

Сабих Абед Давуд – стажер кафедры энергофизики физического факультета БГУ. Научный руководитель – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры энергофизики Н. А. Дроздов.

Тофиг Гамбаевич Маммадов – доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией Института физики НАН Азербайджана.

Александр Кириллович Федотов – доктор физико-математических наук, профессор кафедры энергофизики физического факультета БГУ.

Андрей Викторович Ларькин – младший научный сотрудник кафедры энергофизики физического факультета БГУ.

Михаил Сергеевич Тиванов – кандидат физико-математических наук, заведующий кафедрой энергофизики физического факультета БГУ.

УДК 536.621:579.842.11

А. И. ДРАПЕЗА, Н. В. ПЛЕШКО, В. А. ЛОБАН, Г. А. СКОРОХОД, Е. И. ГУДКОВА

МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ТЕРМОГРАММ НА ОСНОВЕ МИКРОТЕРМОРЕЗИСТОРОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *E. COLI*

На примере бактерий *E. coli* показана эффективность метода регистрации дифференциальных термограмм с помощью микротерморезисторов для ускоренной оценки жизнеспособности интактной и инактивированной популяции используемой тест-культуры. Установлено, что жизнеспособность бактерий в питательной среде ТСБ (триптиказо-соевый бульон) при температуре 37 °С проявляется в эндотермическом характере метаболизма относительно контроля и экзотермическом – при температуре 30 °С. Метод позволяет оценить жизнеспособность бактерий в течение 80 мин при плотности популяции в пределах 10³ КОЕ/мл. Найдено также, что в 5 % растворе глюкозы тип метаболизма в зависимости от температуры по отношению к питательной среде ТСБ является противоположным при той же чувствительности и продолжительности измерений. Показано, что метаболизм бактерий в 5 % растворе глюкозы при температуре 30 °С, в отличие от среды ТСБ при данной температуре, проходит при гораздо меньшем уровне дифференциальной температуры в измерительной ячейке. При этом значения уровня дифференциальной температуры в измерительной ячейке являются соизмеримыми величинами для используемых питательных сред при температуре 37 °С.

Ключевые слова: калориметр; микротерморезисторы; дифференциальные термограммы; жизнеспособность; бактериальная популяция *E. coli*.

By the example of *E. coli* bacteria, the effectiveness of the differential thermogram recording method by means of microthermistors for accelerated evaluation of the intact and inactivated viability of the used test-culture population is demonstrated. It was found that viability of *E. coli* bacteria in a nutrient medium represented by trypticase-soy broth (TSB) is of the thermonegative and thermopositive metabolism type at temperatures 37 °C and 30 °C, respectively. The method enables one to evaluate the bacterial viability within 80 minutes for the population density 10³ CFU/ml. Also, it was found that in 5 % of glucose solution the type of metabolism depending on temperature is opposite to that of the TSB nutrient medium at the same sensitivity and measuring time. It is shown that metabolism of *E. coli* bacteria in 5 % of glucose solution at 30 °C, compared to the TSB nutrient medium at the same temperature, is associated with appreciably lower values of the differential temperature level in a measuring cell. However, the differential temperature levels in the measuring cell are commensurable quantities for the nutrient media used at a temperature of 37 °C.

Key words: calorimeter; microthermistors; differential thermograms; viability; bacterial population of *E. coli*.

Постановка задачи исследований и разработки

Экспрессная оценка жизнеспособности бактерий необходима при решении многих задач практической и экспериментальной микробиологии. Выявление низких уровней бактериального загрязнения сырьевых и конечных продуктов различных биотехнологических производств, определение эффективных режимов использования антимикробных препаратов, исследования в области создания новых химических соединений, обладающих антибактериальной активностью, – далеко не полный перечень такого рода задач.

Для оценки жизнеспособности микроорганизмов применяют как прямые, так и косвенные методы. Обобщенная классификация данных методов представлена на рис. 1 [1]. Прямые и косвенные методы, согласно классификации рис. 1, основаны на регистрации репродуктивной способности проявлений жизнедеятельности микроорганизмов.

