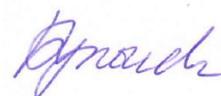


На правах рукописи



Булычева Елизавета Владимировна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИЙ В
ПРИРОДНЫХ ВОДАХ МЕТОДОМ ФЛУОРИМЕТРИИ**

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2015

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, доцент
Короткова Елена Ивановна

Официальные оппоненты: Власова Ирина Васильевна
доктор химических наук, доцент, Омский
государственный университет им.
Ф.М. Достоевского, кафедра
аналитической химии, профессор

Гавриленко Наталия Айратовна
кандидат химических наук, доцент,
Национальный исследовательский
Томский государственный университет,
кафедра аналитической химии, доцент

Ведущая организация: Сибирский федеральный университет,
г. Красноярск

Защита состоится «23» декабря 2015 г. в 14.30 на заседании диссертационного совета Д.212.269.04 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск пр. Ленина, 43а, 2-й корпус ТПУ, Малая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно–технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 55 и на сайте <http://portal.tpu.ru/council/911/worklist>.

Автореферат разослан «2» ноября 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета Д.212.269.04



Т. М. Гиндуллина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

На сегодняшний день, по данным Всемирной Организации Здравоохранения, почти три миллиарда жителей нашей планеты употребляют некачественную воду. По статистике от употребления грязной воды, в мире ежегодно умирает 18 миллионов взрослых и 4 миллиона детей. Особенно важна проблема бактериальной загрязненности природных вод. Создание чувствительных, экспрессных, точных и простых методов определения общего содержания бактерий в природных водах является актуальной задачей химиков - аналитиков всего мира.

Традиционными методами определения содержания патогенных микроорганизмов являются чашечный метод Коха и метод прямого подсчета клеток под микроскопом (ГОСТ 18963-73 Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа). Однако эти методы занимают много времени, трудоемки и обладают низкой чувствительностью.

В последнее время широко распространены инструментальные методы определения общего содержания бактерий в водах. Например, метод нефелометрии. В его основе лежит измерение ослабления светового пучка при его прохождении через клеточную суспензию. Данный метод обладает рядом недостатков: концентрация клеток должна быть не высокой, иначе будет происходить вторичное рассеяние света клетками, что искажает результат определения; питательная среда для культивирования микроорганизмов должна быть оптически прозрачной; метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых сопровождается равномерным помутнением среды. Другим примером может быть определение количества клеток с использованием метода проточной цитометрии. В основе метода лежит принцип регистрации светового или электрического сигнала при прохождении частицы по капилляру. Недостатками данного метода является

высокая цена оборудования и необходимость использования дорогостоящих флуоресцентных красителей для уменьшения мешающего влияния содержащихся в пробе частиц различных примесей.

Метод флуориметрии обладает неоспоримыми преимуществами по сравнению с традиционными методами:

- 1.Сверхвысокая чувствительность (использование современной инструментальной базы позволяет идентифицировать и анализировать отдельные молекулы)
- 2.Мультиплексность детекции (возможность наблюдения за несколькими объектами одновременно при условии несовпадения между собой спектров эмиссии этих объектов)
- 3.Совместимость с живыми организмами (свет видимого спектра не поглощается водой, биологическими макромолекулами и другими компонентами живых клеток и не влияет на процессы, происходящие в клетке)
- 4.Экспрессность (процесс флуоресценции происходит за наносекунды, что позволяет сократить время анализа)

Все эти преимущества позволяют использовать метод флуориметрии для определения бактериологических показателей качества воды, в частности, общего содержания бактерий.

Цель работы.

Исследовать флуоресцентные свойства никотинамидадениндинуклеотида (NADH) как внутриклеточного метаболита бактерий, с целью разработки флуориметрической методики определения общей бактериальной загрязненности природных вод.

В соответствии с этим в работе поставлены следующие **задачи**:

- 1.Исследовать флуоресцентные свойства внутриклеточного метаболита NADH, как маркера общего содержания бактерий в воде.

2. Исследовать влияние различных факторов на аналитический сигнал NADH (длина волны возбуждения флуоресценции, параметры измерения сигнала, водородный показатель, бактерицидные вещества).

3. Разработать методику определения общего содержания бактерий в природных водах методом флуориметрии.

4. Оценить мешающее влияние компонентов, содержащихся в природной воде на флуоресцентный сигнал внутриклеточного NADH.

5. Провести сравнительные испытания определения содержания бактерий в природных водах флуориметрическим методом и методом подсчета клеток в камере Горяева.

Научная новизна.

1. Выявлены закономерности получения прямого сигнала внутриклеточного NADH методом флуориметрии. Изучена природа сигнала на примере лактобактерий. Показано, что сигнал имеет флуоресцентную природу с параметрами: длина волны возбуждения флуоресценции 360 нм, максимум регистрации флуоресценции 440 - 460 нм, время задержки измерительного строба 1 мкс, время длительности измерительного строба 40 мкс. Показана возможность получения стабильного и воспроизводимого флуоресцентного сигнала NADH без предварительной его экстракции из бактериальной клетки.

