

## **РАЗРАБОТКА СЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТЕПЛОПРОДУКЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ**

*Драпеза А. И.<sup>1</sup>, Паркун М. В.<sup>1</sup>, Лобан В. А.<sup>1</sup>, Судник Ю. М.<sup>1</sup>,  
Скороход Г.А.<sup>2</sup>, Гудкова Е.И.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Белорусский государственный университет*

*<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет*

Экспрессная оценка физиологического состояния микробной популяции с позиций жизнеспособности является одной из самых актуальных проблем современной экспериментальной и практической микробиологии, имеющей отношение к объективной оценке микробной контаминации различных сред и эффективности противомикробных агентов.

Любое проявление жизнедеятельности микроорганизмов, как известно, является результатом сопряженных биохимических реакций, сопровождающихся поглощением или выделением энергии [1]. Одними из наиболее чувствительных и тонких методов регистрации прижизненных характеристик энергетического состояния микробной популяции являются методы микрокалориметрии. Анализ известных типов микрокалориметров и используемых принципов выделения информационных сигналов показывает, что информационные технологии, применяемые в них, являются достаточно громоздкими, трудоемкими и неудобными для экспрессных измерений [3,4].

**Цель исследования:** разработка сенсорной системы для экспрессной оценки теплопродукции популяций микроорганизмов на основе микротерморезисторов.

Обобщенная структурная схема разработанной сенсорной системы показана на рисунке 1.

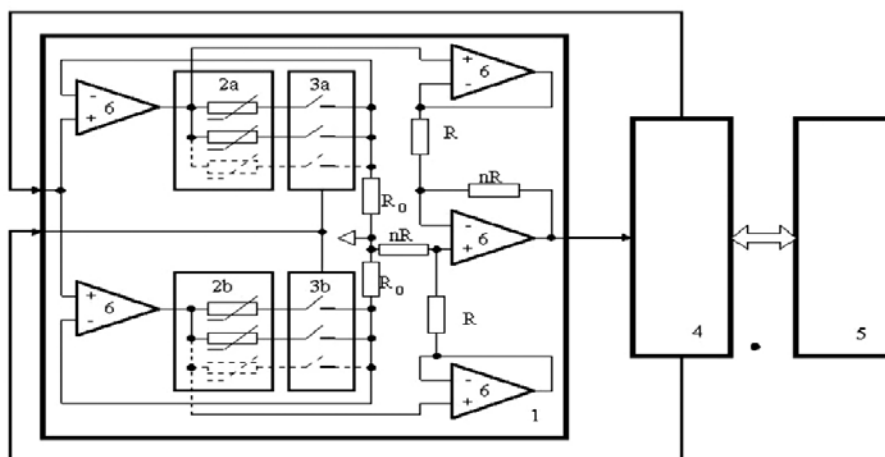


Рисунок 1. Обобщенная структурная схема разработанной сенсорной системы для измерения теплопродукции бактерий

В качестве измерительных (2a) и референтных (2b) сенсорных элементов использовали бусиновые полупроводниковые микротерморезисторы типа МТ-54М. Микротерморезисторы данного типа обладают отрицательным температурным коэффициентом сопротивления (ТКС) и имеют малые значения коэффициента рассеяния мощности (КРМ). Помимо этого они обладают высокой стабильностью, чувствительностью, малой инерционностью в жидкой среде и биологической инертностью, поскольку остеклованы.

В разработанной сенсорной системе реализуется дифференциальный принцип многоканальной изотермической микрокалориметрии. Измерение информационного микрокалориметрического сигнала обеспечивается аналогово-цифровыми преобразованиями, для реализации которых используются высокоточные и высокочувствительные схемы операционных усилителей 6, мультиплексоры (3a, 3b) а также схемы программируемого микроконтроллера 4.