Процесс выявления жизнеспособных микроорганизмов прямыми методами, которые базируются в основном на культивировании микроорганизмов с использованием питательных сред, занимает временной интервал от одних до нескольких суток. В микробиологии эти методы выступают в качестве «золотого стандарта» и в силу своей большой временной длительности не могут являться экспрессными.

Оценка жизнеспособности популяции микроорганизмов на основе косвенных методов развивается (см. рис. 1) преимущественно по двум направлениям: регистрации состояния клеточной мембраны и регистрации метаболической активности микроорганизмов.

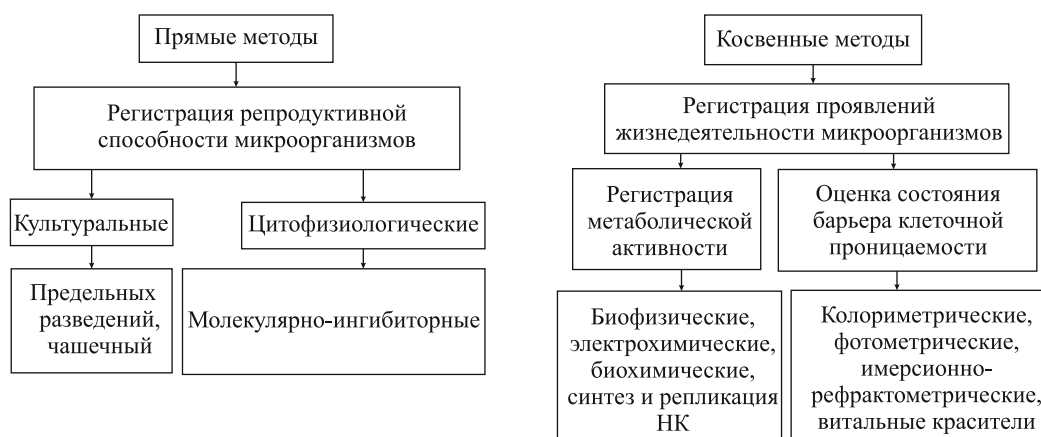


Рис. 1. Обобщенная классификация методов оценки жизнеспособности микроорганизмов

В бактериальной клетке маркерами жизнеспособности могут быть как структурные, так и функциональные элементы. В качестве таковых могут выступать целостность структуры мембраны, мембранная проходимость, активность мембранных белков и ферментов, функциональность рибосом и нуклеоида [2]. Для оценки состояния целостности клеточной мембраны микроорганизмов широкое применение нашли специальные витальные красители. Они основаны на низкомолекулярном (зеленый) и высокомолекулярном (красный) флюорохромах, обладающих специфической способностью проникать через мембраны живых и «мертвых» микроорганизмов соответственно. После одновременной инкубации бактерий в присутствии этих красок количество живых и «мертвых» микроорганизмов может быть соответственно оценено по интенсивности зеленой и красной флюоресценции [3].

Среди косвенных методов, основанных на регистрации метаболической активности микроорганизмов, метод микрокалориметрии широко используется в микробиологии для изучения популяций микроорганизмов. В биохимии данный метод нашел широкое применение для исследования термодинамики и кинетики биохимических реакций. Это обусловлено тем, что практически все биологические процессы сопровождаются экзо- и/или эндотермическими процессами, происходящими в основном в условиях, близких изотермическим. В их основе лежат сопряженные биохимические реакции клеточного или молекулярного уровней. Проявление жизнеспособности микроорганизмов является результатом текущих температурных изменений инокулята за счет сопряженных биохимических реакций, а уровни выделения (поглощения) тепла микроорганизмами в расчете на одну клетку имеют диапазон 10^{-10} – 10^{-14} Вт [4].

