



УДК 504.064, 574.21

## ОПТИКО-ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ МИКРОБИОТЕСТОВАЯ СИСТЕМА ОЦЕНКИ ТОКСИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ НЕФТЕПРОДУКТОВ

В.С. Сибирцев<sup>a</sup>, С.А. Строев<sup>b</sup><sup>a</sup> Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация<sup>b</sup> Университет Тампере, Тампере, 33014, Финляндия

Адрес для переписки: vs1969r@mail.ru

### Информация о статье

Поступила в редакцию 13.11.18, принята к печати 23.12.18

doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-74-81

Язык статьи – русский

**Ссылка для цитирования:** Сибирцев В.С., Строев С.А. Оптико-электрохимическая микробиотестовая система оценки токсической безопасности нефтепродуктов // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. Т. 19. № 1. С. 74–81. doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-74-81

### Аннотация

Предложена комплексная инструментальная оптико-электрохимическая микробиотестовая система, которая может быть использована для оценки токсичности различной продукции и отходов ее производства, а также степени экологической безопасности различных помещений, водоемов, территорий и источников загрязнения окружающей среды. В качестве примера анализа, проводимого с помощью описанной системы, приведена методика, в ходе осуществления которой емкости с *Chlorella vulgaris* инкубировались в течение 12 часов в присутствии разных концентраций пяти типичных нефтепродуктов в водном растворе, содержащем сахарозу с различными минеральными добавками. При этом в каждой из упомянутых емкостей в течение всего времени их инкубации с интервалом 60 минут измерялись эффективность упругого светорассеяния в области длин волн 820–915 нм ( $I_{od}$ ), оптическая плотность в области длин волн  $435 \pm 5$  нм ( $A_{vd}$ ) и значение редокс-потенциала ( $E$ ). После чего рассчитывались значения  $\Delta I_{od}/\Delta t$ ,  $\Delta A_{vd}/\Delta t$ ,  $\Delta E/\Delta t$  в каждый момент времени  $t_i$ , а также частные и общая степени активирования либо ингибирования (+/–) жизнедеятельности *C.vulgaris* заданной концентрацией каждого из тестируемых нефтепродуктов. В результате было показано, что изменение  $I_{od}$  в большей мере характеризовало интенсивность роста и размножения *C.vulgaris*; тогда как изменение  $E$  в большей мере характеризовало активность метаболизма тестовых микроорганизмов. При концентрациях тестируемых нефтепродуктов  $2 \cdot 10^{-3}$  об.% и более, они в тем большей степени оказывали угнетающее действие на *C.vulgaris*, чем в большей концентрации эти продукты присутствовали в среде, а также чем больше они содержали ароматических составляющих и химически активных групп. В то же время при концентрации нефтепродуктов  $2 \cdot 10^{-5}$  об.% и менее жизнедеятельность *C.vulgaris* активировали даже весьма химически активные ароматические углеводороды. Причем степень такого активирования оказывалась тем меньшей, чем более неоднородная смесь различных углеводородов присутствовала в тестируемой пробе. Таким образом мы убедились, что представленная микробиотестовая система предоставляет исследователю чувствительный, экспрессный, доступный и информативный способ оценки про- и антимикробной активности различной продукции и отходов, а также экологической безопасности различных помещений, территорий и т.п.

### Ключевые слова

биотестирование, нефтепродукты, антимикробная активность, нефелометрия, редокс потенциал

## NEW OPTICAL-ELECTROCHEMICAL MICROBIOTESTING SYSTEM FOR VALUATION OF OIL PRODUCTS TOXICOSAFETY

V.S. Sibirtsev<sup>a</sup>, S.A. Stroeve<sup>b</sup><sup>a</sup>ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation<sup>b</sup>University of Tampere, Tampere, 33014, Finland

Corresponding author: vs1969r@mail.ru

### Article info

Received 13.11.18, accepted 23.12.18

doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-74-81

Article in Russian

**For citation:** Sibirtsev V.S., Stroeve S.A. New optical-electrochemical microbiotesting system for valuation of oil products toxicosafety. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2019, vol. 19, no. 1, pp. 74–81 (in Russian). doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-74-81

**Abstract**

A new, integrated, instrumental, optical-electrochemical, microbiotesting system is described. This system can be used to assess the toxicity of various products and wastes, as well as the degree of environmental safety of various rooms, reservoirs, territories and sources of environmental pollution. A technique is presented as an example of the analysis carried out using the described system. This technique comprises incubation of *Chlorella vulgaris* tanks for 12 hours in the presence of various concentrations of 5 typical oil products in an aqueous solution containing sucrose with various mineral additives. At the same time, the elastic light scattering efficiency in the wavelength range of 820–915 nm ( $I_{od}$ ), the optical density in the wavelength range of 435±5 nm ( $A_{vd}$ ) and the value of the redox potential ( $E$ ) were measured in each of the mentioned containers during the entire time of their incubation with an interval of 60 minutes. Then,  $\Delta I_{od}/\Delta\tau$ ,  $\Delta A_{vd}/\Delta\tau$ ,  $\Delta E/\Delta\tau$  values were calculated at each time  $\tau_i$ , as well as partial and total degrees of activation or inhibition (+/-) of *C.vulgaris* vital activity by given concentration of each tested oil products. As a result, it was shown that the change in  $I_{od}$  characterized to a greater extent the intensity of growth and reproduction of *C.vulgaris*; whereas the change in  $E$  characterized to a greater extent the metabolic activity of test microorganisms. At the concentrations of the tested oil products equal to  $2 \times 10^{-3}$  vol.% and more, the higher concentrations of these products were in the medium and the more they contained aromatic components and chemically active groups, the greater degree of inhibitory effect on *C.vulgaris* they had. On the other hand, at the concentrations of the same oil products equal to  $2 \times 10^{-5}$  vol.% and less, the vital activity of *C.vulgaris* was activated even by very chemically active aromatic hydrocarbons. Moreover, the degree of such activation was so much the less, the more heterogeneous mixture of various hydrocarbons was present in the test sample. Thus, we were certain that the presented microbiotesting system provides the researcher with a sensitive, express, accessible and informative method for assessing the pro- and antimicrobial activity of various products and wastes, as well as the environmental safety of various premises and territories.

