

УДК 544.165, 504, 577

КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОЕ БИОТЕСТИРОВАНИЕ В ПРИМЕНЕНИИ К ОЦЕНКЕ ПРО- И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ КАТОЛИТОВ И АНОЛИТОВ

В.С. Сибирцев^а, А.Ю. Кулаков^а, С.А. Строев^б

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

^б Университет Тампере, Тампере, 33014, Финляндия

Адрес для переписки: vs1969r@mail.ru

Информация о статье

Поступила в редакцию 11.03.16, принята к печати 12.04.16

doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-3-573-576

Язык статьи – русский

Ссылка для цитирования: 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

Аннотация

Представлена методика применения кондуктометрического биотестирования к анализу про- и антибактериальной активности растворов катоцита и анолита. При этом тестируемые препараты были получены в результате электролитической обработки в течение 25 минут при силе тока 7 А и напряжении 28 В 1% водных растворов NaCl (в прикатодном пространстве) и Na₂SO₄ (в прианодном пространстве). Методика исследования этих препаратов была основана на анализе динамики изменения импедансной электропроводности исследуемых образцов, обусловленной процессами метаболизма, осуществляемыми тестовыми микроорганизмами в анализируемых образцах. Применение такой методики позволило показать, что свежеприготовленный раствор анолита, начиная с концентрации 1 об.%, оказывает бактериостатическое действие на жидкую питательную среду с кишечной палочкой (*Escherichia coli*) в количестве 10⁴ живых клеток на 1 мл, а при концентрации раствора анолита больше 5 об.% его действие на те же микроорганизмы становится бактерицидным. В то же время свежеприготовленный раствор катоцита, уже начиная с концентрации 5 об.%, активирует жизнедеятельность микроорганизмов. Таким образом, продемонстрировано, что кондуктометрическое биотестирование является чувствительным лабораторным инструментом, предоставляющим исследователю доступный, удобный и информативный способ оценки свойств различных антисептических и пробиотических средств, а также иных физико-химических систем (в том числе и весьма сложных по своему составу и динамике его изменения), способных оказывать влияние на жизнедеятельность микроорганизмов.

Ключевые слова

биотестирование, кондуктометрия, антисептические свойства, катоциты и анолиты, про- и антибактериальная активность

CONDUCTOMETRY BIOTESTING AS APPLIED TO VALUATION OF THE PRO- AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF CATOLITES AND ANOLITES

V.S. Sibirtsev^а, A.Yu. Kulakov^а, S.A. Stroev^б

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

^б University of Tampere, Tampere, 33014, Finland

Corresponding author: vs1969r@mail.ru

Article info

Received 11.03.16, accepted 12.04.16

doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-3-573-576

Article in Russian

For citation: Sibirtsev V.S., Kulakov A.Yu., Stroev 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. doi: 10.17586/2226-1494-2016-16-3-573-576

Abstract

The paper deals with technique of the electrical conductivity biotesting as applied to the analysis of pro- and antibacterial activity of catolit and anolit solutions. The tested preparations were received by 25 minute electrolysis processing of 1% NaCl water solution (in cathode space) and 1% Na₂SO₄ water solution (in anode space) at 7 A amperage and 28 V voltage. The submitted technique is based on the analysis of change dynamics of impedance electrical conductivity of researched samples, caused by metabolic processes, realized by tested microorganisms in analyzed samples. Application of this

technique enabled to show that makeup anolite solution, beginning from concentration equal to 1 vol. %, has a bacteriostatic effect on liquid culture medium with *Escherichia coli* in the quantity of 10^4 live cells on 1 ml. At anolite solution concentration more than 5 vol.% its action on the same microorganismes becomes bactericidal. At the same time, makeup catolite solution activates microorganismes vital activity as early as from concentration equal to 5 vol.%. Thus, it is shown, that electrical conductivity biotesting is a sensitive laboratory tool, granting accessible, convenient and informative way to a researcher for valuation of properties of various pro- and anti-infective preparations, as well as the other physico-chemical systems (including rather complex concerning structure and dynamics of its change), capable to act on microorganismes vital activity.

Keywords

biotesting, conductivity measurement, antiseptic properties, catolites and anolites, pro- and antibacterial activity

В последнее время, в связи со всё большими объемами производства и потребления различной пищевой, кормовой, фармакологической и иной биотехнологической продукции, все более актуальной становится проблема быстрого выявления всех возможных позитивных и негативных свойств новых, а также генетически или иным способом модифицированных пищевых продуктов, биологически активных веществ, лекарственных и иных препаратов.

Наиболее приемлемым в настоящее время признано использование для этих целей тестовых биосистем. При этом в качестве последних, могут быть применены как одноклеточные, так и более высокоорганизованные организмы (планктон, грибы, растения, рыбы, птицы, крысы и другие млекопитающие) [1–7]. Но, хотя использование для целей биотестирования многоклеточных организмов позволяет более адекватно моделировать с их помощью человеческий организм, это 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 микроорганизмов.

