

УДК 544.165, 504, 577

НОВЫЙ МЕТОД БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ИМПЕДАНСНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

В.С. Сибирцев^{a,b}, Л.В. Красникова^a, А.Г. Шлейкин^a, С.А. Строев^c, И.А. Наумов^b,
Р.О. Олехнович^a, В.Ф. Терещенко^d, Э.М. Шабанова^d, М. Аль-Хатиб^{a,e}

^a Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация

^b Научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации флота (Гипрорыб-флот), Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

^c Университет Тампере, Тампере, 33014, Финляндия

^d Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия (СПХФА), Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация

^e Университет Алмутанна, 66001, Алмутанна, Республика Ирак, muosa_m_85@yahoo.com

Адрес для переписки: vs1969r@mail.ru

Информация о статье

Поступила в редакцию 23.10.14, принята к печати 17.02.15

doi:10.17586/2226-1494-2015-15-2-275-284

Язык статьи – русский

Ссылка для цитирования: Сибирцев В.С., Красникова Л.В., Шлейкин А.Г., Строев С.А., Наумов И.А., Олехнович Р.О., Терещенко В.Ф., Шабанова Э.М., Мусса Аль-Хатиб. Новый метод биотестирования с применением современных импедансных технологий // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2015. Том 15. № 2. С. 275–284.

Аннотация. Представлены новые схемы модификации метода биотестирования. Схемы используют современные кондуктометрические технологии и основаны на анализе микробных «кривых роста». Регистрация происходит в режиме реального времени для множества параллельных образцов. Показаны результаты сопоставления предлагаемой методики импедансного биотестирования со стандартным культуральным методом определения общего количества микроорганизмов в тестируемых образцах. Представлены результаты применения методики импедансного биотестирования в исследовании угнетающего действия дезинфектанта хлоргексидина на жизнедеятельность *Escherichia coli*, процесса сквашивания молока различными видами микроорганизмов, а также влияния ферментного препарата транsgлутаминазы на микрофлору закваски.

Предлагаемый в настоящей работе метод импедансного биотестирования обеспечивает достаточно высокий уровень сходимости своих данных с данными, получаемыми в результате применения стандартных культуральных методик биотестирования. Метод имеет следующие преимущества: возможность получения подробной информации о динамике изменения численности популяции и интенсивности метаболизма тестовых микроорганизмов; значительное уменьшение расхода питательных сред, а также временных и трудовых затрат исследователя при проведении анализов; повышение объективности анализа.

Ключевые слова: биотестирование, кондуктометрия, антисептическая активность, импедансный анализ микроорганизмов, микробиологические кривые роста, транsgлутаминаза, сквашивание.

NEW BIOTESTING METHOD WITH THE APPLICATION OF MODERN IMPEDANCE TECHNOLOGIES

V.S. Sibirtsev^{a,b}, L.V. Krasnikova^a, A.G. Schleikin^a, S.A. Stroeve^c, I.A. Naumov^b, R.O. Olekhovich^a,
V.F. Tereschenko^d, E.M. Shabanova^d, M. Al-Khatib^{a,e}

^a ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation

^b Research and Design Institute on Development and Exploitation of Fish Fleet, JSC, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

^c University of Tampere, Tampere, 33014, Finland

^d Saint Petersburg State Chemical - Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg, 197376, Russian Federation

^e University of Almutahanna, Almutahanna, 66001, Republic of Iraq

Corresponding author: vs1969r@mail.ru

Article info

Received 23.10.14, accepted 17.02.15

doi:10.17586/2226-1494-2015-15-2-275-284

Article in Russian

For citation: Sibirtsev V.S., Krasnikova L.V., Schleikin A.G., Stroeve S.A., Naumov I.A., Olekhovich R.O., Tereschenko V.F., Shabanova E.M., Mussa Al-Khatib. New biotesting method with the application of modern impedance technologies. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2015, vol.15, no. 2, pp. 275–284. (in Russian)

Abstract. The paper deals with new concepts of biotesting method updating. Modern conductometric technologies and the analysis of microbial «growth curves» are used. The registration occurs in a real time mode for the set of parallel samples. Results are shown for comparison of the proposed impedance biotesting technique with standard cultural determination method for total amount of microorganisms in the tested samples. Results are presented for practical application of the proposed impedance biotesting technique to the analysis as inhibitory action of chlorhexidine disinfectant on the vital activity of *Escherichia coli*, as milk ripening process at the presence of various microorganisms species and protein preparations. The impedance biotesting method, proposed in the present work, provides high level of its own data convergence with the data, being received as a result of application of standard cultural biotesting techniques. Thus, the proposed method has such advantages, as: an opportunity of the detailed information reception about dynamics change of magnitude of population and intensity of test microorganisms metabolism, significant reduction of the culture media amount used, as well as researcher's temporary and labor efforts while the analyses realization, and the growth of analysis objectivity.

Keywords: biotesting, conductivity measurement, decontaminate activity, impedance analysis of microorganisms, microbiological growth curves, transglutaminaza, milk ripening.

Введение

В последнее время все более актуальными становятся проблемы разработки как можно более быстрых, объективных и доступных для массового применения методов:

- выявления всех возможных позитивных и негативных свойств новых либо модифицированных продуктов и препаратов;
- определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, инфицировавших конкретного больного в каждом конкретном случае;
- оценки степени эндогенной и экзогенной интоксикации каждого конкретного больного;
- прогнозирования индивидуальной чувствительности больных к различным видам и дозам химио-, радиационной и иной терапии;
- оценки санитарно-гигиенического состояния и степени экологического неблагополучия различных помещения, территорий, водоемов и т.п.;
- оценки степени токсичности промышленных и бытовых выбросов и стоков и т.д.