**Keywords**

biotesting, oil products, antimicrobial activity, nephelometry, redox potential

**Введение**

В связи с ускоряющимся развитием технологий, а также увеличением объемов и разнообразия производимой и потребляемой человечеством продукции возрастает и антропогенная нагрузка на окружающую среду. Вследствие этого все более актуальной становится задача разработки достаточно простых, дешевых, быстрых, достоверных, надежных и доступных для массового применения методов комплексной оценки санитарно-гигиенического состояния и общей степени экологического неблагополучия различных помещений, водоемов, территорий и т.п.; оценки общей степени токсичности промышленных и бытовых выбросов и стоков до и после прохождения ими очистки; мониторинга экологической безопасности выпускаемой продукции; а также выявления всех возможных как позитивных, так и негативных свойств новых либо модифицированных материалов, продуктов и препаратов.

Наиболее целесообразно использование различных тестовых биосистем [1–7]: включающих как одноклеточные, так и более высокоорганизованные организмы (либо культуры клеток их тканей, крови и др.). При этом использование для биотестирования многоклеточных организмов позволяет моделировать с их помощью человеческий организм (особенно, если в качестве таковых используются позвоночные животные, как например рыбы, крысы и т.п.)<sup>1</sup>. В то же время биотестирование с помощью микроорганизмов делает проведение анализов значительно более объективным в оценке результатов (именно микроорганизмы являются основой большинства экосистем; кроме того, поскольку почти любой многоклеточный организм развивается из исходно единичной живой клетки, то во многих случаях реакции на внешние химические и физические раздражители у одноклеточных и многоклеточных организмов достаточно сходны). Однако принятые в настоящее время в качестве стандартных при микробиотестировании процедуры оценки общей выживаемости микроорганизмов (закрывающиеся, в большинстве случаев, в визуальной оценке того, насколько ингибируется или активируется по сравнению с контрольной группой рост тестовых микроорганизмов после инкубации их в течение одних или нескольких суток в стерильных условиях при заданной температуре в присутствии тестируемых проб) дают, как правило, лишь весьма неполную, субъективную и «статичную» информацию о летальных исходах тестовых организмов.

В связи с этим перспективным представляется использование для микробиологического тестирования различных инструментальных технологий, среди которых наиболее простыми в исполнении, достоверными и универсальными являются, на наш взгляд, различные оптические и электрохимические методы. Ранее нами уже применялись подобные инструментальные биотестовые системы [8–18]. Но в них для оценки изменения состояния тестовых организмов в присутствии тестируемых проб использовались либо чисто оптические, либо чисто электрохимические параметры. Если изменения интенсивности рэлеевского светорассеяния или концентрации ДНК способны свидетельствовать в основном об общем

<sup>1</sup> В организмах насекомых или моллюсков присутствуют кровеносная, нервная, дыхательная, пищеварительная и выделительная системы (более развитые затем у позвоночных, включая человека), не характерные ни для одноклеточных живых организмов, ни для растений или грибов; и кроме того даже колонии одноклеточных организмов реагируют на внешние химические и физические воздействия несколько иным образом, чем совокупность тех же организмов, не взаимодействующих непосредственно между собой; а у любых действительно многоклеточных организмов отличия от одноклеточных в их реакциях на внешние раздражители выражены в еще большей степени.

количестве тестовых микроорганизмов в пробе, то по изменению таких параметров тестовой среды, как pH, редокс-потенциал или электропроводность, можно судить о метаболической активности тестовых микроорганизмов в той же пробе. Исходя из этого разработан следующий метод комплексной оптико-электрохимической оценки токсической безопасности различной продукции и отходов ее производства либо степени экологической безопасности различных помещений, водоемов, территорий и источников загрязнения окружающей среды.

### Общая методика оценки токсической безопасности продукции

На первом этапе отбираются пробы воздуха, воды, почвы, берутся смывы или мазки со стен помещений и т.п. В лаборатории отобранные пробы делятся на несколько равных частей, каждая из которых добавляется к заданному объему жидкой тестовой среды, содержащей исходно определенное количество питательных веществ и жизнеспособных тестовых микроорганизмов (находящихся, желательнее, в экспоненциальной фазе своего развития, в которой они наиболее чувствительны к внешним воздействиям, а также характеризуются наибольшими темпами роста и метаболической активности).

Далее все образцы инкубируются в течение заданного времени при оптимальной температуре. При этом в каждом образце с интервалом от 10 до 100 минут (в зависимости от вида тестовых микроорганизмов, температуры инкубации и других условий анализа) регистрируются значения таких параметров тестовой среды (изменяющихся вследствие роста и размножения тестовых микроорганизмов, а также преобразования ими в ходе метаболической активности одних веществ, входящих в состав тестовой среды, в другие), как pH, редокс-потенциал, электропроводность, коэффициент рефракции, угол вращения поляризованного света, характер спектров люминесценции, линейного и кругового дихроизма, рэлеевского и рамановского светорассеяния, светопоглощения в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях и т.п.