2. Впервые изучены закономерности влияния pH на аналитический сигнал внутриклеточного NADH на примере штамма M17 бактерий E-coli. Показано, что оптимальным значением pH среды является 6.86, что соответствует нейтральной среде.

3. Изучено влияние ряда антибиотиков широкого спектра действия на сигнал внутриклеточного NADH на примере лактобактерий. Показано, что амоксициллин не вызывает гибель бактерий, а цефазолин и тетрациклин оказывает губительное воздействие на молочнокислые бактерии.

4. Изучено влияние ряда бактерицидных веществ на штамм *M 17 E coli* методом флуориметрии. Показано, что 6 % раствор пероксида водорода и 70 % раствор этилового спирта оказывают бактерицидное воздействие на бактерии группы кишечной палочки, снижая интенсивность флуоресценции внутриклеточного NADH.

5. Изучено мешающее влияние ряда веществ (фенол, гуминовые кислоты, железо (III), гидрокарбонат натрия) на аналитический сигнал внутриклеточного NADH. Показано, что растворы фенола, железа (III) и гидрокарбоната натрия в концентрациях, соответствующих ПДК, не оказывают мешающего влияния на регистрацию флуоресценции NADH. Установлено, что присутствие гуминовых кислот оказывает мешающее влияние на флуориметрическое определение внутриклеточного NADH, однако данное влияние устраняется на стадии пробоподготовки путем доведения анализируемого образца до pH = 4 с последующим отстаиванием гуминовых кислот.

Практическая значимость.

1. Подобраны оптимальные условия флуориметрического определения бактериальной загрязненности природных вод.

2. На основании условий анализа, подобранных на модельных объектах, разработана методика определения содержания бактерий в природных водах методом флуориметрии, обладающим высокой чувствительностью, воспроизводимостью, простотой использования и экспрессностью.

3. Проведено сравнительное определение содержания бактерий в воде рек г. Томска.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты оценки влияния различных факторов на флуоресцентный сигнал внутриклеточного NADH (длина волны возбуждения флуоресценции, параметры измерения сигнала, водородный показатель, бактерицидные вещества).

2. Результаты оценки влияния ряда веществ, содержащихся в природной воде (фенол, гуминовые кислоты, гидрокарбонат-ионы, железо (III)) на аналитический сигнал внутриклеточного NADH.

3. Флуориметрическая методика определения общего содержания бактерий в природных водах на основании измерения интенсивности флуоресценции бактериального NADH.

4. Результаты сравнительных испытаний определения общего содержания бактерий в природных водах флуориметрическим методом и методом прямого подсчета клеток в камере Горяева.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Достоверность полученных данных обусловлена представительным объемом проведенных экспериментов, использованием современных аналитических методов и метрологической обработки результатов, которые хорошо согласуются с литературными данными и результатами, полученными референтным микробиологическим методом прямого подсчета клеток в камере Горяева.

Публикации.

Результаты выполненных исследований отражены в 11 печатных работах, в т.ч. в 8 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях, 3 статьях в научных журналах, из них 2 статьи в научных журналах, индексируемых базами SCOPUS и Web of Science, 1 статья в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов:

1. Программа ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2007-2013 годы, № 14.В37.21.0811, мероприятие 1.2.1, тема: «Создание теоретических основ, высокочувствительных методик и сенсоров для электрохимических методов анализа биологически активных веществ»

Научный руководитель, д.х.н., профессор каф. ФАХ ИПР Короткова Е.И.

2. Программа ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2007-2013 годы, № 14.740.11.1369, мероприятие 1.1, тема: «Разработка высокочувствительных методик определения и исследование биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами в объектах природного и искусственного происхождения с целью совершенствования профилактики и лечения социально-значимых заболеваний»

Научный руководитель, к.х.н., ассистент каф. ФАХ ИПР Воронова О.А.

3. Программа ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2007-2013 годы, 14.В37.21.1183, мероприятие 1.3.1, тема: «Сравнительные исследования антиоксидантной активности природных объектов физико-химическими методами анализа»

Научный руководитель, к.х.н., Дорожко Е.В.

4. Проект ТПУ ВИУ_ИПР_2014 «Разработка биосенсора и тест-системы на холестерин для контроля качества пищевых продуктов», руководитель проекта д.х.н., профессор каф. ФАХ ИПР Короткова Е.И

5. Гос. задание «Наука» № 1.1310.2014 (№ госрегистрации 01201459775) «Разработка научных основ получения функциональных полимерных материалов с контролируемым комплексом свойств на основе глубокой переработке углеводородного сырья», руководитель проекта д.х.н., профессор каф. ФАХ ИПР Короткова Е.И.

Гос. задание «Наука» № 4.1619.2014/к от 11.06.2014 «Разработка тест-системы определения гепаринов для коагулологического контроля при сердечно-сосудистых заболеваниях», руководитель проекта д.х.н., профессор каф. ФАХ ИПР Короткова Е.И.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, 4-ех глав, выводов, списка литературы (102 ссылки) и приложений. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, включая 37 рисунков и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулирована цель исследований, показана научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе описаны основные показатели качества природных вод, в частности подробно рассмотрены бактериологические показатели. Представлен обзор методов определения бактериологических показателей качества природных вод, как прямых, так и косвенных. Приведена характеристика бактерий *Escherichia coli* (кишечная палочка) и *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка), являющиеся основными представителями бактериальной микрофлоры всех водоемов. Описан процесс метаболизма данных микроорганизмов. Дано краткое описание явления люминесценции и показана возможность использования люминесцентного анализа для исследования различных природных и биологических объектов, в частности, для определения количественного содержания бактерий в исследуемых объектах.