Однако принятые в настоящее время в качестве стандартных при биотестировании процедуры оценки общей выживаемости микроорганизмов (закрывающиеся, в большинстве случаев, в оценке того, насколько ингибируется или активируется, по сравнению с контролем, рост колоний тестовых микроорганизмов на плотной агаризованной питательной среде (ПС) после инкубации их в течение одних или нескольких суток в стерильных условиях при заданной температуре в присутствии исследуемого вещества) требуют для своего проведения все же достаточно значительных затрат материалов, времени и труда квалифицированного персонала – давая, в результате, лишь довольно субъективную (вследствие необходимости применения ручного труда, плохо поддающегося стандартизации) и «статическую» информацию о летальных нарушениях в жизнедеятельности тестовых организмов [8–10].

В связи с этим перспективным представляется использование для данных целей кондуктометрических технологий, позволяющих в реальном времени следить за изменением жизненной активности тестовых организмов по изменению импедансной электропроводности ПС, в которой эти организмы развиваются. Одним из наиболее совершенных устройств, реализующих в настоящее время эти технологии, является микробиологический анализатор «Rabit», выпускаемый фирмой «Don Whitley Scientific Limited» (Великобритания), применение которого в качестве возможной альтернативы стандартному культуральному методу определения микробиологической обсемененности образцов прописано, в частности, в ГОСТ Р 54354-2011¹, а также было подробно описано нами в работе [11]. Этот прибор позволяет автоматически в реальном режиме времени в течение нескольких суток измерять электропроводность одновременно до нескольких сотен независимых образцов объемом от 2 до 10 мл, инкубируемых в стерильных условиях при постоянной температуре в диапазоне от +10 до +50 °С.

Ранее, в работе [11], нами были показаны возможности применения данного анализатора к анализу динамики развития различных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*) в присутствии различных количеств однокомпонентных химических препаратов (таких как хлоргексидин биглюконат и фермент трансглутаминаза).

В настоящей работе с помощью биоанализатора «Rabit» исследовано влияние на жизнедеятельную активность кишечной палочки (*E.coli*) таких многокомпонентных смесей различных биологически активных агентов (ионы, радикалы, иные неустойчивые химически активные формы, образующиеся в процессе электролиза), как свежеприготовленные растворы католита и анолита (сложные не только по своему исходному физико-химическому составу, но и по временной динамике его изменения). При этом *E.coli* (факультативно-анаэробные бактерии, составляющие основную часть микрофлоры человека) широко используются в настоящее время во всем мире в качестве тестового и санитарно-показательного микроорганизма. Растворы католита и анолита получались 25 минутной обработкой 1% водных растворов NaCl (в прикатодном пространстве) и Na₂SO₄ (в прианодном пространстве) при силе тока 7 А и напряжении 28 В

¹ ГОСТ Р 54354-2011. Мясо и мясные продукты. Общие требования и методы микробиологического анализа. М.: Стандартинформ, 2013. 84 с.

на электролизере специальной конструкции. Последний представлял собой параллелепипед из оргстекла, разделенный пополам полимерной ион-селективной перегородкой (допускающей ионную электропроводность, но не позволяющей количественно смешиваться приэлектродным растворам), с электродами, выполненными в виде металлических пластин (анод – платина, катод – из нержавеющей сталь), целиком занимающих две длинные стороны электролизера.

Перед проведением анализа в каждую из 28 измерительных ячеек анализатора заливалось по 2 мл жидкой общенакопительной ПС с рН $7,2 \pm 0,2$ (приготавливавшейся путем растворения в 100 мл дистиллированной воды 0,5 г сухой х.ч. глюкозы, 1,8 г белкового гидролизата и 0,2 г NaCl). Затем все ячейки закрывались ватно-марлевыми пробками, стерилизовались автоклавированием при температуре 121°C в течение 20 минут и остужались до комнатной температуры. Далее, во все ячейки, кроме первых четырех, стерильно добавлялось по 0,2 мл суспензии, содержащей 10^5 клеток *E.coli* на 1 мл воды; а также либо по 0,02 мл анолита в ячейки с 8-й по 12-ю, либо по 0,1 мл анолита в ячейки с 13-й по 16-ю; либо по 0,1 мл католита в ячейки с 17-й по 20-ю; либо по 0,2 мл католита в ячейки с 21-й по 24-ю; либо по 0,5 мл католита в ячейки с 25-й по 28-ю. После чего все ячейки помещались в измерительный модуль анализатора «Rabit» и инкубировались там при температуре 37°C в течение 2,5 суток. При этом каждые 6 минут отдельно в каждой из ячеек автоматически регистрировалась величина полной проводимости средой переменного гармонического электрического тока.

Результаты проведенного исследования показаны на рисунке.