После этого общая степень активирования либо ингибирования (+/-) жизнедеятельности тестовых микроорганизмов рассчитывается по формуле

$$\varepsilon_S = \sum(w_i \varepsilon_i) / \sum w_i,$$

где  $\varepsilon_i = 100(\Delta Y_{ii} - \Delta Y_{ci}) / \Delta Y_{ci}$  – частные степени активирования или ингибирования тестируемыми пробами жизнедеятельности тестовых микроорганизмов, рассчитываемые отдельно по изменениям каждого из  $Y_i$  параметров тестовой среды;  $\Delta Y_i = \sum_j (Y_{ei,j} - Y_{bi,j}) / N$  – средние по выборке из  $N$  образцов разности значений  $Y_i$  параметров в начале ( $Y_b$ ) и в конце ( $Y_e$ ) инкубирования тестовых сред в присутствии тестируемых проб ( $\Delta Y_i$ ) и в их отсутствие ( $\Delta Y_c$ );  $w_i$  – весовые коэффициенты, выбираемые в зависимости от информативности  $Y_i$  параметра для общей оценки активности жизнедеятельности тестовых микроорганизмов в каждом конкретном виде анализа.

При необходимости исследования тонкой динамики жизненной активности тестовых микроорганизмов скорость изменения характеристических параметров тестовых сред рассчитывается как

$$(\Delta Y / \Delta \tau)_{i,l} = \sum_j (Y_{i,l,j} - Y_{i,l-1,j}) / ((\tau_{i,l,j} - \tau_{i,l-1,j})N),$$

где  $\tau_{i,l,j}$  – время, прошедшее от начала инкубирования тестовых сред в присутствии тестируемых проб до измерения  $Y_{i,l,j}$  значения  $Y_i$  параметра этих сред в  $j$ -емкости ( $j=1-N$ ). После этого, как правило, строится график  $(\Delta Y / \Delta \tau)_{i,l}$  от  $\tau$ , а также определяются максимальные по модулю значения упомянутых скоростей ( $|\Delta Y / \Delta \tau|_{i,\max}$ ) и время  $\tau_{i,\max}$ , прошедшее от начала инкубации тестовых сред в присутствии тестируемых проб до достижения каждого из значений  $|\Delta Y / \Delta \tau|_{i,\max}$ .

Затем на основании сравнения значений  $\varepsilon_S$  тестируемых и контрольных образцов, а также сопоставления значений  $\varepsilon_i$ , полученных для различных параметров тестовых сред, делается вывод об общем характере воздействия анализируемых проб на тестовую биосистему. В результате делается вывод о степени экологической безопасности территории, помещения, источника возможного загрязнения окружающей среды либо о степени токсической безопасности материала, продукта или препарата.

### Методика оценки влияния различных нефтепродуктов на динамику жизнедеятельности *Chlorella vulgaris*

В качестве примера можно привести оценку влияния на динамику жизнедеятельности *Chlorella vulgaris* ATCC 9765 (относящейся к группе наиболее распространенных в естественных условиях одноклеточных зеленых водорослей) разных концентраций пяти типичных нефтепродуктов. Наряду с сырой нефтью наиболее значимыми источниками загрязнения окружающей среды являются дизельное топливо (ДТ); уайт-спирит (УС) – содержащий смесь жидких алифатических и ароматических углеводородов, причем последних не более 16 % по массе; толуол (Тл) – ароматический углеводород; ОП-10 (ОП) – смесь ароматических углеводородов (рис. 1), н-гексан (нГн) – насыщенный, ациклический углеводород.

Для этого было проведено три серии измерений, в каждой из которых исследовалась кинетика роста и метаболической активности *C. vulgaris* в 55 пробирках. Перед началом каждой серии в каждую пробирку добавлялось по 8 мл тестовой среды (водный раствор, содержащий исходно 3 г/л сахарозы + 1,7 г/л  $\text{NaNO}_3$  + 1 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,5 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + 0,16 г/л  $\text{MgSO}_4$  + 0,02 г/л  $\text{FeCl}_3$  + 0,01 г/л  $\text{CaCl}_2$  и около

$5 \cdot 10^6$  кл/мл жизнеспособных *Chlorella vulgaris* ATCC 9765), а также от 0 (в случае контрольных пробирок) до 0,02 мл 100 % либо 1 % ДТ, УС, Тл, ОП либо нГн (по 5 шт.). После чего все пробирки содержались при комнатной температуре в микробиологическом шейкере (для лучшей аэрации среды) в условиях постоянного равномерного освещения от двух фотодиодных ламп в течение 12 часов.

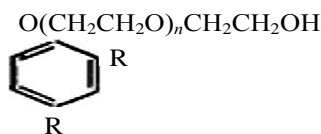


Рис. 1. Структурная формула ОП-10.

