до 100000 индикатрис за сутки. При расчетах на настольном компьютере это заняло бы порядка месяца. Выходные файлы архивировались в один архив, который скачивался посредством сети интернет.

Перечень публикаций, содержащих результаты работы (если есть).

A.I. Konokhova, A.A. Gelash, M.A. Yurkin, A.V. Chernyshev, and V.P. Maltsev. High-precision characterization of individual *E. coli* cell morphology by scanning flow cytometry // *Cytometry Part A*. 2013. Vol. 83A, № 6. P. 568–575.

Результаты работы были так же опубликованы в 3 тезисах 3 международных конференций *Electromagnetic and Light Scattering (ELS) XIV* (17–21 June 2013, Lille, France), *27 and 28 th Congress of ISAC (CYTO)* (23–27 June 2012, Leipzig, Germany; 19–22 May 2013, San Diego, USA).

Ваши впечатления от работы вычислительной системы и деятельности ИВЦ НГУ, а также Ваши предложения по их совершенствованию.

За все время расчетов не было ни одного сбоя, система работала надежно. Особенно порадовала быстрая связь с интернетом (так как данные расчетов в виде архивов размером около 2 ГБ скачивались на удаленный компьютер).