Для оценки проявления жизнеспособности микроорганизмов используют термограммы, характеризующие кинетические закономерности жизнедеятельности их популяций в культуре. Кинетические закономерности термограмм для различных видов микроорганизмов отличаются друг от друга, что дает основание использовать их для классификации и идентификации микроорганизмов. На особенности проявления данных закономерностей может влиять температура, состав питательной среды и различные внешние факторы (антибиотики, токсические вещества и др.), добавляемые в среду. Тепловые эффекты, отражаемые термограммами и вызванные выделением или поглощением тепла микроорганизмами, не всегда удается связать с конкретными процессами, являющимися результатом совокупности сопряженных биохимических реакций. Тем не менее такая информация может быть получена на основе анализа микрокалориметрических данных термограмм и их сопоставлением с данными теоретических расчетов теплот модулируемых биохимических реакций. При таком подходе удается установить тип обмена веществ (анаболизм, катаболизм), порядок и константы скоростей реакций, а также факторы, подавляющие метаболизм.

Следует отметить, что кинетические закономерности термограмм, отражающие поведение энергетических процессов жизнедеятельности микроорганизмов в начальный период лаг-фазы, предсказать достаточно трудно. Процессы жизнедеятельности микроорганизмов в данный период, как было рассмотрено выше, зависят от целого ряда факторов внутренней и внешней среды. Кроме того, они могут быть обусловлены и штаммоспецифическими особенностями состава и динамики образования продуктов метаболизма в питательных средах, используемых при культивировании микроорганизмов [5]. Поэтому при разработке метода экспрессной оценки жизнеспособности микроорганизмов должно быть обеспечено постоянство условий проведения эксперимента, при которых деформация регистрируемых термограмм незначительно зависит от влияния неконтролируемых факторов.

В настоящей работе на примере бактерий *E. coli* представлены результаты исследований по разработке микротеплодинамического метода экспрессной оценки жизнеспособности микроорганизмов в начальный период развития популяции (лаг-фаза), в котором учитываются вышеназванные требования.

Материалы и методы исследований

Для проведения исследований были использованы: суспензия живых (Ж) и убитых (У) бактерий *E. coli*, стандартная питательная среда – ТСБ, минимальная питательная среда – 5 % раствор глюкозы (Гл), 0,9 % раствор NaCl (физраствор – ФР) и фильтрат (Ф) бактериальной популяции. Суспензию бактериальной популяции *E. coli* готовили на физрастворе путем смыва суточной культуры, выращенной на скошенном агаре. Концентрацию бактерий *E. coli* в суспензии определяли на спектрофотометре серии РВ2201 («Солар ЛС», Республика Беларусь) по методу МакФарланда. Бактериальную суспензию до нужной концентрации разводили с использованием физраствора или глюкозы. Для того чтобы исключить влияние состава среды, исходную бактериальную суспензию вначале фильтровали, а затем выполняли соответствующие разведения фильтрата, которые используют для добавления в референтную ячейку при проведении концентрационных измерений. Для приготовления фильтрата бактериальной суспензии *E. coli* использовался микропористый фильтр (диаметр пор 200 нм) фирмы Corning (Германия). Суспензию убитых бактерий получали следующим образом. Разведение 10^4 КОЕ/мл объемом 300 мкл в закрытой крышечке пробирке выдерживали в течение 3 мин в колбе с водой, нагретой до температуры 80 °С. Аналогичной процедуре подвергали разведение фильтрата 10^4 КОЕ/мл.