В каждой пробирке в течение всего времени инкубации с интервалом 60 минут измерялись эффективность упругого светорассеяния в области длин волн 820–915 нм ( $I_{od}$ ), оптическая плотность в области длин волн 430–440 нм ( $A_{vd}$ ) и значение редокс-потенциала ( $E$ ). Причем значения  $I_{od}$  регистрировались нефелометрическим способом с помощью анализатора Флюорат-02-М, устанавливаемого в режим фотофлуориметрии со светофильтрами М1 и М2 в каналах фотовозбуждения и эмиссии. Значения  $A_{vd}$  регистрировались с помощью анализатора Флюорат-02-М, устанавливаемого в режим фотометрии со светофильтром №15 в канале фотовозбуждения. Значения  $E$  регистрировались с помощью иономера Эксперт-001 с комбинированным электродом ЭРП-105. Из рис. 2 видно, почему для измерений оптической плотности суспензий *C.vulgaris* была выбрана область длин волн 430–440 нм. Спектры на рис. 2 регистрировались с помощью флуориметра СМ-2203 (в режиме фотометрии при щели монохроматора 1 нм), поскольку в анализаторе Флюорат-02-М вместо монохроматоров используются светофильтры, и вследствие этого оптическую плотность, а также эффективность светорассеяния и интенсивность флуоресценции, измеряемые как логарифм отношения опорного сигнала к аналитическому, с помощью этого анализатора можно регистрировать только в фиксированных областях длин волн, а не в виде спектров.

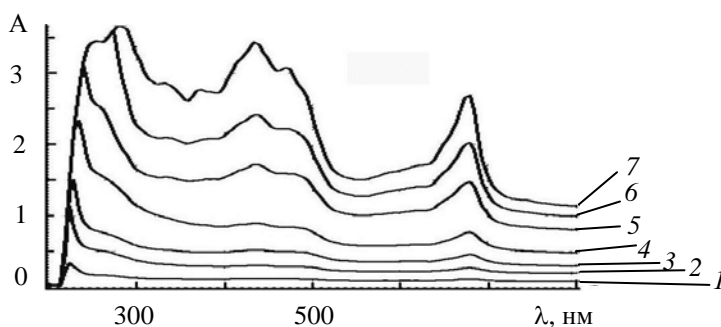


Рис. 2. Спектры светопоглощения водных суспензий с разными концентрациями *C.vulgaris* ATCC 9765, зарегистрированные в отсутствие нефтепродуктов. Кривым 1–7 соответствует концентрация *C.vulgaris*:  $4 \cdot 10^5$ ,  $9 \cdot 10^5$ ,  $1,5 \cdot 10^6$ ,  $2,5 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$ ,  $7 \cdot 10^6$  и  $1 \cdot 10^7$  кл/мл

Далее все полученные значения усреднялись (сначала по пяти образцам внутри каждой серии измерений, а затем между сериями), и для каждого из усредненных значений рассчитывался 95 % доверительный интервал. После чего общая степень активирования либо ингибирования (+/–) жизнедеятельности *C.vulgaris* заданной концентрацией тестируемого нефтепродукта рассчитывалась по формуле

$$\varepsilon_S = \Sigma (\varepsilon_{Iod} + 0,7\varepsilon_{Avd} + 0,7\varepsilon_E) / 2,4,$$

где  $\varepsilon_Y = 100 (\Delta Y_t - \Delta Y_c) / \Delta Y_c$ , а  $\Delta Y_t$  и  $\Delta Y_c$  – усредненные по 15 образцам изменения значений  $I_{od}$ ,  $A_{vd}$  или  $E$  за время инкубирования *C.vulgaris* в присутствии и в отсутствие нефтепродуктов.

Кроме того, для каждой выборки из 15 образцов рассчитывалась скорость изменения характеристических параметров тестовых сред

$$(\Delta Y / \Delta \tau)_{i,l} = \Sigma_j (Y_{i,l,j} - Y_{i,l-1,j}) / ((\tau_{i,l,j} - \tau_{i,l-1,j})15),$$

где  $\tau_i$  – время от начала инкубирования *C.vulgaris* до измерения  $Y_{i,j}$  значения  $Y_i$  параметра тестовой среды в  $j$ -емкости ( $j=1-15$ ).

### Результаты и их обсуждение

Основные данные, полученные с помощью методики, приведены на рис. 3 и в таблице. При этом изменение  $I_{od}$  в большей мере характеризовало интенсивность роста и размножения тестовых микроорганизмов (поскольку на эффективность рэлеевского светорассеяния влияют, в первую очередь, количество и размер микробных клеток, присутствующих в анализируемом образце). Изменение  $E$  в большей мере характеризовало активность метаболизма тестовых микроорганизмов.