Вторая глава посвящена описанию используемой аппаратуры и методик измерений. Охарактеризованы объекты исследования и описаны методики проведения экспериментов. Исследования проводились на спектрофлуориметре «Флюорат 02-Панорама» (ООО «Люмэкс» г. Санкт - Петербург).

В третьей главе описана природа аналитического сигнала, установлено различие в оптических свойствах стандартного раствора NADH и NADH внутриклеточного. Подобраны оптимальные условия получения

аналитического сигнала NADH внутриклеточного, как маркера жизненной активности бактерий. Показано влияние различных параметров на аналитический сигнал.

Четвертая глава посвящена разработке методики определения общего содержания бактерий в природных водах. Описан процесс пробоподготовки анализируемого объекта. Показано влияние ряда веществ, содержащихся в природных водах на аналитический сигнал внутриклеточного NADH. Установлено, что присутствие в воде фенола, гидрокарбонат-ионов и ионов Fe³⁺ в концентрациях, равных ПДК, не влияют на регистрацию аналитического сигнала, а присутствие гуминовых кислот затрудняет регистрацию флуоресценции внутриклеточного NADH, однако данное мешающее влияние устраняется на стадии пробоподготовки. Определены основные метрологические характеристики разработанной методики. Проведено определение количественного содержания бактерий в природных водах методом флуориметрии и методом подсчета клеток в камере Горяева.

Результаты и обсуждение

Определение общего числа бактерий в природных водах проводится несколькими методами, каждый из которых обладает определенными недостатками, в связи с этим в последнее время все более широкое распространение во многих областях науки и техники получают флуориметрические методы анализа, обладающие высокой чувствительностью, селективностью и экспрессностью. Метод флуориметрии широко используется для анализа клеток, клеточных структур и различных внутриклеточных метаболитов.

Для оценки общего содержания бактерий в природных водах методом флуориметрии в данной работе использован кофермент метаболизма никотиндиамидадениндинуклеотид (NADH), являющийся общим флуоресцирующим веществом для всех бактерий.

Реакция образования NADH представлена на рисунке 1.

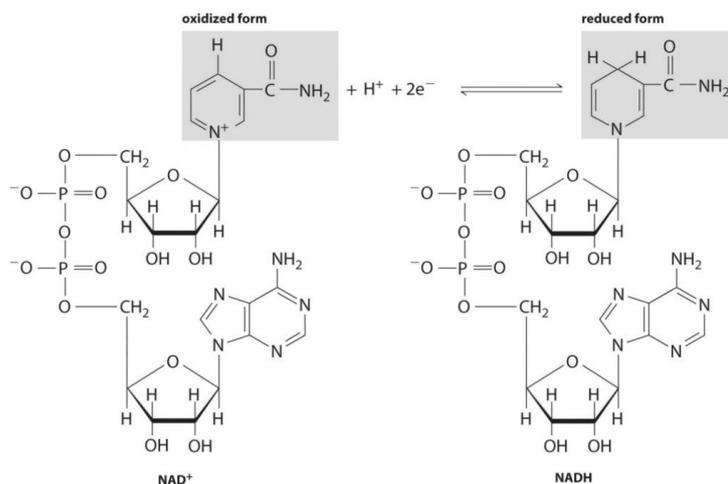


Рисунок 1. Восстановление кофермента NADH

Окисленная форма кофермента имеет одну полосу поглощения при 260 нм, однако, при восстановлении кофермента в спектре появляется еще одна полоса поглощения при 340 нм и способность флуоресцировать.

При создании любой аналитической методики важным шагом является определение влияния различных факторов на аналитический сигнал исследуемого вещества. Во флуоресцентном анализе бактерий, в частности процесса их метаболизма, такими факторами являются длина волны возбуждения, параметры регистрации сигнала, а также водородный показатель среды и влияние бактерицидных веществ.

Для подбора рабочих условий регистрации флуоресценции NADH для дальнейших исследований был проведен поиск оптимальной длины волны возбуждения его флуоресценции, а также определено оптимальное время задержки измерительного строка спектрофлуориметра.

Выбор оптимальных параметров регистрации аналитического сигнала.