Теплопродукцию популяции *E. coli* измеряли на лабораторном макете измерительно-информационной системы (ИИС), имеющей внутренний и суховоздушный внешний термостат. Все исследования проводили при температурах внешнего термостата 30 и 37 °С. Точность поддержания температуры внешнего термостата составляла $\pm 0,05$ °С. Корпус внутреннего термостата выполнен из дюралаля в виде полого цилиндра. В верхнюю крышку дюралевого цилиндра жестко и симметрично закреплены измерительный и референтный цилиндры из фторопласта, содержащие дно и верхние съемные крышки. Нижняя часть дюралевого цилиндра содержит внешнюю резьбу и закрывается крышкой из дюралаля путем завинчивания. Пустое пространство между внутренней стенкой дюралевого корпуса и внешними стенками жестко закрепленных фторопластовых цилиндров плотно заполнено маленькими кусочками меди, нарезанными из тонкой медной проволоки. Внутри измерительного и фторопластового цилиндров помещали сменные фторопластовые ячейки для исследуемых растворов. Верхние съемные крышки плотно закрывают верх сменных фторопластовых ячеек. В центре съемных крышек размещаются высокоомные микротерморезисторы типа МТ-54М, имеющие практически однотипные характеристики. Внутренний термостат помещен в корпус из пенопласта. Контроль выхода системы на заданный температурный режим измерения осуществляли с помощью референтного датчика внутреннего термостата. Мощность рассеяния каждого из микротерморезисторов составляла 500 нВт. Точность измерения изменений температуры не превышает $0,0008$ °С. Мощность рассеяния на единицу площади по результатам калибровки составляет $1,44 \cdot 10^{-7}$ Вт.

Результаты исследований и их обсуждение

Суть предлагаемого метода ускоренной оценки жизнеспособности микроорганизмов в начальный период развития их популяции (лаг-фаза) заключается в исключении влияния различных артефактов, которые по разным причинам могут завуалировать изменения температуры питательной среды в ячейке с инокулированными микроорганизмами. Практически решалась задача выделения изменения температуры в ячейке за счет сопряженных биохимических реакций, происходящих в популяции *E. coli* на клеточном и/или молекулярном уровнях и обусловленных процессами жизнедеятельности микроорганизмов, из всех изменений температуры за счет биохимических реакций, не имеющих отношения к присутствующим в ячейке микроорганизмам.

Для выполнения данной задачи изначально прописывают кинетические дифференциальные зависимости (термограммы) типа «среда – среда». При этом в измерительной и референтной ячейках измерительно-информационной системы проходят сопряженные биохимические реакции в отсутствие бактериальных клеток. После этого прописывают кинетические дифференциальные зависимости (термограммы) типа «среда – среда + бактериальная суспензия». В этом случае в референтной ячейке ИИС находится среда без микроорганизмов, а в измерительной ячейке – среда, в которой присутствуют микроорганизмы. Сравнивая полученные дифференциальные кинетические зависимости (термограммы), выделяют разностный информационный сигнал температуры, который фактически соответствует изменениям температуры, вызванным сопряженными биохимическими реакциями, обусловленными наличием в измерительной ячейке микроорганизмов.

При записи термистограмм типа «среда – среда» в измерительную и референтную ячейки вносили 300 мкл ТСБ + 100 мкл Ф – 300 мкл ТСБ + 100 мкл Ф для стандартной питательной среды и 300 мкл Гл + 100 мкл Ф – 300 мкл Гл + 100 мкл Ф для минимальной питательной среды.

В случае записи термограмм типа «среда – среда + *E. coli*» в референтную ячейку вносили 300 мкл ТСБ (Гл) + 100 мкл Ф из разведения 10^4 КОЕ/мл, а в измерительную ячейку вносили соответственно 300 мкл ТСБ (Гл) + 100 мкл бактериальной суспензии *E. coli* в концентрации 10^4 КОЕ/мл.

В качестве контроля прописывались также термограммы убитых бактерий *E. coli*. При этом процедура заполнения референтной и измерительной ячеек убитыми бактериями была аналогичной описанной выше. Определение реального количества жизнеспособных бактерий в 400 мкл измерительной ячейки проводилось с помощью количественного высева на агар.

На рис. 2 приведены результаты исследований, используемые для демонстрации принципа ускоренной оценки жизнеспособности бактерий *E. coli* в среде ТСБ при температуре 30 °С (см. рис. 2, а, б) и 37 °С (см. рис. 2, в, г).