Управление режимами получения информации, ее выделения и обработки обеспечивается с помощью компьютера 5 в соответствии с разработанными для данного типа сенсорной системы программами. Поддержание заданного значения температуры в микрокалориметрических ячейках на уровне приблизительно  $\pm 0,005$  °С обеспечивается с помощью суховоздушного термостата 1 (точность поддержания  $\pm 0,05$  °С), в который помещают дюралевый сосуд, заполненный жидкостью для увеличения теплоемкости, в котором размещены измерительные и референтные фторопластовые ячейки. Объемы камер измерительной и референтных ячеек составляют 800 мкл.

Для оценки чувствительности и тепловой постоянной разработанной сенсорной системы в измерительную и референтную микрокалориметрические ячейки добавляли по 400 мкл воды при температуре 37,0 °С и оставляли на 3 часа в режиме поддержания данного уровня. Оценка чувствительности и тепловой постоянной измерительной ячейки проводили с помощью резистора типа СМД номиналом 99,7 Ом, который помещали в измерительную ячейку. После подачи на него напряжения 8,7 В в течение заданного времени была записана зависимость изменения температуры в измерительной ячейке до достижения исходной базовой линии, которая показана на рисунке 2. По полученной зависимости была определена тепловая постоянная ячейки, которая, как видно из представленной кривой, составляет более 10 минут. Расчеты и анализ калибровочной кривой показывают, что разработанная сенсорная система позволяет контролировать изменение температуры, при вышеуказанных уровнях ее термостабилизации, не хуже, чем 0,0005 °С/дел.

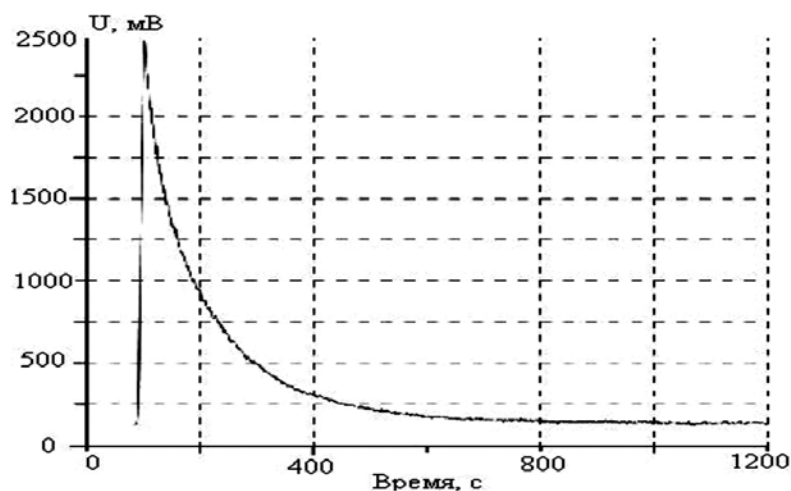
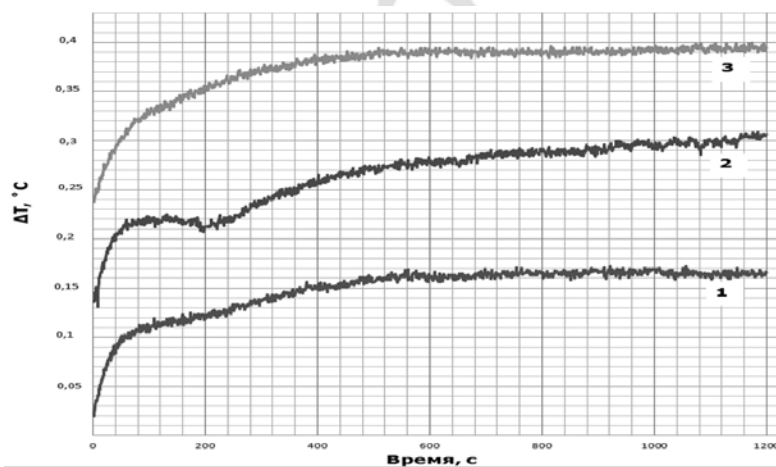


Рисунок 2. Изменение дифференциальной температуры от времени в зависимости от приложенной тепловой мощности к измерительной ячейке

С использованием программы Grafer была вычислена площадь под кривой рисунка 2 и определено количество тепла, приходящееся на единицу площади, которое составило 0,000038 Дж. Данное значение использовалось в дальнейшем при расчетах теплопродукции микроорганизмов.