Аналитический сигнал NADH в виде модельного раствора получен при различных длинах волн возбуждения флуоресценции (рис.2) и при изменении времени задержки измерительного строка (рис.3)

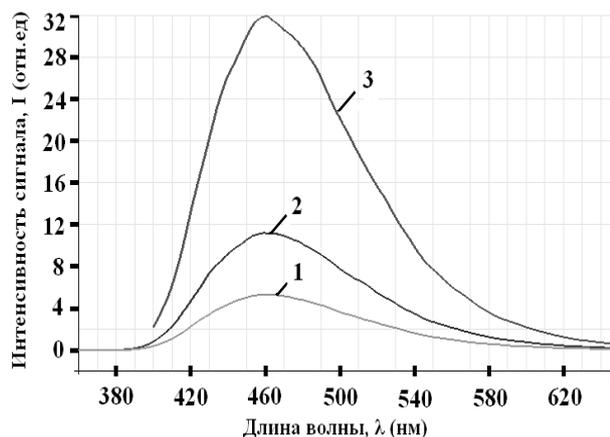


Рисунок 2. Спектры регистрации флуоресценции раствора NADH $C_m = 0,001M$: 1 – длина волны возбуждения 340 нм, 2 – длина волны возбуждения 360 нм, 3 – длина волны возбуждения 380 нм.

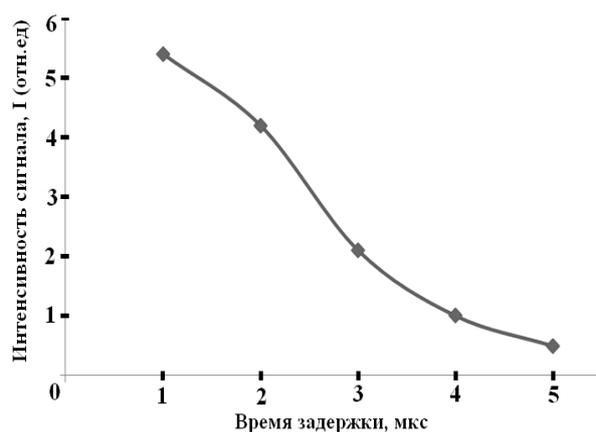


Рисунок 3. Влияние времени задержки измерительного stroba на интенсивность сигнала

Наибольшая величина аналитического сигнала NADH оказалась при длине волны возбуждения 380 нм, однако, данная длина волны близка по положению к началу интервала регистрации сигнала (390 нм). В реальных объектах, которые не являются идеальными растворами такая минимальная разница между длиной волны возбуждения и началом интервала регистрации может привести к появлению явления рассеивания света клетками, или другими частицами. В связи с этим для работы в качестве возбуждающей была выбрана длина волны 360 нм.

Исследование влияния времени задержки измерительного stroba позволило определить природу сигнала – флуоресценция, об этом свидетельствует уменьшение интенсивности сигнала флуоресценции в 5 раз при увеличении времени задержки от 1 до 5 мкс.

На рисунке 4 представлены спектры флуоресценции стандартного раствора NADH и NADH внутриклеточного. На рисунке 5 показано влияние pH среды на аналитический сигнал внутриклеточного NADH.

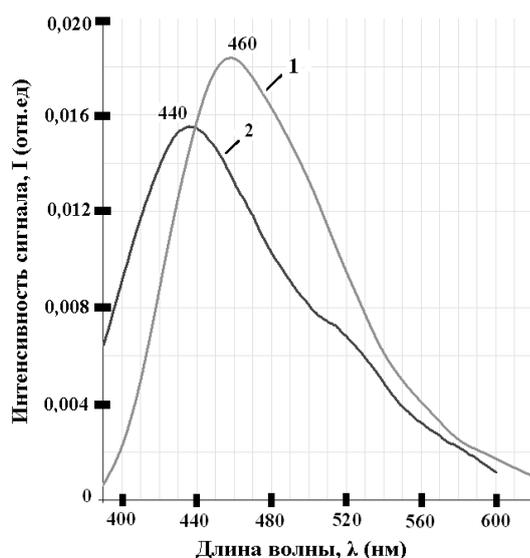


Рисунок 4. Спектр регистрации флуоресценции стандартного раствора NADH ($C_m = 0,01 \text{ M}$) (1), внутриклеточного NADH в *E.coli* (2). Длина волны возбуждения 360 нм

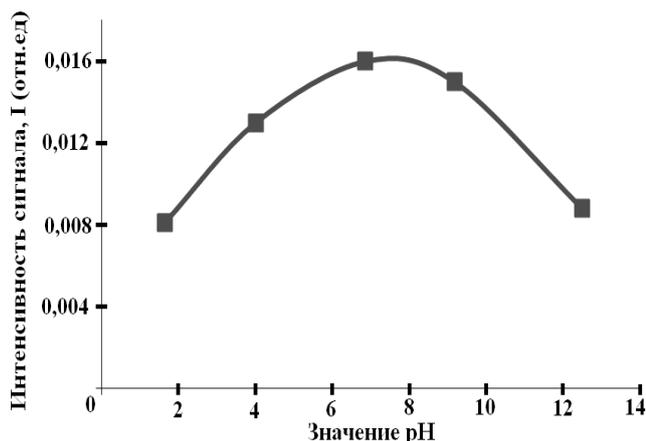


Рисунок 5. Зависимость интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH *E.coli* от pH среды

Максимум флуоресценции NADH внутриклеточного приходится на длину волны 440 нм, а стандартный раствор NADH характеризуется пиком с максимумом при 460 нм. Такое смещение положения максимума флуоресценции NADH внутриклеточного в область коротких длин волн объясняется реакцией кофермента с соответствующей ему дегидрогеназой.