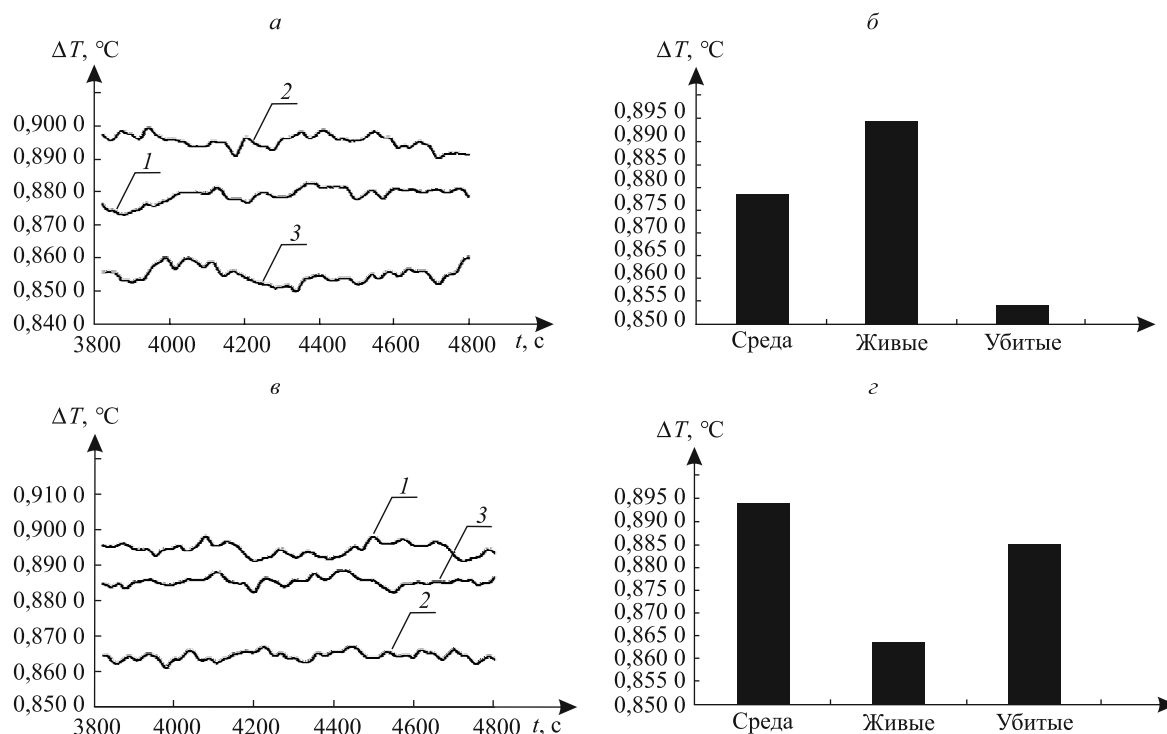


Рис. 2. Типичные дифференциальные термограммы и гистограммы для оценки жизнеспособности бактерий *E. coli* в стандартной среде ТСБ при температуре 30 °С (а, б) и 37 °С (в, г): а – 1 – ТСБФ – ТСБФ; 2 – ТСБФ – ТСБ + 743Ж *E. coli*; 3 – ТСБФ – ТСБ + 743У *E. coli* при $T = 30$ °С; в – 1 – ТСБФ – ТСБФ; 2 – ТСБФ – ТСБ + 1565Ж *E. coli*; 3 – ТСБФ – ТСБ + 1565У *E. coli* при $T = 37$ °С

Дифференциальные термограммы были прописаны в течение 80 мин. Для обработки термограмм методами статистического анализа был взят промежуток времени 1000 с в конце 80-минутного периода измерений. Из приведенных на рис. 2, а, в, дифференциальных термограмм видно, что имеется статистически достоверное ($n = 1000$, $\alpha = 95\%$) отличие значений уровня дифференциальной температуры для термограмм типа «среда – среда», «среда – среда + живые бактерии» и «среда – среда + убитые бактерии». При работе со средой ТСБ значения этих уровней были соответственно равны $0,8945 \pm 0,0050$ °С; $0,8643 \pm 0,0044$ °С и $0,8854 \pm 0,0047$ °С для 37 °С. Для среды ТСБ и 30 °С вышеназванные уровни значений соответственно составляют $0,8785 \pm 0,0058$ °С; $0,8948 \pm 0,0058$ °С и $0,8546 \pm 0,0063$ °С.