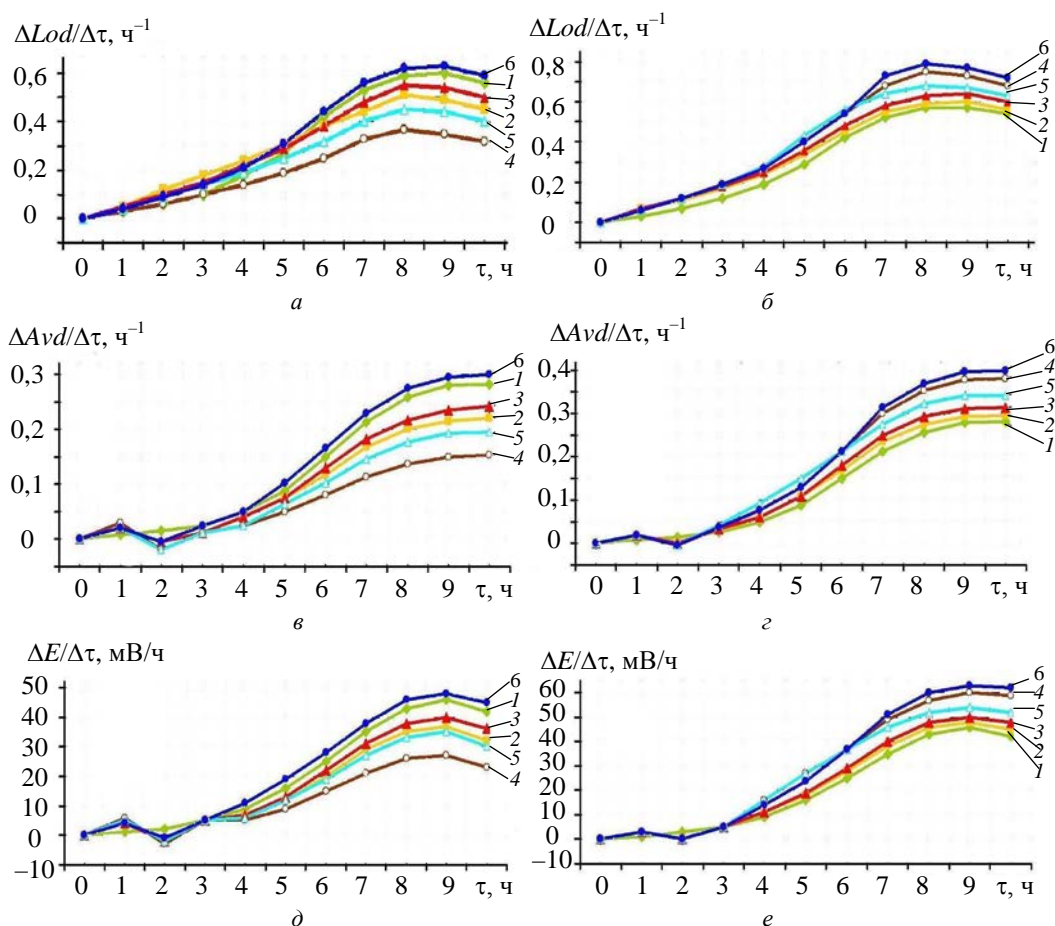


Рис. 3. Усредненные зависимости скоростей изменения эффективности упругого светорассеяния в области длин волн 820–915 нм (а, б) и оптической плотности в области длин волн 435±5 нм (в, г), а также значений редокс-потенциала (д, е) тестовых сред от времени инкубации (τ) *C. vulgaris* ATCC 9765 в присутствии 2·10<sup>-3</sup> (а, в, д) либо 2·10<sup>-5</sup> (б, г, е) об.% дизельного топлива (2), уайт-спирита (3), толуола (4), ОП-10 (5) и н-гексана (6), а также в отсутствие (1)

Таблица. Степени активирования или ингибирования (+/-) жизнедеятельности *Chlorella vulgaris* ATCC 9765 в присутствии различных количеств типичных нефтепродуктов

Параметр	Нефтепродукт, при концентрации, об. %									
	2·10 <sup>-3</sup>					2·10 <sup>-5</sup>				
	ДТ	УС	ОП	Тл	нГн	ДТ	УС	ОП	Тл	нГн
ε <sub>Lod</sub> , %	-28 ±5	-17 ±4	-50 ±6	-32 ±5	+7 ±2	+10 ±2	+15 ±3	+36 ±5	+30 ±5	+45 ±6
ε <sub>Avd</sub> , %	-32 ±5	-22 ±3	-56 ±6	-39 ±6	+12 ±3	+15 ±3	+21 ±4	+44 ±6	+36 ±6	+53 ±7
ε <sub>E</sub> , %	-34 ±6	-23 ±4	-58 ±7	-40 ±7	+13 ±3	+16 ±3	+23 ±4	+46 ±6	+38 ±7	+56 ±7
ε <sub>S</sub> , %	-31 ±8	-20 ±6	-54 ±9	-36 ±8	+10 ±5	+13 ±5	+19 ±6	+41 ±8	+34 ±8	+50 ±9

Из представленных данных можно сделать следующие выводы. Среди исследованных нефтепродуктов, присутствующих в инкубационной среде в достаточно большой концентрации (2·10<sup>-3</sup> об.%), в наибольшей степени жизнедеятельность тестовых микроорганизмов ингибировал ОП, содержащий помимо ароматического цикла, также активные спиртовые и эфирные группы (ε<sub>S</sub>=-54±9 %). Далее в порядке уменьшения степени ингибирования жизнедеятельности *C. vulgaris* следовали: толуол (основной составляющей молекулы которого являлось бензольное кольцо, соединенное, в отличие от ОП, с малоактивной метильной группой, ε<sub>S</sub>=-36±8 %), ДТ (содержащее большое количество веществ, вредных для жизнедеятельности большинства организмов, ε<sub>S</sub>=-31±8 %) и УС (в котором содержание различных ароматических углеводородов составляло не более 16 %, а остальные 84 % приходились на долю насыщенных ациклических и алициклических углеводородов, ε<sub>S</sub>=-20±6 %). В то же время нГн – насыщенный

ациклический углеводород – даже в концентрации  $2 \cdot 10^{-3}$  об.% в небольшой степени активировал жизнедеятельность *C. vulgaris* ( $\epsilon_S = +10 \pm 5$  %).