Установлено, что уровень pH среды оказывает влияние на флуоресценцию внутриклеточного NADH. При pH 1,65 и 12,5 наблюдается резкое уменьшение интенсивности сигнала NADH, что обусловлено бактерицидным действием данных сред на микроорганизмы. При переходе от pH 4,01 до 9,18 наблюдается увеличение интенсивности сигнала NADH, причем, максимум интенсивности соответствует pH 6,86. Полученные результаты подтверждаются литературными данными, из которых известно, что кишечная палочка характеризуется активно протекающими жизненными процессами при значениях pH в интервале от 4,4 до 9,0.

Таким образом, были выбраны оптимальные параметры регистрации аналитического сигнала внутриклеточного NADH для дальнейшего создания методики определения общего содержания бактерий в природных водах:

1. Длина волны возбуждения флуоресценции 360 нм, максимум регистрации флуоресценции 440 нм.
2. Время задержки измерительного строба 1 мкс.
3. Значение pH среды 6,86.

Влияние бактерицидных веществ

Регистрация аналитического сигнала внутриклеточного NADH возможна только в живых клетках. Под действием бактерицидных веществ происходит гибель клеток, выработка NADH прекращается, что сопровождается уменьшением интенсивности его флуоресценции. На рисунках 6 и 7 показано влияние 6 % раствора пероксида водорода и 70 % раствора этилового спирта соответственно на аналитический сигнал внутриклеточного NADH.

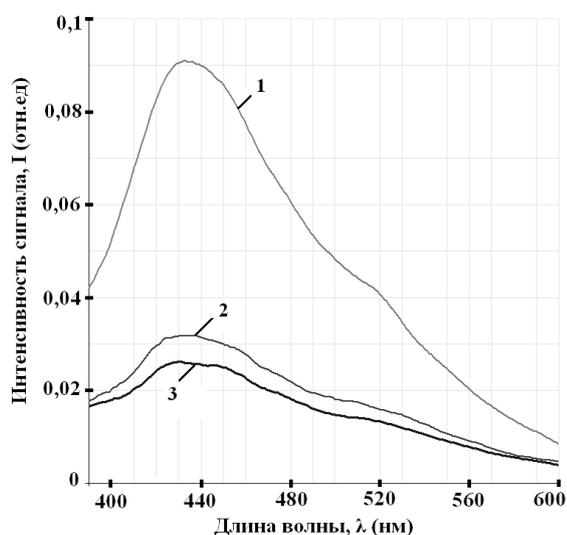


Рисунок 6. Спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH при добавлении пероксида водорода: 1 – суспензия бактерий *E.coli* (содержание бактерий $2 \cdot 10^6$ КОЕ); 2 – суспензия бактерий *E.coli* с добавлением пероксида водорода через час после добавки; 3 – суспензия бактерий *E.coli* с добавлением пероксида водорода через два часа после добавки.

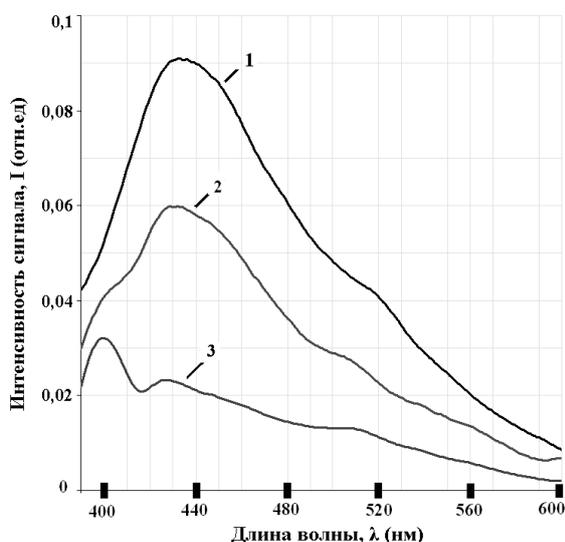


Рисунок 7. Спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH при добавлении этилового спирта: 1 – суспензия бактерий *E.coli* (содержание бактерий $2 \cdot 10^6$ КОЕ); 2 – суспензия бактерий *E.coli* с добавлением этилового спирта через час после добавки; 3 – раствор этилового спирта.

Действие на бактерии этилового 6 % раствора пероксида водорода аналогично действию 70 % раствора этилового спирта – при добавлении каждого из исследуемых растворов наблюдается уменьшение интенсивности сигнала NADH, что свидетельствует о гибели микроорганизмов и подтверждает предположение о возможности регистрации флуоресценции NADH только в живых клетках.

Влияния соединений различной природы на аналитический сигнал внутриклеточного NADH.

Природная вода является смесью многих растворенных в ней соединений, как органической, так и неорганической природы, в связи с этим проведено исследование влияния растворенных в воде веществ на флуоресцентный сигнал NADH.

Для анализа были выбраны следующие вещества в концентрациях, соответствующих ПДК:

- 1.Фенол 0,001 мг/л.
- 2.Железо (III) 0,3 мг/л.
- 3.Гидрокарбонат-ионы в форме гидрокарбоната натрия 500 мг/л.
- 4.Гуминовые кислоты 20 мг/л.