Для большей наглядности на рис. 2, б, г, представлены соответствующие термограммам гистограммы. Они приведены для случая, когда высев показал, что в 400 мкл измерительной ячейки при температуре 30 °С находилось 743Ж КОЕ *E. coli*, а в аналогичных условиях измерения при температуре 37 °С – 1565Ж КОЕ *E. coli*.

Из результатов исследований, представленных на рис. 2, можно видеть, что жизнеспособность бактерий в среде ТСБ проявляется в экзотермическом и эндотермическом характере метаболизма относительно контрольных измерений типа «среда – среда» при температурах 30 и 37 °С соответственно.

При этом для убитых бактерий относительно вышеназванного типа контрольных измерений биохимические реакции при температурах 30 и 37 °С имеют однопипный эндотермический характер.

Несомненно, что количество бактерий и температура в измерительной ячейке, при которой происходят измерения, оказывают влияние на «профиль» термограмм. Однако, как показали многократные однопипные измерения при температурах 30 и 37 °С, динамика изменений дифференциальных термограмм типа «среда – среда + живые бактерии» в «среда – среда + убитые бактерии» относительно контрольных измерений типа «среда – среда» остается неизменной и проявляется в вышеуказанном характере температурных изменений, свойственных среде ТСБ. Наличие живых бактерий *E. coli* в измерительной ячейке приводит к устойчивым и немалым отличиям в ней значений дифференциальной температуры от дифференциальной температуры контрольных измерений типа «среда – среда», что является доказательством их жизнеспособности.

Результаты аналогичных исследований, связанных с оценкой жизнеспособности бактерий *E. coli* в 5 % растворе глюкозы при температурах 30 и 37 °С, представлены на рис. 3.

