

ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЕДАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ

¹Скороход Г.А., Паркун М.В., Лобан В.А., Судник Ю.М.,
Драпеза А.И., ¹Гудкова Е.И.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
*¹Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Беларусь*

Среди косвенных методов регистрации проявлений жизнедеятельности микроорганизмов одним из наиболее перспективных представляется импедансная спектроскопия. Это связано с тем, что импеданс, электропроводность, емкость, электрическое сопротивление культуральных сред, инокулированных микроорганизмами, определяются параметрами клеток и ингредиентами питательной среды и хорошо коррелируют с изменениями в их составе, которые происходят как в процессе жизнедеятельности интактных микроорганизмов, так и при воздействии на них различного рода инактивирующих факторов. Высокая чувствительность, простота совмещения с регистрирующими приборами и системами обработки информационного сигнала, возможность построения многоканальных систем измерения, удобство эксплуатации и сравнительно низкая стоимость делают метод импедансной спектроскопии незаменимым при разработке автоматизированных систем, предназначенных для оценки инактивирующих воздействий на микроорганизмы [1,2].

Настоящая работа посвящена изучению возможностей метода импедансной спектроскопии при определении эффективности действия дезинфицирующих препаратов.

Исследования проводили на разработанном нами аппаратно-программном комплексе. В работе использованы тест-культуры *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*; растворы дезинфектантов полидеза и инкрасепта; питательные среды – триптиказасоевый бульон (ТСБ), триптиказасоевый 0,5 % агар (ТСА). Измерение параметров импеданса (активная и реактивная составляющие) жидких и плотных питательных сред при культивировании микроорганизмов проводили во фторопластовых ячейках объемом 1,5 мл или 0,08 мл при температуре $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Обе составляющие импеданса регистрировались одновременно в диапазоне частот 32,1 - 387,0 кГц в течение времени культивирования микроорганизмов. Показатели жизнедеятельности бактерий после воздействия дезинфектантов оценивали после их внесения в количестве

10^8 КОЕ/мл в рабочие концентрации препарата, либо в меньшие концентрации с последующей регламентированной экспозицией в нём. Из дезинфектанта взвесь бактерий переносили в раствор с универсальным нейтрализатором с последующей получасовой экспозицией. Далее бактерии переносили в среду ТСБ, которую вносили в измерительные ячейки с жидкой или плотной питательной средой с последующей регистрацией динамики изменения активной и реактивной составляющей импеданса. Полученные базы данных обрабатывали с помощью программ Excel 2007 и Grapher.

Анализ полученных результатов исследований выявил целый ряд информационных параметров, отражающих изменения, которые происходят в среде культивирования в процессе жизнедеятельности бактериальной популяции. В результате обработки такой базы данных может быть составлен фазовый портрет физиологического состояния бактериальной популяции от времени в пространстве предложенных параметров.

Для выявления наличия жизнеспособных микроорганизмов был использован такой параметр, как время детекции ($t_{дет}$), который отражает начало роста активной или реактивной составляющих импеданса жидкой или плотной питательной среды, инокулированной микроорганизмами. С использованием показателя $t_{дет}$ выявлено присутствие жизнеспособных микроорганизмов *E.coli* при исходной посевной дозе $3,0 \lg$ КОЕ/мл в среде ТСБ через 6 часов, на агаре – в пределах 8 часов. Показано также, что время детекции *S.aureus* для посевной дозы $3,0 \lg$ КОЕ/мл составило в среде ТСБ, по реактивной составляющей импеданса, а на агаре, по активной составляющей, около 15 часов.

В результате исследований установлено, что в случае использования рабочей концентрации дезинфектантов динамика изменений параметров импеданса среды в течение 300 минут наблюдения отсутствовала, в то время как в контрольных образцах наблюдалось существенное увеличение параметров импеданса. Показано, что при использовании субцидных концентраций дезинфектантов, вплоть до 0,05 от рабочей, динамика изменений параметров импеданса среды также отсутствует. Данная картина может свидетельствовать о гибели бактерий после воздействия дезинфектанта во всех исследованных концентрациях. Подтверждением этому предположению явились культуральные высевы бактерий из измерительных ячеек, которые оказались «стерильными».

Однако при высевах из ячеек с концентрациями полидеза 0,07 и 0,05 от рабочей, был отмечен незначительный рост бактерий в количестве менее 10^2 КОЕ/мл. Отмечено, что активная составляющая импеданса не

позволила зарегистрировать изменения в электрическом сопротивлении ТСБ, в связи с отсутствием сквозного переноса свободных зарядов при данном количестве бактерий. Анализ образования связанных зарядов, проведенный по реактивной составляющей импеданса в характеристической точке (101,3 кГц) фазо-частотного спектра, показал, что на данной частоте через 220 минут наблюдается увеличение количества связанных зарядов в ячейках с концентрацией полидеза 0,07 и 0,05 от рабочей.

Полученные результаты показывают, что при использовании универсальных питательных сред, таких как ТСБ, и традиционной процедуры оценки эффективности дезинфектантов с применением нейтрализатора, метод импедансной спектроскопии позволяет получить ответ не ранее чем через 6 часов с момента начала эксперимента.

Исключив стадию обработки нейтрализатором и измеряя параметры импеданса при внесении дезинфектанта в среду ТСБ, инокулированную микробами, не удалось сократить время получения ответа.

Значительно сократить время определения степени эффективности дезинфектанта удалось при использовании низкопроводящей питательной среды. Например, для *E.coli* и дезинфектанта полидеза в 5% растворе глюкозы на дистиллированной воде, ответ был получен через 40 минут. Как показали контрольные посева, гибель микроорганизмов наступала уже через 10 секунд после контакта с дезинфектантом в рабочей концентрации. Результаты с использованием низкопроводящих сред хорошо согласуются с результатами измерения низкой концентрации бактерий, полученными в работе [3].

Таким образом, на основе метода импедансной спектроскопии могут быть созданы методики экспрессной оценки эффективности дезинфектантов.

Литература

1. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы диагностики живых клеток по их метаболической активности// Методы определения жизнеспособности микроорганизмов/Под ред.В.К.Ерошина.-Пушино:ОНТИ НЦИ АН СССР.-1990.-С.53-76.
2. Felice C., Valentinuzzi M., Vercellone M., Madrid R. Impedance bacteriometry: medium and interface contributions during bacterial growth // IEEE BME.- 1992.-Vol. 39, № 12.-P.1310-1313.
3. Sengupta S., Battigelli D.A., Chang H.C. A micro-scale multifrequency reactance measurement technique to detect bacterial growth at low bio-particle concentrations // Lab. Chip.- 2006.-Vol.6.-P.682- 692.