В таблице 1 представлены обобщенные результаты по влиянию веществ различной природы на аналитический сигнал внутриклеточного NADH.

Таблица 1.

Влияние веществ различной природы на аналитический сигнал
внутриклеточного NADH (n=3, P=0.95)

Исследуемое вещество	Интенсивность флуоресценции внутриклеточного NADH, I (отн.ед)	
	До введения исследуемого вещества в раствор	После введения исследуемого вещества в раствор
Гидрокарбонат-ионы в форме гидрокарбоната натрия	0,0185 ± 0,0111	0,0176 ± 0,0101
Железо (III)	0,0187 ± 0,0112	0,0180 ± 0,0108
Фенол	0,0194 ± 0,0116	0,0183 ± 0,0109

Исследование показало, что присутствие в воде гидрокарбонат-ионов, ионов железа (III) и фенола не оказывают мешающего влияния на аналитический сигнал внутриклеточного NADH. В отличие от перечисленных выше веществ, гуминовые кислоты обладают флуоресценцией с максимумом, близким по положению к максимуму флуоресценции NADH. На рисунке 8 показано влияние гуминовых кислот на регистрацию аналитического сигнала внутриклеточного NADH.

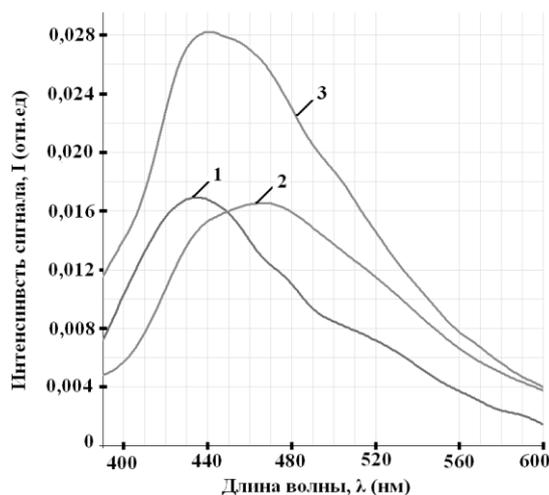


Рисунок 8. Влияние гуминовых кислот на флуоресцентный сигнал внутриклеточного NADH: 1 – суспензия бактерий E.coli, содержание бактерий $4 \cdot 10^6$ КОЕ; 2 – раствор гуминовых кислот, концентрация 20 мг/л; 3 - раствор гуминовых кислот + 1 мл бактерий E.coli.

При совместном анализе гуминовых кислот и бактерий наблюдается наложение их спектра флуоресценции со спектром флуоресценции NADH. Присутствие гуминовых кислот в воде оказывает мешающее влияние на определение флуоресцентного сигнала NADH, в связи с этим, в процесс пробоподготовки включен этап по очистке воды от гуминовых кислот путем доведения пробы воды до рН=4 с последующей коагуляцией гуминовых кислот и их отстаиванием.

Разработка флуориметрической методики определения общего содержания бактерий в природных водах

Для разработки методики определения общего содержания бактерий в природных водах был использован аналитический сигнал внутриклеточного NADH при длине волны возбуждения 360 нм, интервале регистрации от 390 до 650 нм, времени задержки измерительного строба 1 мкс в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции NADH от количества бактерий в суспензии. Эта область находилась в диапазоне содержаний бактерий от $1 \cdot 10^6$ до $8 \cdot 10^6$ КОЕ (рис.9).

В качестве модельного организма был использован штамм М 17 бактерий группы кишечной палочки.

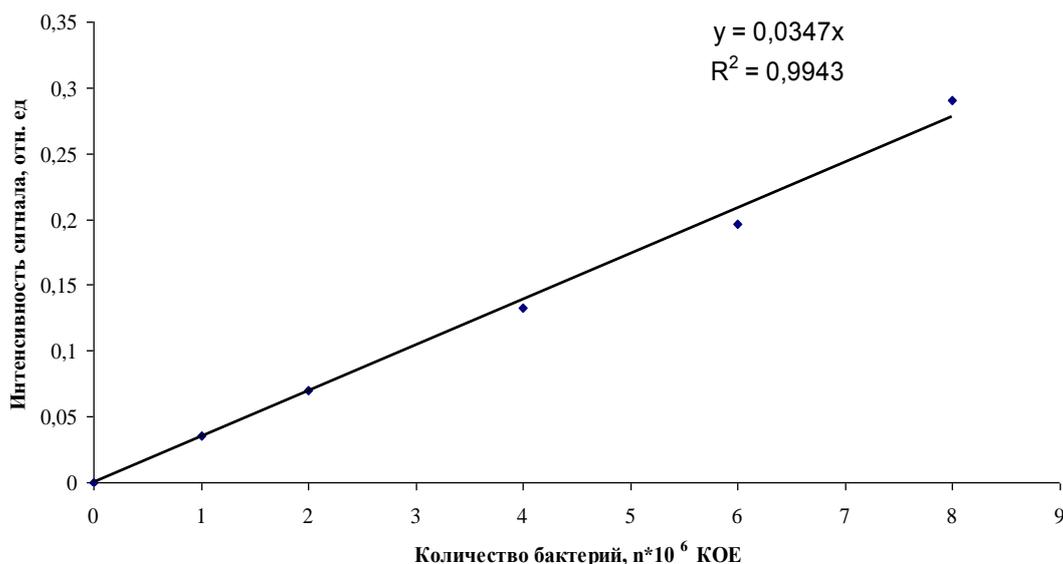


Рисунок 9. Градуировочный график зависимости аналитического сигнала внутриклеточного NADH от количества бактерий в суспензии