Как видно из рис. 3, а, даже в случае достаточно больших концентраций тестируемых нефтепродуктов ( $2 \cdot 10^{-3}$  об.%) в начальный период инкубации в присутствии практически любого из них имела место некоторая активация роста *C. vulgaris*. И лишь затем в той или иной степени начиналось ингибирование жизнедеятельности тестовых микроорганизмов. Хотя в случае больших концентраций тестируемых нефтепродуктов ингибирование жизнедеятельности микроорганизмов в присутствии этих продуктов будет иметь место с самого начала инкубации.

Активация жизнедеятельности *C. vulgaris* наблюдалась и в присутствии любого из исследуемых нефтепродуктов в инкубационной среде в достаточно малой концентрации ( $2 \cdot 10^{-5}$  об.%). Причем активация была пролонгированной, в наибольшей мере она наблюдалась для нГн ( $\epsilon_S = +50 \pm 9$  %), затем для ОП ( $\epsilon_S = +41 \pm 8$  %), Тл ( $\epsilon_S = +34 \pm 8$  %), УС ( $\epsilon_S = +19 \pm 6$  %) и ДТ ( $\epsilon_S = +13 \pm 5$  %) (см. таблицу). Таким образом, можно заключить, что в целом *C. vulgaris* ATCC 9765 оказалась способна питаться даже химически активными ароматическими углеводородами, дезактивируя и разрушая их. Хотя *C. vulgaris* проще использовать в качестве источника углерода нГн. Причем химически менее активный толуол *C. vulgaris* оказалось труднее разлагать, чем ОП и нГн. А приспособиться к существованию в присутствии таких сложных смесей различных углеводородов, как УС и ДТ для *C. vulgaris* оказалось еще сложнее.

Кроме того, из рис. 3 можно видеть, что при малых концентрациях нефтепродуктов ( $2 \cdot 10^{-5}$  об.%) в начальный период инкубации в присутствии Тл скорость активации жизнедеятельности *C. vulgaris* была выше, чем в присутствии ОП. И лишь в случае пролонгированной инкубации скорость возрастания жизненной активности *C. vulgaris* в присутствии толуола постепенно уменьшалась.

Также из рис. 3 можно видеть, что максимальная скорость изменения  $I_{od}$  в результате жизнедеятельности *C. vulgaris* достигалась раньше, чем  $|\Delta E/\Delta t|_{\max}$ , последнее значение во всех случаях достигалось раньше, чем  $|\Delta A_{vd}/\Delta t|_{\max}$ .

И наконец, из рис. 3 можно видеть, что в присутствии всех тестируемых нефтепродуктов в диапазоне концентраций от  $2 \cdot 10^{-5}$  до  $2 \cdot 10^{-3}$  об.% в начальный период инкубации ( $\tau < 3$  ч) скорости изменения  $A_{vd}$  и  $E$  в результате жизнедеятельности тестовых микроорганизмов, в отличие от  $\Delta I_{od}/\Delta t$ , с течением времени менялись немонотонно (в большей степени эти изменения происходили в присутствии больших концентраций тестируемых нефтепродуктов). И лишь при пролонгации инкубации порядок активирования и ингибирования жизнедеятельности *C. vulgaris* в присутствии тестируемых нефтепродуктов начинал соответствовать описанному выше. Такой немонотонный характер изменения  $\Delta A_{vd}/\Delta t$  и  $\Delta E/\Delta t$  отражал, вероятно, метаболические процессы приспособления тестовых микроорганизмов к присутствию тестируемых веществ в начальный период инкубации этих микроорганизмов (в то время как изменение  $I_{od}$  в значительно большей мере отражало изменения в интенсивности роста и размножения тестовых микроорганизмов, нежели в характере их метаболизма).

### Заключение

Можно заключить, что угнетающее воздействие нефтепродуктов в достаточно больших концентрациях ( $2 \cdot 10^{-3}$  об.% и более) усиливает содержание ароматических составляющих и химически активных групп (кислотных, спиртовых, эфирных и т.п.).

В то же время при малых концентрациях тех же нефтепродуктов ( $2 \cdot 10^{-5}$  об.% и менее) *C. vulgaris* ATCC 9765 может питаться даже химически активными ароматическими углеводородами (ОП-10), дезактивируя и разрушая их, а также активируя собственную жизнедеятельность. Причем химически менее активный толуол *C. vulgaris* оказалось труднее разлагать, чем ОП-10. А приспособиться к существованию в присутствии таких сложных смесей различных углеводородов, как уайт-спирит и дизельное топливо, для *C. vulgaris* оказалось еще сложнее. Причем дизельное топливо оказалось для *C. vulgaris* более сложным источником питательных веществ, чем уайт-спирит. То есть степень активирования жизнедеятельности микроорганизмов малыми концентрациями нефтепродуктов зависела не только от сложности и химической активности структур этих соединений, но и от однородности упомянутых структур (поскольку, чем более сложная смесь различных загрязняющих углеводородов присутствовала в окружающей среде, тем более разнообразный комплекс ферментов требовалось задействовать микроорганизмам для разложения этих углеводородов).

И наконец, в присутствии всех тестируемых нефтепродуктов в диапазоне концентраций от  $2 \cdot 10^{-5}$  до  $2 \cdot 10^{-3}$  об.% в начальный период инкубации ( $\tau < 3$  ч)  $\Delta A_{vd}/\Delta t$  и  $\Delta E/\Delta t$  в результате жизнедеятельности *C. vulgaris* с течением времени изменялись немонотонно.

Таким образом, комплексное инструментальное оптико-электрохимическое биотестирование позволяет удобно оценивать санитарно-гигиеническое состояние и общую степень экологического неблагополучия различных территорий, в том числе водоемов; а также токсичность различных выбросов и стоков.