Решение вышеупомянутых проблем может быть осуществлено разными способами. Однако наиболее приемлемым и адекватным в настоящее время признано использование для этих целей тестовых биосистем. При этом в качестве последних могут быть применены как одноклеточные [1–8], так и более высокоорганизованные организмы (такие, например, как планктон, растения, рыбы, крысы и т.п.) [6–14], а также культуры клеток их тканей, крови и т.д.

Использование для целей биотестирования многоклеточных организмов позволяет более адекватно моделировать с их помощью человеческий организм. Но это же делает проведение таких анализов значительно более сложным, дорогим, длительным и субъективным в оценке результатов. Применение же в качестве тест-систем микроорганизмов, если не снимает совсем, то, по крайней мере, значительно уменьшает многие из вышеперечисленных недостатков. Кроме того, многие из тестируемых препаратов в качестве целевого воздействия должны угнетать или активировать жизнедеятельность тех или иных видов именно микроорганизмов, как можно меньше влияя на функционирование более высокоорганизованных организмов. И в этом случае нужно проводить отдельные исследования действия таких препаратов на одноклеточные и многоклеточные организмы.

Однако принятые в настоящее время в качестве стандартных при биотестировании процедуры оценки общей выживаемости микроорганизмов (заключающиеся, в большинстве случаев, в оценке того, насколько ингибируется – или активируется, по сравнению с контрольной группой – рост колоний тестовых микроорганизмов на агаризованной питательной среде после инкубации их в течение одних или нескольких суток в стерильных условиях при заданной температуре в присутствии истинного или коллоидного раствора с определенной концентрацией исследуемого вещества либо после воздействия иных факторов) дают лишь достаточно неполную «статичную» информацию о летальных нарушениях в жизнедеятельности тестовых организмов.

Вследствие этого ранее нами было предложено, в частности, оценивать при подобном биотестировании также нелетальные изменения структуры генома тестовых организмов (в том числе пространственной – значимо меняющейся даже в зависимости от характера жизнедеятельности одного и того же организма) с помощью специально разработанной системы специфических флуорофоров с согласованными спектральными и комплексообразующими с ДНК свойствами [15–18]. А в последнее время при осуществлении исследований по биотестированию с помощью одноклеточных микроорганизмов мы стали также проводить анализ их «кривых роста» с применением импедансных технологий, достаточно точно, надежно и удобно реализуемых для подобных целей в настоящее время, в частности, в таких микробиологических кондуктометрических анализаторах, как «ВасТрас» или «Rabit», выпускаемых компаниями «SY-LAB GmbH» (Австрия) и «Don Whitley Scientific Limited» (Великобритания) соответственно, зарегистри-

стрированных в Госреестре средств измерений Российской Федерации и эксплуатируемых в соответствии с ГОСТ 22171-90¹.

Описание приборной части предлагаемого метода импедансного биотестирования

Вышеуказанные приборы позволяют измерять электрический импеданс (величина, обратная проводимости средой переменного электрического тока [19]), изменяющийся вследствие преобразования тестовыми микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности одних химических веществ в другие, в автоматическом режиме, через каждые 6 мин, параллельно для множества (до нескольких сотен) независимых жидких образцов.

При этом каждый из таких образцов заливается сначала в количестве от 2 до 10 мл в отдельную многоразовую измерительную ячейку (выполненную из стекла или термопластика, выдерживающих автоклавирование водяным паром, находящимся под давлением при температуре до 121°C включительно, и имеющую у анализатора «Rabit», к примеру, диаметр 15 мм, высоту 100 мм и два электрода из нержавеющей стали длиной 15 мм, расположенных в нижней части ячейки, как показано на рис. 1). После этого образец может инкубироваться непосредственно в одном из измерительных модулей анализатора в течение заданного времени (от нескольких часов до нескольких суток) и при заданной температуре (в диапазоне от +3 до +50 °C).

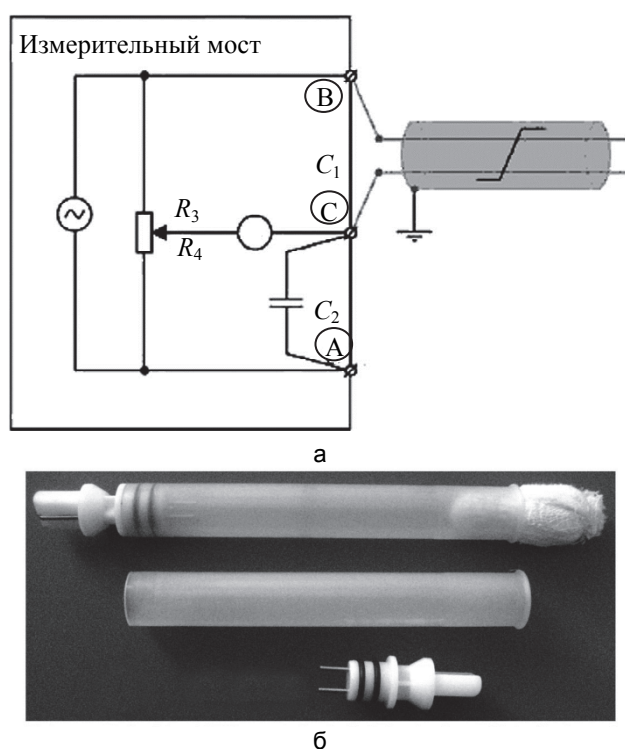


Рис. 1. Схема измерения импеданса (а) и устройство измерительной ячейки биоанализатора «Rabit» (со стерильно-марлевой пробкой и в разобранном виде) (б)