Разработанная сенсорная система была опробована для изучения теплопродукции бактерий *E.coli*. Результаты исследований приведены на рисунке 3.



1- $10^3$  КОЕ/мл; 2- $10^6$  КОЕ/мл; 3- $10^5$  КОЕ/мл

Рисунок 3. Типичные временные зависимости термохарактеристик для различного количества бактерий *E.coli* в измерительной ячейке

Термохарактеристики получены при добавлении в обе камеры ячейки среды ТСБ в объеме 360 мкл при температуре 37,0 °С, с последующим добавлением 40 мкл инокулированного физиологического раствора и 40 мкл физиологического раствора, в измерительную и референтную ячейки соответственно.

Интервал времени оценки тепловыделения составил 40 минут. Начало измерений выполняли спустя 20 минут от момента инокуляции бактерий — после выхода показателей на стационарное плато.

Для расчета теплопродукции бактериальных клеток в ТСБ при различной посевной дозе были использованы калибровочные значения, полученные выше. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Теплопродукция клеток *E.coli* в среде ТСБ при различной посевной дозе

Концентрация <i>E.coli</i>	10 <sup>4</sup> КОЕ/мл	10 <sup>6</sup> КОЕ/мл
Суммарная теплопродукция, Дж	0,052	0,17
Удельная теплопродукция (на клетку), Вт	2,2×10 <sup>-9</sup>	7,1×10 <sup>-11</sup>

Как видно из таблицы 1, суммарная теплопродукция, выраженная в Дж, для популяции 10<sup>4</sup> КОЕ/мл составила 0,052, а для популяции 10<sup>6</sup> КОЕ/мл — 0,17, т.е. всего в 3 раза больше, хотя разница в количестве клеток составляет 2 lg. Удельная теплопродукция клеток *E.coli* при условии, что они в одинаковой степени продуцируют тепло, для плотности популяции 10<sup>4</sup> КОЕ/мл составила 2,2 × 10<sup>-9</sup> Вт, 10<sup>6</sup> КОЕ/мл — 7,1 × 10<sup>-11</sup> Вт.

**Результаты и их обсуждение.** Из полученных результатов следует, что 1) при увеличении плотности популяции удельная теплопродукция клеток в ней снижается, 2) по суммарной теплопродукции можно определить плотность популяции бактерий. Однако такие исследования должны быть строго стандартизованы (среда, популяция, условия культивирования и пр.).

Разработанная сенсорная система позволяет проводить оценку жизнеспособности популяции микроорганизмов практически в реальном времени вплоть до 10<sup>3</sup> КОЕ/мл и может быть использована при разработке методик, связанных с оценкой эффективности противомикробных агентов.

## THE DEVELOPMENT OF THE SENSOR SYSTEM FOR ESTIMATION THE HEAT GENERATION OF MICROORGANISMS POPULATIONS

*A.I. Drapeza, M.V. Parkun, V.A. Loban, Yr. M. Sudnik, G.A. Skorohod, E.I. Gudkova*

It is shown the engineered sensor system allows to register of the heat generation 10<sup>3</sup> CFU/ml intact population *E.coli* in real time (near 40 minutes) and can be used in the developments of a evaluation procedures of the disinfectant effect efficiency for the microbial population.

### Литература.

1. Кирьянов К.В. Калориметрические методы исследования. Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Современные методы исследования новых материалов электроники и оптоэлектроники для информационно телекоммуникационных систем». Нижний Новгород, 2007, 76 с.
2. Кальве Э., Праг А. Микроорганизмы и культуры тканей // Микрокалориметрия: Пер. с франц.-М., 1963.-С.323-333.
3. Monk P.R. Microbiology calorimetry as an analytical method // Process Biochem.- 1978.-Vol.13. -№12.-P.4-5.