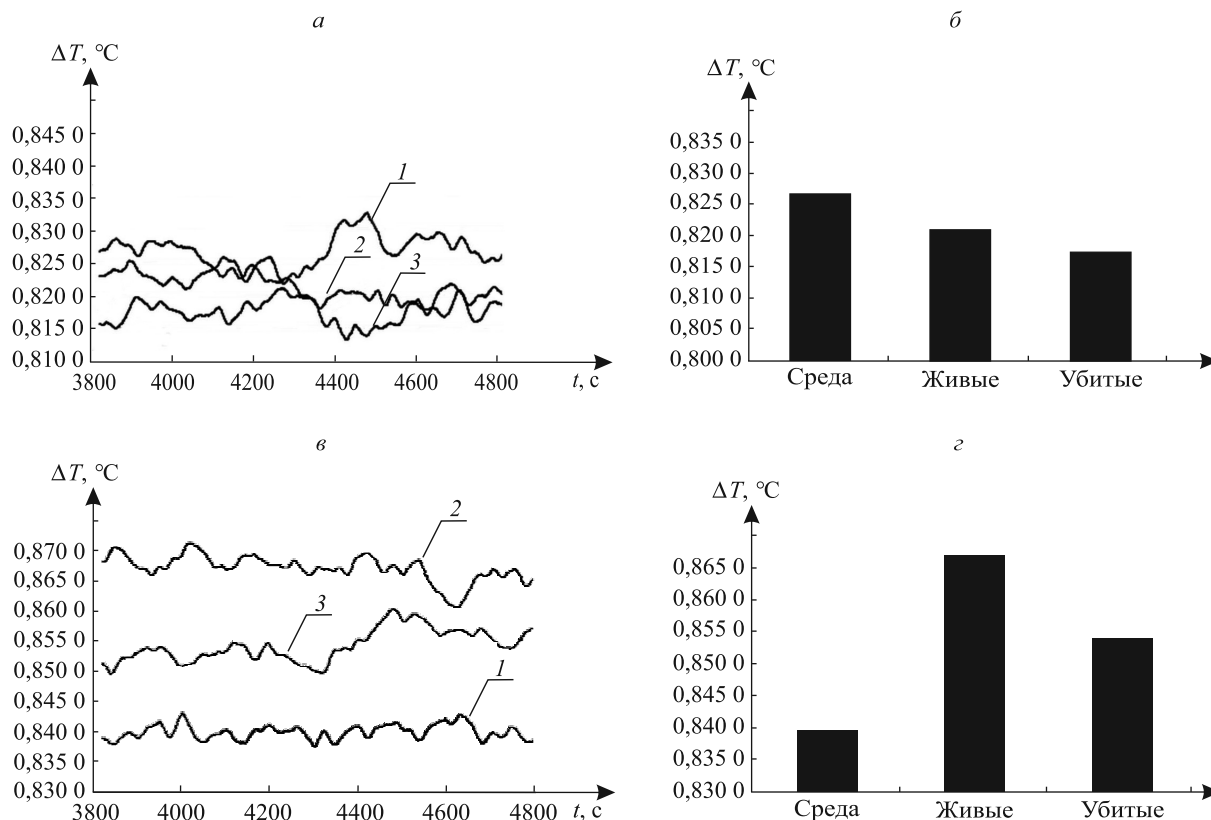


Рис. 3. Типичные дифференциальные термограммы и гистограммы для оценки жизнеспособности бактерий *E. coli* в 5 % растворе глюкозы при температуре 30 °С (а, б) и 37 °С (в, з): а – 1 – ГлФ – ГлФ; 2 – ГлФ – Гл + 1484Ж *E. coli*; 3 – ГлФ – Гл + 1484У *E. coli* при $T = 30$ °С; в – 1 – ГлФ – ГлФ; 2 – ГлФ – Гл + 1289Ж *E. coli*; 3 – ГлФ – Гл + 1289У *E. coli* при $T = 37$ °С

Для данной среды количественный высеv показал, что в 400 мкл измерительной ячейки при температуре 30 °С находилось 1484Ж КОЕ *E. coli*, а в аналогичных условиях измерения при температуре 37 °С – 1289Ж КОЕ *E. coli*. Сравнивая результаты исследований, приведенные на рис. 2 и 3, можно видеть, что в 5 % глюкозе отмечается обратный характер явлений относительно среды ТСБ. При той же чувствительности и продолжительности измерений экзотермический характер метаболизма для живых бактерий проявляется при 37 °С, а эндотермический – при 30 °С.

Кроме того, очевидно, что метаболизм бактерий в 5 % растворе глюкозы при температуре 30 °С, в отличие от среды ТСБ при данной температуре, проходит при значительно меньших значениях уровня дифференциальной температуры в измерительной ячейке. При температуре 37 °С значения уровня дифференциальной температуры в измерительной ячейке являются соизмеримыми величинами для используемых питательных сред (ТСБ и 5 % раствор глюкозы). Биохимические реакции убитых бактерий *E. coli* в 5 % растворе глюкозы относительно контрольных измерений типа «среда – среда» имеют эндотермический характер при температуре 30 °С и экзотермический – при 37 °С.

Таким образом, на примере бактерий *E. coli* показана эффективность метода регистрации дифференциальных термограмм с помощью микротерморезисторов для ускоренной оценки жизнеспособности интактной и инактивированной популяции используемой тест-культуры.

Установлено, что жизнеспособность бактерий в среде ТСБ при температуре 37 °С проявляется в эндотермическом характере метаболизма относительно контроля и экзотермическом – при температуре 30 °С. Метод позволяет оценить жизнеспособность бактерий в течение 80 мин при плотности популяции в пределах 10^3 КОЕ/мл.

Определено также, что в 5 % растворе глюкозы тип метаболизма в зависимости от температуры по отношению к питательной среде ТСБ является противоположным при той же чувствительности и продолжительности измерений.