Измерение импеданса в каждой из ячеек анализатора осуществляется контактным методом с использованием мостовой схемы, подобной показанной на рис. 1, на вход которой подается переменный низкочастотный ток, а балансировка моста до достижения на детекторе нулевого сигнала осуществляется как по амплитуде, так и по фазе этого сигнала. При этом точность фиксации изменения количества микроорганизмов в каждом образце составляет около 10 КОЕ/мл (КОЕ – колониеобразующая единица, в соответствии с терминологией, принятой для стандартных культуральных методов определения в образцах количества жизнеспособных микроорганизмов).

Кроме того, есть возможность регистрировать изменения интенсивности метаболизма тестовых микроорганизмов при постоянном их количестве (что тоже приводит к изменению угла наклона фиксируемой анализатором зависимости импедансной электропроводности среды χ от времени τ).

Внешний вид биоанализатора «Rabit» показан на рис. 2.

¹ ГОСТ 22171-90. Анализаторы жидкости кондуктометрические лабораторные

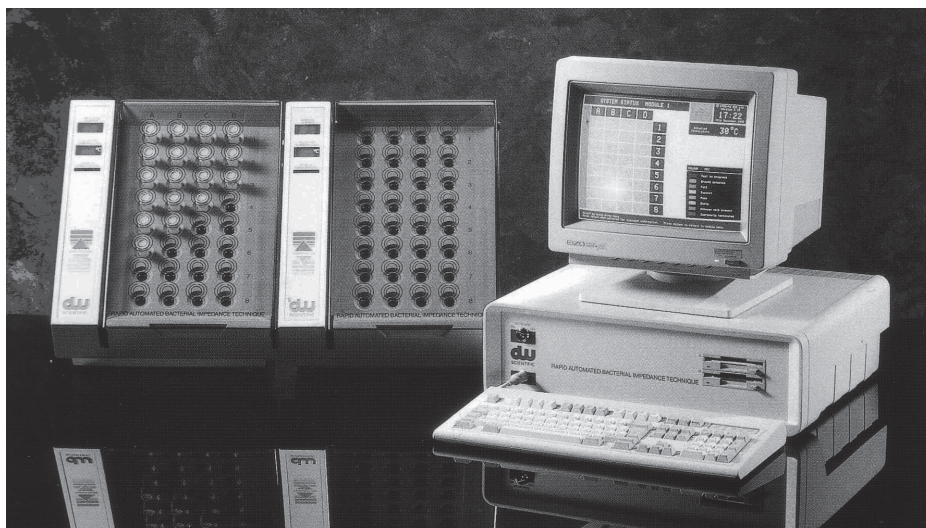


Рис. 2. Внешний вид микробиологического кондуктометрического импедансного анализатора «Rabit». Слева – два измерительно-инкубационных блока (каждый из которых может инкубироваться при отдельно задаваемой температуре, включает 32 независимо друг от друга заполняемых образцами и измеряемых ячейки, имеет габариты 400×600×400 мм и весит 35 кг). Справа – управляющий процессорный блок, к которому может быть подсоединено до 16 измерительно-инкубационных блоков

Описание методики и результатов сопоставления предлагаемого способа импедансного биотестирования со стандартным культуральным методом

На рис. 3–5 показаны результаты сопоставления предлагаемой методики импедансного анализа микроорганизмов со стандартным культуральным методом определения в образцах общего количества клеток *E. coli* (как наиболее широко используемого на сегодняшний день санитарно-показательного и тестового микроорганизма), реализуемого в соответствии с ГОСТ 18963-73¹, ГОСТ 26670-91² и ГОСТ 10444.15-94³.

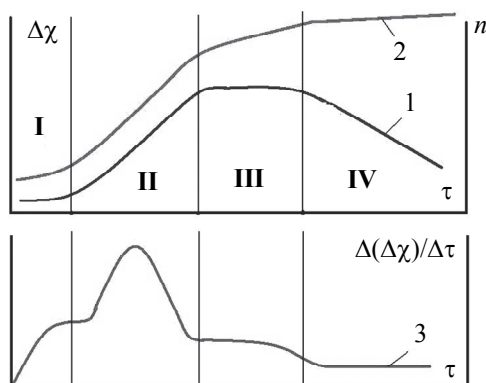


Рис. 3. Сопоставление типичных «кривых роста», регистрируемых для чистой культуры микроорганизмов в замкнутой системе (без добавления питательных веществ и отвода метаболитов после начала измерений): непосредственно по изменению концентрации микробных тел (n , КОЕ/мл) (1); косвенно, по изменению удельной импедансной электропроводности среды ($\Delta\chi$, мкСм/мл) (2), по оси абсцисс – время от начала измерений (τ , ч); (3) – изменение со временем величины $\Delta(\Delta\chi)/\Delta\tau$, мкСм/(мл·мин) (первая производная по кривой 2). Цифрами на рисунке обозначены области фаз роста: I – начальной (лаг-), II – экспоненциальной (лог-), III – стационарной и IV – отмирания

Общенакопительная питательная среда для микроорганизмов с pH $7,2 \pm 0,2$ приготавливалась путем растворения в 100 мл дистиллированной воды 0,5 г сухой х.ч. глюкозы и 2 г сухой основы питательного ГРМ-бульона (изготовленной по ТУ 10-02-02-789-176-94⁴ и содержащей соответственно на 1,8 г панкреа-

¹ ГОСТ 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа.

² ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.

³ ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

⁴ ТУ 10-02-02-789-176-94. Среда питательная сухие для определения *Staphylococcus aureus*. Технические условия.

тического гидролизата рыбной муки 0,2 г NaCl). После этого по 1,6 мл полученного бульона разливалось в каждую из 30 измерительных ячеек биоанализатора «Rabit», используемых в описываемом опыте. Затем все ячейки стерилизовались автоклавированием в течение 20 мин при температуре 121°C и остужались до комнатной температуры.

Далее по 5 ячеек в параллель засеивались каждая 0,4 мл суспензии *E. coli* с общей обсемененностью 0 («фоновый контроль»), 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 и 10^5 КОЕ/мл соответственно. При этом вышеуказанные суспензии *E. coli* K 12 в такой же питательной среде, как описано выше, приготавливались методом последовательных разведений из исходной суспензии данного штамма кишечной палочки (концентрация КОЕ в которой определялась стандартным культуральным методом).

Затем все ячейки помещались в измерительный модуль анализатора «Rabit» и инкубировались там при 37 °C в течение трех суток – с автоматической регистрацией через каждые 6 мин в каждой из ячеек величины полной проводимости средой гармонически переменного электрического тока. Если же в качестве тестовых требуется использовать иные, нежели *E. coli* K 12, виды и штаммы микроорганизмов, то состав питательных сред для их анализ, а также время и температура инкубации могут быть выбраны другими (в соответствии с особенностями метаболизма и морфологии этих микроорганизмов).

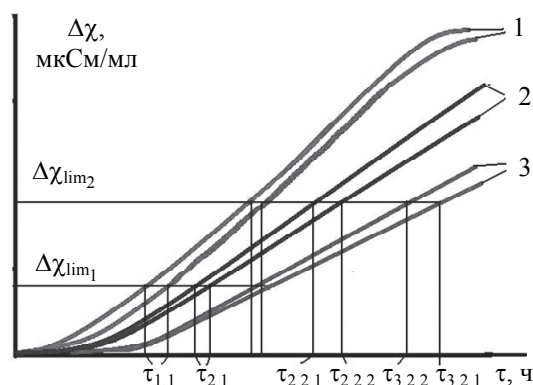


Рис. 4. Графический способ определения τ_S – времени от начала измерений, за которое удельная импедансная электропроводность тестируемых образцов (1)–(3) (с уменьшающейся в данном ряду исходной микробной обсемененностью) увеличивается на величину $\Delta\chi_{lim}$. Одинаковыми цифрами обозначены кривые, соответствующие наибольшему и наименьшему значениям, полученным для одной серии образцов. $\tau_{3,2,1}$ и $\tau_{3,2,2}$ – верхняя и нижняя границы «доверительного интервала» для $\tau_{3,2}$ (под которым подразумевается среднее время, за которое серия образцов с наименьшей исходной микробной обсемененностью увеличит свою удельную импедансную электропроводность на величину $\Delta\chi_{lim2}$) и т.д.

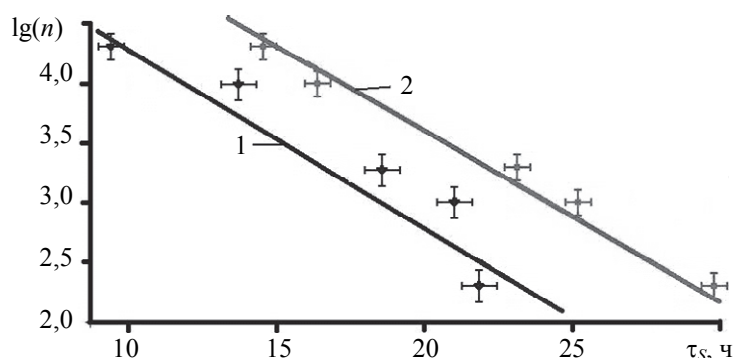


Рис. 5. Результаты сопоставления предлагаемой методики импедансного биотестирования (τ_S в которой определяется, как показано на рис. 4) со стандартным культуральным методом определения общего количества клеток *E. coli* в образцах (n , КОЕ/мл). Точками обозначены экспериментальные данные, полученные для $\Delta\chi_{lim} = 100$ мкСм/мл (1) и $\Delta\chi_{lim} = 200$ мкСм/мл (2), а прямыми – соответствующие им регрессионные зависимости: $\lg(n) = 5,8 - 0,14 \cdot \tau_S$ (1) и $\lg(n) = 6,6 - 0,14 \cdot \tau_S$ (2)

Из результатов проведенного анализа видно, что экспериментальные импедансные «кривые роста» (определяемые по изменению тестовыми микроорганизмами удельной импедансной электропроводности среды), совпадая с теоретической «кривой роста» (непосредственно характеризующей количество микробных тел в образце) во время лаг-фазы (когда идет адаптация микроорганизмов к новым для них условиям существования) и лог-фазы (когда идет активное «экспоненциальное» размножение микроорганизмов в анализируемом образце), отличаются от последней на стационарной стадии (когда количество мик-

роорганизмов в образце остается постоянным) и стадии отмирания (когда количество микроорганизмов в образце уменьшается – в частности, из-за истощения питательной среды – но процессы клеточного метаболизма при этом не идут в обратном направлении) (рис. 3).