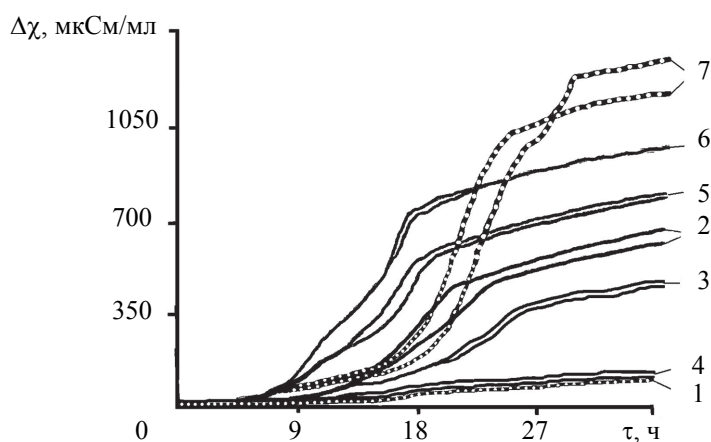


Рисунок. Результаты исследования влияния на рост *E.coli* растворов католита (Kt) и анолита (At) с помощью микробиологического кондуктометрического анализатора «Rabit». По оси абсцисс отложено время от начала измерений; по оси ординат – изменение удельной импедансной электропроводности среды относительно ее исходного значения при $\tau = 0$. Кривыми показаны максимальные и минимальные значения, полученные для «стерильной» питательной среды (1), а также *E.coli* в питательной среде без An и Kt (2); с 1 об.% An (3); с 5 об.% An (4); с 5 об.% Kt (5); с 10 об.% Kt (6) и с 25 об.% Kt (7)

Отсюда видно, что свежеприготовленный раствор анолита уже в концентрации 1 об.% оказывал бактериостатическое, а в концентрации 5 об.% бактерицидное действие на жидкую ПС с *E.coli* в количестве 10^4 живых клеток на 1 мл (за счет ионных, радикальных и иных неустойчивых химически-активных форм, образующихся в процессе электролиза). В то же время свежеприготовленный раствор католита, уже начиная с концентрации 5 об.%, активировал жизнедеятельность тестовых микроорганизмов, причем не только увеличивая интенсивность экспоненциальной фазы роста *E.coli* (когда идет наиболее активное размножение микроорганизмов в анализируемом образце); но и сокращая продолжительность начальной (лаг-) фазы (когда идет адаптация микроорганизмов к новым для них условиям существования) и время наступления стационарной фазы роста (когда количество микроорганизмов в образце остается постоянным) – при концентрациях католита до 10 об.%, включительно. С другой стороны, при больших концентрациях католита продолжительность лаг-фазы роста *E.coli* оставалась той же, что и в отсутствие католита, тогда как время наступления стационарной фазы роста, наоборот, увеличивалось.

Таким образом, мы видим, что даже достаточно простая электролизная обработка общедоступных неорганических солей может быть использована для приготовления дешевых и эффективных средств (как антисептических, так и пробиотических), пригодных для массового применения. Кондуктометрическое биотестирование является удобным и информативным способом оценки свойств таких средств, а также иных физико-химических систем, способных оказывать влияние на жизнедеятельность микроорганизмов – в том числе не только однокомпонентных, но и весьма сложных по своему составу и динамике его изменения.

Литература

1. Zvarich V.I., Stasevich M.V., Stan'ko O.V., Komarovskaya-Porokhnyavets E.Z., Poroikov V.V., Rudik A.V., Lagunin A.A., Vovk M.V., Novikov V.P. Computerized prediction, synthesis, and antimicrobial activity of new amino-acid derivatives of 2-chloro-n-(9,10-dioxo-9,10-dihydro-anthracen-1-yl) acetamide // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. V. 48. N 9. P. 582–586. doi: 10.1007/s11094-014-1154-z
2. Surikova O.V., Mikhailovskii A.G., Odegova T.F. Synthesis and antimicrobial and antifungal activities of 3-substituted 1-cyanomethyl-3,4-dihydroisoquinolinium chlorides // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. V. 48. N 11. P. 711–713. doi: 10.1007/s11094-015-1178-z
3. 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
4. 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
5. 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
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. 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
8. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: МИА, 2005. 743 с.
9. Продукты пищевые, консервы. Методы микробиологического анализа: Сборник ГОСТов. М.: Стандартинформ, 2010. 463 с.
10. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
11. 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

- | | |
|--|--|
| Сибирцев Владимир Станиславович | – кандидат химических наук, доцент, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, vs1969r@mail.ru |
| Кулаков Антон Юрьевич | – студент, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Российская Федерация, anton_kulakov.14@mail.ru |
| Строев Сергей Александрович | – PhD, научный сотрудник, Университет Тампере, Тампере, 33014, Финляндия, s_stroev@hotmail.com |
| Vladimir S. Sibirtsev | – PhD, Associate professor, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, vs1969r@mail.ru |
| Anton Yu. Kulakov | – student, ITMO University, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation, anton_kulakov.14@mail.ru |
| Sergey A. Stroev | – PhD, scientific researcher, University of Tampere, Tampere, 33014, Finland, s_stroev@hotmail.com |