Подготовку проб природной воды для определения содержания бактерий проводили следующим образом. Воду из источника отбирали в объеме не менее 500 мл на расстоянии 10 – 15 см от дна. Время хранения отобранной пробы составляло не более 2 часов. Пробоподготовка включала в себя доведение пробы до комнатной температуры, доведение пробы до $pH = 4$ с целью удаления гуминовых кислот, отстаивание.

Для анализа отбирали аликвоту объемом 3 мл, аликвоту помещали в кварцевую кювету. Все измерения проводились на спектрофлуориметре «Флюорат-02 ПАНОРАМА» (ООО «Люмэкс», г.Санкт – Петербург) при следующих параметрах:

1. Длина волны возбуждения – 360 нм;
2. Интервал регистрации флуоресценции – 390 – 650 нм;
3. Режим полной коррекции сигнала;
4. Время измерения сигнала 40 мкс, время задержки строка – 1 мкс.

Процедура определения содержания общего числа бактерий в объектах заключалась в измерении сигнала флуоресценции выбранного ранее

клеточного метаболита NADH и определении количества содержащихся в пробе бактерий с использованием градуировочного графика.

Были определены следующие метрологические характеристики создаваемой методики:

1. Показатель повторяемости.
2. Показатель внутрилабораторной прецизионности.
3. Показатель правильности.
4. Показатель точности.

Обобщенные результаты, полученные для диапазона исследуемых содержаний бактерий E.coli в модельных суспензиях представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Метрологические характеристики методики ($p = 0.95, n = 3, L = 10$)

Измеряемое содержание микроорганизмов, КОЕ	Показатель повторяемости $S_r, \%$	Показатель внутрилабораторной прецизионности, $S_R, \%$	Показатель правильности, $\Delta_c, \%$	Показатель точности $\pm\Delta, \%$
$1 \cdot 10^6$	6	10	40	50
$2 \cdot 10^6$	5	12	35	50
$4 \cdot 10^6$	3	12	30	46
$6 \cdot 10^6$	3	6	25	40
$8 \cdot 10^6$	2	9	20	35

Правильность методики оценивалась по методу добавок.

По полученным экспериментальным данным проведен расчет показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности. Обобщенные результаты расчетов представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Относительные значения метрологических характеристик методики ($n = 3$,
 $P = 0,95, L = 10$)

Добавка, КОЕ	Показатель повторяемости $S_r, \%$	Показатель внутрилабораторной прецизионности, $S_{R,л},$ %	Показатель правильности, $\Delta_c, \%$	Показатель точности, $\Delta,$ %
$1 \cdot 10^6$	17	18	47	60
$4 \cdot 10^6$	5	5	20	50
$8 \cdot 10^6$	3	4	20	35

Из таблицы 3 видно, что при определении содержания бактерий в природных водах флуориметрическим методом в диапазоне содержания бактерий от $1 \cdot 10^6$ до $8 \cdot 10^6$ показатель точности не превышает 60%, показатели повторяемости и внутрилабораторной прецизионности 17 и 18%, соответственно.

По результатам расчетов целесообразно приписать разрабатываемой методике максимальную погрешность 60 % во всем диапазоне определяемых содержаний.

Используя разработанную флуориметрическую методику, определили общее содержание бактерий в природных водах, в качестве метода сравнения использовался метод подсчета клеток с помощью счетной камеры Горяева.

В таблице 4 представлены результаты определения содержания бактерий в природных водах.

Таблица 4.

Результаты определения общего содержания бактерий в воде
флуориметрическим методом и методом прямого счета клеток

$(n = 3, P = 0.95)$

№ пробы	Дата и место забора пробы	Количество бактерий, $n \cdot 10^6$ КОЕ/мл	
		Флуориметрический метод	Метод прямого счета клеток
1	10 октября, р. Ушайка, Каменный мост	$3,0 \pm 1,77$	$2,3 \pm 1,36$
2	14 октября, р. Ушайка, пос. Степановка	$4,0 \pm 2,36$	$4,8 \pm 2,83$
3	15 октября, р. Томь, пр. Ленина	$1,1 \pm 0,65$	$0,7 \pm 0,41$
4	18 октября р. Басандайка, пос. Аникино	$3,6 \pm 2,12$	$3,3 \pm 1,95$

Из таблицы видно, что результаты, полученные двумя методами сопоставимы и по общему содержанию бактерий всем исследуемым образцам можно присвоить степень загрязненности от умеренной до умеренно – загрязненной.