Определение конкретного количества микроорганизмов в образце (n , КОЕ/мл) с применением импедансных технологий может быть осуществлено по калибровочному графику, который желательно строить для каждого конкретного вида и штамма тестовых микроорганизмов так, как показано на рис. 4, 5, в виде $\lg(n) = a \cdot \tau_s + b$, где a и b – эмпирические коэффициенты (зависящие от вида и штамма тестовых микроорганизмов, температуры инкубации, характеристик питательной среды и прибора, применяемых при анализе), а τ_s – время от начала измерений, за которое тестовые микроорганизмы в ходе анализа изменяют удельную импедансную электропроводность тестируемого образца на величину $\Delta\chi_{\text{lim}}$ (мкСм/мл).

При этом в качестве $\Delta\chi_{\text{lim}}$ надежнее всего было бы, конечно, выбрать $\Delta\chi$, при котором в образце происходит переход тестовых микроорганизмов из экспоненциальной фазы роста в стационарную. Но так как это значительно увеличит время анализа (если не использовать специально обедненные питательными веществами среды), то в качестве $\Delta\chi_{\text{lim}}$ при построении калибровки обычно принимают какое-либо пороговое значение $\Delta\chi$ в начале экспоненциальной фазы роста образца с наибольшей исходной концентрацией тестовых микроорганизмов. При этом, как видно из рис. 4, 5, чем меньше принятое пороговое значение $\Delta\chi_{\text{lim}}$, тем меньше время затрачивается на импедансный анализ, но больше ошибка определения τ_s каждого из образцов (и их микробной обсемененности n соответственно). Таким образом, малые значения $\Delta\chi_{\text{lim}}$ лучше применять при анализе образцов с высокой ожидаемой микробной контаминацией. А большие значения $\Delta\chi_{\text{lim}}$, наоборот, лучше применять при анализе образцов с малой ожидаемой микробной контаминацией.

Описание методики и результатов импедансного биотестирования антибактериальных свойств исследуемых препаратов

На рис. 6 показаны результаты практического применения предлагаемой методики регистрации микробиологических кривых роста к анализу угнетающего действия на *E. coli* (при необходимости осуществления анализа спектра действия тестируемого препарата вместо *E. coli* образцы могут засеваться также другими различными видами тестовых микроорганизмов) антисептика хлоргексидина биглюконата (ХГ), способного оказывать как бактериостатическое, так и бактерицидное действие в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий.

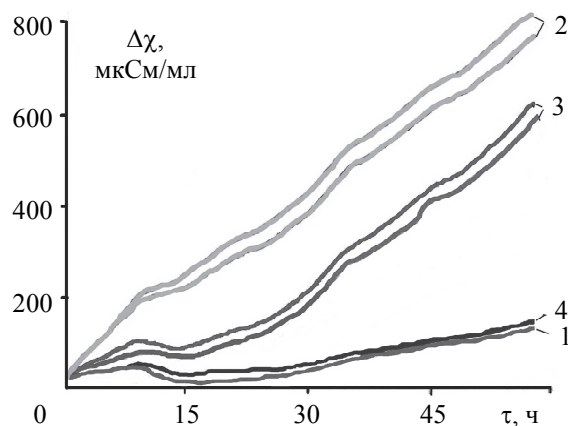


Рис. 6. Результаты исследования антисептической активности ХГ с помощью микробиологического кондуктометрического анализатора «Rabit»: «стерильный» ГРМ-бульон («фоновый контроль») (1); *E. coli* (с уровнем начальной обсемененности 10^5 КОЕ/мл) в ГРМ-бульоне без ХГ (2); *E. coli* в ГРМ-бульоне с ХГ в концентрации $10^{-4}\%$ (по объему) (3); *E. coli* в ГРМ-бульоне с ХГ в концентрации $10^{-3}\%$ (по объему) (4). Одной цифрой обозначены кривые, соответствующие наибольшему и наименьшему значениям, полученным для указанного варианта, включающего 16 параллельных образцов (в случае вариантов 1 и 4 эти кривые совпадают)

При этом измерительные ячейки с питательной средой для тестовых микроорганизмов готовились к анализу так же, как и в предыдущем случае. Затем в каждую из этих ячеек (кроме используемых для «фоновых контролей») засевалось по 0,2 мл суспензии с 10^5 КОЕ/мл *E. coli*. После этого все ячейки инкубировались при 37°C в течение 12 ч (чтобы начать анализ уже на стадии экспоненциального роста тестовых микроорганизмов, когда они наиболее чувствительны к внешним воздействиям).

Далее в каждую из ячеек добавлялось по 0,2 мл стерильного водного раствора с разными концентрациями ХГ. После этого все ячейки помещались в измерительный модуль анализатора «Rabit» и инкубировались там при 37 °С в течение 2,5 сут с автоматической регистрацией через каждые 6 мин величины импедансной электропроводности среды отдельно в каждой из ячеек.