Показано, что метаболизм бактерий в 5 % растворе глюкозы при температуре 30 °С, в отличие от среды ТСБ при данной температуре, проходит при значительно меньших показателях уровня дифференциальной температуры в измерительной ячейке, при этом они являются соизмеримыми величинами для используемых питательных сред при температуре 37 °С.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Biomedical Use of Isothermal Microcalorimeters / O. Braissant [et al.] // Sensors. 2010. Vol. 10. P. 9369–9383.
2. Shapiro H. M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques // J. Microbiol. Methods. 2000. Vol. 42. P. 3–16.
3. Double-staining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells / J. L. Alonso [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 5151–5154.
4. Кальве Э., Прат А. Микрокалориметрия. М., 1963.
5. Полевая У. В., Вахитов Т. Я., Яковлева Е. П. Штаммоспецифические особенности в составе и динамике карбоновых кислот при выращивании бактерий *ESHERICHIA COLI* и *SALMONELLA ENTERITIDIS* // Науч. журн. КубГАУ. 2012. № 77 (03). С. 1–15.

Поступила в редакцию 24.09.2014.

Александр Иванович Дραπεза – кандидат технических наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией биоаналитических систем кафедры биофизики физического факультета БГУ.

Надежда Викторовна Пleshko – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биоаналитических систем кафедры биофизики физического факультета БГУ.

Валерий Александрович Лобан – кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биоаналитических систем кафедры биофизики физического факультета БГУ.

Геннадий Алексеевич Скороход – кандидат медицинских наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией внутрибольничных инфекций научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета.

Елена Ивановна Гудкова – кандидат медицинских наук, руководитель научно-исследовательской части Белорусского государственного медицинского университета.

УДК 539.12

Е. В. ДЫДЫШКО, Х. Г. СУАРЕС, Н. М. ШУМЕЙКО

ЭЛЕКТРОСЛАБАЯ РАДИАЦИОННАЯ ПОПРАВКА ПОРЯДКА $O(\alpha)$ ДЛЯ ПРОЦЕССА ДРЕЛЛА – ЯНА С НЕЙТРАЛЬНЫМ ТОКОМ

Представлен аналитический расчет электрослабой радиационной поправки порядка $O(\alpha)$ к борновскому сечению процесса Дрелла – Яна при малых ($M = 50\text{--}350$ ГэВ) и больших ($M = 1\text{--}5$ ТэВ) значениях инвариантной массы лептонной пары M . Численный анализ проведен применительно к экспериментам на Большом адронном коллайдере. Результаты расчетов показывают, что поправка велика (~80 % для мюонной пары) в области $M = 50\text{--}95$ ГэВ и практически полностью определяется вкладом излучения в конечном состоянии (FSR). В области 120–160 ГэВ поправка мала (порядка 5 %), но все же больше экспериментальных неопределенностей на ЛHC. В области $M = 1\text{--}5$ ТэВ абсолютное значение поправки растет и достигает 30 % на верхней границе, что указывает на необходимость исследования вкладов более высокого порядка.

Ключевые слова: Дрелл – Ян; электрослабая радиационная поправка; ЛHC; инвариантная масса; нейтральный ток; лептонная пара.

The analytical calculations of the electroweak radiative corrections at $O(\alpha)$ to the Born level cross section of the Drell – Yan process for low ($M = 50\text{--}350$ GeV) and high ($M = 1\text{--}5$ TeV) values of the lepton pair invariant mass are presented. This numerical analysis was performed for the experimental conditions at LHC. As demonstrated by the calculations, the electroweak correction to the cross section is large (~80 % for the muon pair) in the region of $M = 50\text{--}95$ GeV and in fact is practically completely determined by a contribution from the final state radiation (FSR). For the region 120–160 GeV, the correction is small (about 5 %) but greater than the experimental uncertainties attained at LHC. In the region of $M = 1\text{--}5$ TeV the absolute value of the correction is growing and approaches 30 % at the upper limit, pointing to the necessity of further investigations of the higher order contributions.

Key words: Drell – Yan process; electroweak radiative correction; LHC; invariant mass; neutral current; lepton pair.