Несмотря на то, что такой показатель, как общее содержание бактерий не показывает присутствие патогенных микроорганизмов, известно, что чем выше уровень общей бактериальной загрязненности исследуемой воды, тем выше вероятность присутствие патогенной микрофлоры в соответствующем водоеме.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы флуоресцентные свойства внутриклеточного метаболита NADH и его стандартного раствора, определены длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции для получения его аналитического сигнала. Показано, что при одной длине волны возбуждения 360 нм положение максимумом флуоресценции стандартного раствора NADH и NADH внутриклеточного отличаются на 20 нм, что согласуется с литературными данными. Показана возможность регистрации спектра флуоресценции внутриклеточного NADH без предварительного экстрагирования его из клетки. Определена природа регистрируемого сигнала.

2. Исследовано влияние различных факторов (длина волны возбуждения флуоресценции, параметры измерения сигнала, pH, температура, добавление бактерицидных веществ) на бактерии различных групп по изменению интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH. Показано, что регистрация флуоресценции внутриклеточного NADH возможна только в живых клетках.

3. Разработана методика количественного определения бактерий в природных водах методом флуориметрии в диапазоне содержаний от $1 \cdot 10^6$ до $8 \cdot 10^6$ КОЕ. Проведена оценка метрологических характеристик методики.

4. Показано мешающее влияние содержащихся в природной воде компонентов (фенол, гидрокарбонат-ионы, железо (III), гуминовые кислоты) на регистрацию флуоресцентного сигнала NADH. Установлено, что присутствие гуминовых кислот оказывает мешающее влияние на флуориметрическое определение внутриклеточного NADH, однако данное влияние устраняется на стадии пробоподготовки.

5. Проведено сравнительное определение содержания бактерий в природных водах методом подсчета клеток в камере Горяева.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. **Булычева Е. В.** Методика внутриклеточного измерения количества метаболита *in situ* при оценке общей бактериальной загрязненности природных вод / **Булычева Е. В.**, Короткова Е.И., Воронова (Аврамчик) О.А. , Петрова Е.В., Кустова (Якименко) А.А. // Известия вузов. Химия и химическая технология. - 2014 - Т. 57 - №. 11. - С. 8-10

2. **Bulycheva E.V.** Investigation of lactobacilli properties / **Bulycheva E.V.**, Korotkova E. I. , Voronova O. A. // Advanced Materials Research. - 2014 - Vol. 1040. - p. 319-322

3. **Bulycheva E.V.** Fluorescence Analysis of E. coli Bacteria in Water / **Bulycheva E.V.**, Korotkova E.I., Voronova O.A., Kustova A.A., Petrova E.V. // Procedia Chemistry. - 2014 - Vol. 10. - p. 179-183

4. **Булычева Е.В.** Исследование химического состава вод методом флуориметрии / **Булычева Е.В.**, Дёрина К.В. // Материалы 1-ой зимней молодежной школы-конференции «Новые методы аналитической химии», Санкт-Петербург, 2013. – С. 35.

5. **Bulycheva E.V.** Investigation of lactic acid bacteria properties / **Bulycheva E.V.**, Voronova O.A. // Проблемы геологии и освоения недр: труды XVI Международного симпозиума имени академика М.А. Усова студентов и молодых учёных, «Проблемы геологии и освоения недр». - Томск: Изд-во ТПУ, 1-5 апреля 2013. – С. 793-795.

6. **Bulycheva E. V.** Investigation of lactic acid bacteria properties / **Bulycheva E. V.**, Korotkova E. I. , Voronova O. A. , Dyorina K. V. , Kustova A. A. // EuroFoodChem - XVII: Book of abstracts, Istanbul, May 7-10, 2013. - Istanbul: Hacettepe University , 2013 - p. 576.

7. **Булычева Е.В.** Исследование оптических свойств лактобактерий / **Булычева Е.В.**, Воронова О.А., Кустова А.А. // Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л.П.

Кулева студентов и молодых ученых с международным участием "Химия и химическая технология в XXI веке", 13-16 мая 2013. – С. 237-239.

8. **Булычева Е.В.** Люминесцентный анализ бактериальной загрязненности природной воды / **Булычева Е.В.**, Воронова О.А. // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва, Томск, 26-29 мая 2014 г. в 2 т.. — 2014. — Т. 1. — [С. 171-172].

9. Тимофеева Е.В. Люминесцентный анализ бактериологических показателей качества природной воды / Тимофеева Е.В., **Булычева Е.В.** // Материалы VII Всероссийской научной студенческой конференции с элементами научной школы имени профессора М.К. Коровина, г. Томск, 10-14 ноября 2014 г. / Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ) под ред. А. Ю. Дмитриева. — Томск: Изд-во ТПУ, 2015. — [С. 116-118].

10. Тимофеева Е. В. Исследование люминесцентных свойств лактобактерий и их взаимодействия с индикатором бромкрезоловым красным / Е. В. Тимофеева, **Булычева Е. В.**; науч. рук. Е. И. Короткова // Материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва, Томск, 25-29 мая 2015 г. в 2 т. / Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ).. — 2015. — Т. 1. — [С. 248-249].

11. **Булычева Е. В.** Флуориметрическое определение бактериологических показателей качества природных вод / **Булычева Е. В.** // материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, профессора Л.П. Кулёва, Томск, 25-29 мая 2015 г. в 2 т. / Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ).. — 2015. — Т. 1. — [С. 193-195].