Всего было проведено три последовательные серии таких измерений, в каждой из которых анализировалось по 16 образцов (4 варианта по 4 параллельных образца в каждом). Результаты этого приведены на рис. 6. Кривыми одного цвета здесь показаны наибольший и наименьший результаты измерения анализатором «Rabit» каждого из тестируемых вариантов (где разброс значений определялся в целом по 12 образцам). Для большей наглядности выбран такой режим построения графиков, при котором из значений импедансной электропроводности, регистрируемых для каждой ячейки, вычиталась величина χ_0 , регистрировавшаяся для каждого из образцов в момент начала измерений (и составлявшая в данном случае $\chi_0 = (8,7-9,3) \cdot 10^{-3}$ См/мл для «стерильного» ГРМ-бульона и $\chi_0 = (1,08-1,11) \cdot 10^{-2}$ См/мл для остальных образцов).

Из представленного видно, что ХГ в концентрации 10^{-3} об.% оказывал бактерицидное, а в концентрации 10^{-4} об.% – бактериостатическое действие на обрабатываемые им образцы, содержащие жидкую питательную среду, обсемененную *E. coli*.

Чтобы получить более строгие количественные характеристики бактериостатического действия ХГ на *E. coli* при наличии положительного (*E. coli* в ГРМ-бульоне без ХГ) и отрицательного («стерильный» ГРМ-бульон) контролей с заранее известными в них концентрациями микроорганизмов (10^5 и 10^0 КОЕ/мл соответственно), можно обойтись даже без калибровки (которую в противном случае пришлось бы предварительно строить, как описано в предыдущем разделе, для каждого отдельного вида или штамма микроорганизмов, используемых в качестве тестовых).

Решая систему из двух уравнений

$$\lg(n_1) = a \cdot \tau_1 + b, \lg(n_2) = a \cdot \tau_2 + b,$$

получаем:

$$a = [\lg(n_2) - \lg(n_1)] / [\tau_2 - (1 - \tau_1/\tau_2)], \quad b = \lg(n_1) - a \cdot \tau_1.$$

В нашем случае $\lg(n_1) = 5$ и $\lg(n_2) = 0$. Для порогового значения $\Delta\chi_{\text{lim}} = 100$ мкСм/мл – $\tau_1 = 6$ ч, $\tau_2 = 50$ ч, $\tau_{\text{ХГ}} = 22 \pm 1$ ч (для образцов с *E. coli* в ГРМ-бульоне с ХГ в концентрации 10^{-4} об.%).

Отсюда получаем уравнение

$$\lg(n_{\text{ХГ}}) = 5,86 - 0,15 \tau_{\text{ХГ}},$$

откуда $n_{\text{ХГ}} = 7 \pm 3 \times 10^2$ КОЕ/мл.

Подтверждают приведенные выше расчеты и данные, полученные стандартным культуральным методом, реализуемым в соответствии с ГОСТ 18963-73, ГОСТ 26670-91 и ГОСТ 10444.15-94. В этом случае из исходной суспензии, содержащей ГРМ-бульон, обсемененный *E. coli*, делали несколько последовательных разведений. Затем в каждое разведение добавляли стерильный водный раствор с требуемой концентрацией ХГ. Перемешивали. И далее анализировали, как описано выше. В результате была получена концентрация *E. coli* в исходной суспензии:

- без ХГ – $(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$ КОЕ/мл;
- с ХГ в концентрации 10^{-4} об.% – $(8,0 \pm 2,5) \cdot 10^2$ КОЕ/мл;
- в то же время с ХГ в концентрации 10^{-3} об.% ни одной четко различимой колонии *E. coli* на чашках за время анализа не выросло.

Описание методики и результатов импедансного биотестирования других свойств исследуемых препаратов

На рис. 7 показаны результаты практического применения предлагаемой методики импедансного биотестирования к анализу процессов сквашивания молока в присутствии *Streptococcus thermophilus* (*St*) и *Lactobacillus helveticus* (*Lh*), а также ферментного препарата трансклутаминазы (ТГ). ТГ применяется здесь с целью модификации структуры кисломолочного продукта, что требует высокочувствительного метода оценки возможного действия ферментного препарата на жизнедеятельность микрофлоры [20].

В этом случае перед началом анализа измерительные ячейки и молоко стерилизуют отдельно. При этом молоко желательно стерилизовать методами фильтрации или пастеризации (чтобы предотвратить ухудшение его потребительских свойств вследствие высокотемпературной денатурации белков, витаминов и т.д.). Затем по 5 мл молока наливали в каждую из измерительных ячеек. После этого добавляли туда суспензии, содержащие жизнеспособные *S. thermophilus* или *L. helveticus* и препарат ТГ. После этого ячейки помещали в измерительный модуль анализатора «Rabit» и инкубировали при 33 °С в течение трех суток с автоматической регистрацией через каждые 6 мин величины импедансной электропроводности среды отдельно в каждой из ячеек.

В этих условиях, как видно из рис. 7, *S. thermophilus* в период своей экспоненциальной фазы роста (начинавшейся с 6 ч и заканчивавшейся после 36 ч инкубации) проявлял более высокую активность, чем *L. helveticus*. При этом экспоненциальная фаза роста *L. helveticus* протекала менее интенсивно и более

растянуто по времени (не заканчиваясь даже после 72 ч инкубации). В присутствии ТГ процессы сквашивания молока протекали более интенсивно, чем без ТГ. При сквашивании под действием *L. helveticus* эффект ТГ был более выраженным, чем при участии *S. thermophilus*.