Представленная в настоящей работе микробиотестовая система позволяет получать, по сравнению с ранее используемыми методами биотестирования, значительно более детальную и достоверную информацию о динамике как роста, так и метаболической активности тестовых микроорганизмов при оценке с их помощью токсической безопасности. Применение системы существенно уменьшает время анализов (12 ч вместо 48 для стандартной методики биотестирования с *C. vulgaris*); а также расход тестовых сред и трюдозатраты.

## Литература

## References

1. Divaeva L.N., Klimenko A.I., Morkovnik A.S., Fetisov L.N., Kuz'menko T.A., Zubenko A.A., Bodryakova M.A., Bodryakov A.N. Synthesis and antimicrobial and protistocidal activity of 1-(2-aryloxyethyl)- and 2-halobenzyl)-3-(2-hydroxyethyl)-2-imino-1,3-dihydrobenzimidazolines // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. V. 49. N 2. P. 91–95. doi: 10.1007/s11094-015-1228-6
2. Grigor'eva M.N., Stel'makh S.A., Astakhova S.A., Tsenter I.M., Bazaron L.U., Batoev V.B., Mogonov D.M. Synthesis of polyalkylguanidine hydrochloride copolymers and their antibacterial activity against conditionally pathogenic microorganisms *Bacillus Cereus* and *Escherichia Coli* // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. V. 49. N 2. P. 99–103. doi: 10.1007/s11094-015-1230-z
3. Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S. Leukopenia prognosis by radiation therapy of patients with Hodgkin's disease // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 1997. V. 16. N 2. P. 183–188.
4. Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S. Leukopenia prognosis during radiation therapy in patients with Hodgkin's disease // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 1997. V. 16. N 4. P. 413–418.
5. Madesclaire M., Coudert P., Lyamin A.V., Sharipova S.Kh., Zaitseva Yu.V., Zaitsev V.P. Synthesis and antimicrobial activity of new ureas from (1s,2s)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. V. 49. N 1. P. 10–12. doi: 10.1007/s11094-015-1213-0
6. Odaryuk V.V., Burakov N.I., Kanibolotskaya L.V., Kanibolotskii A.L., Odaryuk I.D., Lebedeva N.Yu., Poddubnaya E.N., Shendrik A.N. Synthesis and antiradical and antibacterial activity of 4-(3',4'-dihydroxyphenyl)thiazole derivatives // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. V. 49. N 2. P. 96–98. doi: 10.1007/s11094-015-1229-5
7. Popov L.D., Levchenkov S.I., Zubenko A.A., Shcherbakov I.N., Fetisov L.N., Bodryakov A.N., Maevskii O.V., Kogan V.A. Synthesis, protistocidal and antibacterial activities of 2'-imidazolinyldrazones of mono- and dicarboxylic acids // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. V. 49. N 1. P. 21–23. doi: 10.1007/s11094-015-1215-y
8. Sibirtsev V.S. Biological test methods based on fluorometric genome analysis // *Journal of Optical Technology*. 2017. V. 84. N 11. P. 787–791. doi: 10.1364/jot.84.000787
9. 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
10. 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
11. Sibirtsev V.S., Naumov I.A., Kuprina E.E., Olekhovich R.O. Use of impedance biotesting to assess the actions of pharmaceutical compounds on the growth of microorganisms // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016. V. 50. N 7. P. 481–485. doi: 10.1007/s11094-016-1473-3
12. Sibirtsev V.S., Olekhovich R.O., Samuylova E.O. Assessment of integral toxicity of water resources by instrumental methods of analysis // *Proc. 17<sup>th</sup> Int. Multidisciplinary Scientific Geoconference SGEM, Albena, Bulgaria*, 2017. V. 17. N 61. P. 507–514. doi: 10.5593/sgem2017/61/S24.066
13. Сибирцев В.С., Гарабадзхиу А.В., Иванов С.Д. Механизмы изменения флуоресцентных свойств бисбензимидазольных красителей // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. № 9. С. 731–736. doi: 10.1007/s11094-015-1178-z
1. Divaeva L.N., Klimenko A.I., Morkovnik A.S., Fetisov L.N., Kuz'menko T.A., Zubenko A.A., Bodryakova M.A., Bodryakov A.N. Synthesis and antimicrobial and protistocidal activity of 1-(2-aryloxyethyl)- and 2-halobenzyl)-3-(2-hydroxyethyl)-2-imino-1,3-dihydrobenzimidazolines. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2015, vol. 49, no. 2, pp. 91–95. doi: 10.1007/s11094-015-1228-6
2. Grigor'eva M.N., Stel'makh S.A., Astakhova S.A., Tsenter I.M., Bazaron L.U., Batoev V.B., Mogonov D.M. Synthesis of polyalkylguanidine hydrochloride copolymers and their antibacterial activity against conditionally pathogenic microorganisms *Bacillus Cereus* and *Escherichia Coli*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2015, vol. 49, no. 2, pp. 99–103. doi: 10.1007/s11094-015-1230-z
3. Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S. Leukopenia prognosis by radiation therapy of patients with Hodgkin's disease. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 1997, vol. 16, no. 2, pp. 183–188.
4. Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S. Leukopenia prognosis during radiation therapy in patients with Hodgkin's disease. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 1997, vol. 16, no. 4, pp. 413–418.
5. Madesclaire M., Coudert P., Lyamin A.V., Sharipova S.Kh., Zaitseva Yu.V., Zaitsev V.P. Synthesis and antimicrobial activity of new ureas from (1s,2s)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2015, vol. 49, no. 1, pp. 10–12. doi: 10.1007/s11094-015-1213-0
6. Odaryuk V.V., Burakov N.I., Kanibolotskaya L.V., Kanibolotskii A.L., Odaryuk I.D., Lebedeva N.Yu., Poddubnaya E.N., Shendrik A.N. Synthesis and antiradical and antibacterial activity of 4-(3',4'-dihydroxyphenyl)thiazole derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2015, vol. 49, no. 2, pp. 96–98. doi: 10.1007/s11094-015-1229-5
7. Popov L.D., Levchenkov S.I., Zubenko A.A., Shcherbakov I.N., Fetisov L.N., Bodryakov A.N., Maevskii O.V., Kogan V.A. Synthesis, protistocidal and antibacterial activities of 2'-imidazolinyldrazones of mono- and dicarboxylic acids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2015, vol. 49, no. 1, pp. 21–23. doi: 10.1007/s11094-015-1215-y
8. Sibirtsev V.S. Biological test methods based on fluorometric genome analysis. *Journal of Optical Technology*, 2017, vol. 84, no. 11, pp. 787–791. doi: 10.1364/jot.84.000787
9. Sibirtsev V.S. Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, no. 8, pp. 887–900. doi: 10.1134/S0006297907080111
10. Sibirtsev V.S. Study of applicability of the bifunctional system "ethidium bromide + Hoechst-33258" for DNA analysis. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, vol. 70, no. 4, pp. 449–457. doi: 10.1007/s10541-005-0136-x
11. Sibirtsev V.S., Naumov I.A., Kuprina E.E., Olekhovich R.O. Use of impedance biotesting to assess the actions of pharmaceutical compounds on the growth of microorganisms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2016, vol. 50, no. 7, pp. 481–485. doi: 10.1007/s11094-016-1473-3
12. Sibirtsev V.S., Olekhovich R.O., Samuylova E.O. Assessment of integral toxicity of water resources by instrumental methods of analysis. *Proc. 17<sup>th</sup> Int. Multidisciplinary Scientific Geoconference, SGEM, Albena, Bulgaria*, 2017, vol. 17, no. 61, pp. 507–514. doi: 10.5593/sgem2017/61/S24.066
13. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Mechanisms of variation in fluorescent properties of bis-benzimidazole dyes. *Bioorganicheskaya khimiya*, 1995, vol. 21, no. 9, pp. 731–736. (in Russian). doi: 10.1007/s11094-015-1178-z
14. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA.

14. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 1997. V. 23. № 12. P. 857–866. doi: 10.1007/s11094-014-1154-z
15. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Suslov V.V., Garabadzhiu A.V., Traven' V.F. Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2003. V. 39. N. 6. P. 881–889. doi: 10.1023/B:RUJO.0000003169.96393.1d
16. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В. Новые методы биотестирования и анализа ДНК с помощью флуорофоров // *Биотехносфера*. 2011. Т. 13. № 3. С. 9–14.
17. Сибирцев В.С., Красникова Л.В., Шлейкин А.Г., Строев С.А., Наумов И.А., Олехнович Р.О., Терещенко В.Ф., Шабанова Э.М., Аль-Хатиб М. Новый метод биотестирования с применением современных импедансных технологий // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. 2015. Т. 15. № 2. С. 275–284. doi: 10.17586/2226-1494-2015-15-2-275-284
18. Сибирцев В.С., Кулаков А.Ю., Строев С.А. Кондуктометрическое биотестирование в применении к оценке про- и антибактериальных свойств катоцитов и анолитов // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. 2016. Т. 16. № 3. С. 573–576. doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-3-573-576
- Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 1997, vol. 23, no. 12, pp. 857–866. doi: 10.1007/s11094-014-1154-z
15. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Suslov V.V., Garabadzhiu A.V., Traven' V.F. Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2003, vol. 39, no. 6, pp. 881–889. doi: 10.1023/B:RUJO.0000003169.96393.1d
16. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V. New methods of bioassay and DNA analysis using fluorophores. *Biotechmosfera*, 2011, vol. 13, no. 3, pp. 9–14. (in Russian)
17. Sibirtsev V.S., Krasnikova L.V., Schleikin A.G., Stroeв 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) doi: 10.17586/2226-1494-2015-15-2-275-284
18. Sibirtsev V.S., Kulakov A.Yu., Stroeв S.A. Conductometry biotesting as applied to valuation of the pro- and antibacterial properties of catolites and anolites. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 573–576. (in Russian) doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-3-573-576

### Авторы

**Сибирцев Владимир Станиславович** – кандидат химических наук, доцент, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, Scopus ID: 6603964394, ORCID ID: 0000-0003-0829-5213, vs1969r@mail.ru

**Строев Сергей Александрович** – PhD, научный сотрудник, Университет Тампере, Тампере, 33014, Финляндия, Scopus ID: 6603430133, ORCID ID: 0000-0002-8632-553X, s\_stroev@hotmail.com

### Authors

**Vladimir S. Sibirtsev** – PhD, Associate Professor, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, Scopus ID: 6603964394, ORCID ID: 0000-0003-0829-5213, vs1969r@mail.ru

**Sergey A. Stroeв** – PhD, Scientific researcher, University of Tampere, Tampere, 33014, Finland, Scopus ID: 6603430133, ORCID ID: 0000-0002-8632-553X, s\_stroev@hotmail.com