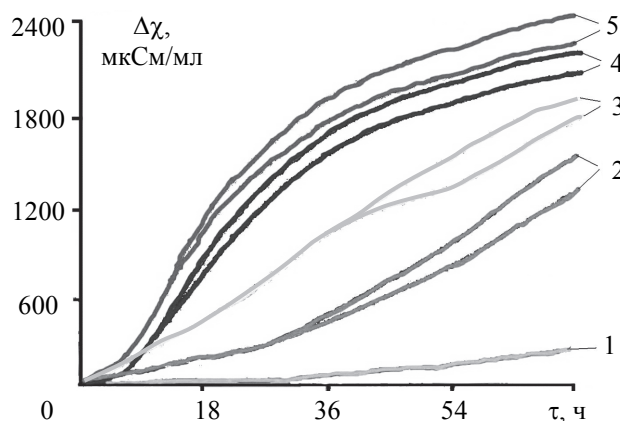


Рис. 7. Результаты исследования процессов сквашивания молока различными видами микроорганизмов в присутствии препарата ТГ с помощью микробиологического кондуктометрического анализатора «Rabit».

Кривыми показаны данные, полученные для: «стерильного» молока («фоновый контроль») (1); 5 мл молока + 0,25 мл *Lh* (2); 5 мл молока + 0,25 мл *Lh* + 0,125 г ТГ (3); 5 мл молока + 0,25 мл *St* (4); 5 мл молока + 0,25 мл *St* + 0,125 г ТГ (5)

Получить такой объем информации, имея в своем арсенале только стандартный культуральный метод определения количества микроорганизмов в пробах, было бы весьма затруднительно. Однако в случае, например, совместного сквашивания молока культурами *S. thermophilus* и *L. helveticus* без дополнительных биохимических и микроскопических методов идентификации микроорганизмов исследователю также трудно было бы обойтись.

Заключение

Предлагаемый в настоящей работе метод импедансного биотестирования, обеспечивая достаточно высокий уровень сходимости своих данных с данными, получаемыми в результате применения стандартных культуральных методик биотестирования, имеет по сравнению с последними также целый ряд преимуществ, в частности:

1. возможность получения подробной информации о динамике изменения численности популяции и интенсивности метаболизма тестовых микроорганизмов (что особенно пригодились нам в последнем случае – когда мы исследовали процессы сквашивания молока);
2. значительное уменьшение расхода питательных сред, временных и трудовых затрат исследователя при проведении анализов (поскольку отпадает необходимость в приготовлении большого числа последовательных разведений исходной пробы, как это предусматривает стандартный культуральный метод определения количества микроорганизмов; плюс, при микробиологическом анализе даже одного, отдельно взятого разведения, в случае оценки антисептических свойств хлоргексидина тратилось $4 \times 2 = 8$ мл питательного бульона вместо $4 \times 15 = 60$ мг плотной агаризованной питательной среды);
3. повышение объективности оценки результатов анализа (в частности, из-за уменьшения ошибки, возникающей вследствие неравномерного распределения пробы по дну чашки Петри, которое может привести к слиянию колоний).

Литература

1. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1972. 480 с.
2. Коротяев А.И., Бабичев А.С. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 4-е изд. СПб.: СпецЛит, 2008. 767 с.
3. Gulya A.P., Prisakar V.I., Tsapkov V.I., Buracheva S.A., Spynu S.N., Bezhenar N.P. Synthesis and antimicrobial activity of sulfanilamide-containing copper (II) naphthalidenethiosemicarbazidates // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2008. V. 42. N 6. P. 326–328. doi: 10.1007/s11094-008-0118-6
4. Velikorodov A.V., Ionova V.A., Degtyarev O.V., Sukhenko L.T. Synthesis and antimicrobial and antifungal activity of carbamate-functionized spiro compounds // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2013. V. 46. N 12. P. 715–719. doi: 10.1007/s11094-013-0876-7

5. Yunnikova L.P., Akent'eva T.A., Aleksandrova G.A. Synthesis and antimicrobial activity of amines and imines with a cycloheptatriene fragment // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013. V. 46. N 12. P. 723–725. doi: 10.1007/s11094-013-0878-5
6. Vorob'eva A.I., Sultanova G.R., Bulgakov A.K., Zajchkovskii V.I., Kolesov S.V. Synthesis and biological properties of copolymers based on N,N-diallyl-N,N-dimethylammonium chloride // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013. V. 46. N 11. P. 653–655. doi: 10.1007/s11094-013-0863-z
7. Belakhov V.V., Shenin Yu.D. Synthesis and antifungal activity of N-trialkylsilyl derivatives of nystatin // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008. V. 42. N 6. P. 322–325. doi: 10.1007/s11094-008-0117-7
8. Anikina L.V., Vikharev Yu.B., Rozhkova Yu.S., Shklyayev Yu.V. Synthesis and biological activity of 3-spiro[adamantane-2,3'-isoquinolines] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013. V. 46. N 12. P. 707–710. doi: 10.1007/s11094-013-0874-9
9. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963. 146 с.
10. Raevsky O.A., Razdolskii A.N., Liplavskii Ya.V., Raevskaya O.E., Yarkov A.V. Acute toxicity evaluation upon intravenous injection into mice: interspecies correlations, lipophilicity parameters, and physicochemical descriptors // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012. V. 46. N 2. P. 69–74. doi: 10.1007/s11094-012-0736-x
11. Raevskii O.A., Razdol'skii A.N., Tonkopii V.D., Iofina I.V., Zagrebin A.O. Classificatory and quantitative models of the relationship between the structures of chemical compounds and their toxicity for *Daphnia magna* // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008. V. 42. N 6. P. 329–334. doi: 10.1007/s11094-008-0119-5
12. Markosyan A.I., Akalyan Kh.S., Arsenyan F.G., Sukasyan R.S., Garibdzhanyan B.T. Synthesis and biological properties of 3-phenyl- and 3-phenethyl-5-methyl-5-ethyl-4-oxo-3,4,5,6-tetrahydrobenzo[h]quinazolines // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008. V. 42. N 6. P. 313–318. doi: 10.1007/s11094-008-0115-9
13. Shakurova E.R., Parfenova T.I., Sufiyarova R.Sh., Khalilova A.Z., Akhmetova V.R., Bashkatov S.A. Synthesis and anti-inflammatory activity of acyl derivatives of taraxasterol // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008. V. 42. N 6. P. 319–321. doi: 10.1007/s11094-008-0116-8
14. Kedik S.A., Sakaeva I.V., Kochkina Yu.V., Eremin D.V., Panov A.V., Suslov V.V. Synthesis and radioprotector activity of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinyltetrazole copolymers // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013. V. 46. N 12. P. 726–729. doi: 10.1007/s11094-013-0879-4
15. Sibirtsev V.S. Study of applicability of the bifunctional system "ethidium bromide + Hoechst-33258" for DNA analysis // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. N 4. P. 449–457. doi: 10.1007/s10541-005-0136-x
16. Sibirtsev V.S. Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application // *Biochemistry (Moscow)*. 2007. V. 72. N 8. P. 887–900. doi: 10.1134/S0006297907080111
17. Сибирцев В.С., Гарабджиу А.В. Флуоресцентные ДНК-зонды: введение в теорию и практику использования. СПб.: НОУ «Экспресс», 2006. 188 с.
18. Сибирцев В.С., Гарабджиу А.В. Новые методы биотестирования и анализа ДНК с помощью флуорофоров // *Биотехносфера*. 2011. Т. 13. № 3. С. 9–14.
19. Бессонов Л.А. Теоретические основы электротехники. М.: Высшая школа, 1996. 492 с.
20. Shleikin A.G., Krasnikova L.V., Danilov N.P. Substrate specificity of transglutaminase. Influence of transglutaminase on milk whey proteins cross-linking. In: *Food Technology Operations* / Eds W. Kopec, M. Korzeniowska. Wroclaw: New Vistas, 2009. 317 p.

**Сибирцев Владимир
Станиславович**

— кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация; ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации флота (Гипрорыбфлот), Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация, vs1969g@mail.ru

Красникова Людмила Васильевна

— доктор технических наук, профессор, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, krasnikoval@yandex.ru

Шлейкин Александр Герасимович

— доктор медицинских наук, заведующий кафедрой, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, shleikin@yandex.ru

Строев Сергей Александрович

— PhD, научный сотрудник, Университет Тампере, Тампере, 33014, Финляндия, s_stroev@hotmail.com

Наумов Игорь Александрович

— научный сотрудник, Научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации флота (Гипрорыбфлот), Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация, 89043321476@mail.ru

Олехнович Роман Олегович

— кандидат технических наук, доцент, доцент, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, romanart@inbox.ru

- Терещенко Виктория Федоровна*** – студент, Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия (СПХФА), Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация, victoria.ter1601@gmail.com
- Шабанова Эмилия Михмановна*** – студент, Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия (СПХФА), Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация, victoria.ter1601@gmail.com
- Аль-Хатиб Мусса*** – студент, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация; ассистент, Университет Алмутанны, 66001, Алмутанна Республика Ирак, muosa_m_85@yahoo.com
- Vladimir S. Sibirtsev*** – PhD, leading scientific researcher, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation; leading scientific researcher, "Research and Design Institute on Development and Exploitation of Fish Fleet", JSC, 197022, Saint Petersburg, Russian Federation, vs1969r@mail.ru
- Ludmila V. Krasnikova*** – D.Sc., professor, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, krasnikoval@yandex.ru
- Alexander G. Schleikin*** – D.Sc., Head of Department, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, shleikin@yandex.ru
- Sergei A. Stroeв*** – PhD, scientific researcher, University of Tampere, Tampere, 33014, Finland, s_stroeв@hotmail.com
- Igor A. Naumov*** – scientific researcher, "Research and Design Institute on Development and Exploitation of Fish Fleet", JSC, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation, 89043321476@mail.ru
- Roman O. Olekhovich*** – PhD, assistant professor, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, romanart@inbox.ru
- Victoria F. Tereschenko*** – student, Saint Petersburg State Chemical - Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg, 197376, Russian Federation, victoria.ter1601@gmail.com
- Emilia M. Shabanova*** – student, Saint Petersburg State Chemical - Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg, 197376, Russian Federation, victoria.ter1601@gmail.com
- Mussa Al-Khatib*** – student, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation; laboratory assistant, University of Almutanna, Almutanna, 66001, Republic of Iraq, muosa_m_85@yahoo.com