

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Булычева Елизавета Владимировна

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

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Научный руководитель:**  
доктор химических наук, доцент  
Короткова Елена Ивановна

Томск – 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Список сокращений.....                                                                    | 5  |
| Введение.....                                                                             | 6  |
| Глава 1. Литературный обзор.....                                                          | 15 |
| 1.1.Основные показатели качества воды.....                                                | 15 |
| 1.2.Бактериологические показатели качества воды.....                                      | 17 |
| 1.3.Характеристика бактерий группы кишечной палочки.....                                  | 20 |
| 1.4.Характеристика синегнойной палочки.....                                               | 21 |
| 1.5.Определение бактериальной загрязненности природных вод.....                           | 23 |
| 1.5.1.Определение колиформных бактерий.....                                               | 23 |
| 1.5.2.Определение общего содержания бактерий.....                                         | 27 |
| 1.6.Люминесценция.....                                                                    | 33 |
| 1.6.1.Применение люминесцентного анализа.....                                             | 36 |
| 1.7.Ферменты и коферменты метаболизма.....                                                | 38 |
| 1.7.1.Коферменты переноса водорода.....                                                   | 38 |
| 1.7.2.Строение и свойства никотинамидадениндинуклеотида.....                              | 39 |
| 1.8.Метаболизм бактерий.....                                                              | 41 |
| 1.9.Характеристика лактобактерий.....                                                     | 43 |
| Глава 2. Аппаратура и методика эксперимента.....                                          | 47 |
| 2.1. Оборудование, объекты исследования и реактивы.....                                   | 47 |
| 2.1.1. Оборудование.....                                                                  | 47 |
| 2.1.2. Объекты исследования.....                                                          | 50 |
| 2.1.3. Реактивы.....                                                                      | 51 |
| 2.2. Методика эксперимента.....                                                           | 51 |
| 2.2.1. Исследование флуоресцентных свойств растворителя и стандартного раствора NADH..... | 51 |
| 2.2.2. Исследование флуоресцентных свойств медицинских препаратов.....                    | 52 |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3.Определение количества бактерий методом прямого счета клеток в камере Горяева – Тома.....                               | 52 |
| Глава 3. Исследование оптических свойств бактерий методом флуориметрии.....                                                   | 54 |
| 3.1. Изучение флуоресцентных свойств стандартного раствора NADH.....                                                          | 54 |
| 3.2.Изучение природы сигнала внутриклеточного NADH методом флуориметрии на примере лактобактерий.....                         | 55 |
| 3.3. Влияние различных факторов на сигнал внутриклеточного NADH.....                                                          | 59 |
| 3.3.1. Влияние водородного показателя.....                                                                                    | 59 |
| 3.3.2. Влияние температуры.....                                                                                               | 60 |
| 3.3.3. Влияние бактерицидных растворов.....                                                                                   | 63 |
| 3.3.4.Влияние антибиотиков.....                                                                                               | 65 |
| Глава 4. Разработка методики определения общего содержания бактерий в природных водах.....                                    | 70 |
| 4.1. Пробоподготовка и выбор условий анализа.....                                                                             | 70 |
| 4.2. Исследование мешающего влияния различных компонентов на флуоресцентный сигнал внутриклеточного NADH.....                 | 73 |
| 4.2.1. Влияние фенола на флуоресцентный сигнал NADH.....                                                                      | 73 |
| 4.2.2. Влияние железа (III) на флуоресцентный сигнал NADH.....                                                                | 75 |
| 4.2.3.Влияние гидрокарбонат-ионов на флуоресцентный сигнал NADH.....                                                          | 76 |
| 4.2.4.Влияние гуминовых кислот на флуоресцентный сигнал NADH.....                                                             | 78 |
| 4.3. Метрологические аспекты методики определения общего числа бактерий в природных водах.....                                | 79 |
| 4.3.1. Флуориметрический метод определения общего числа бактерий.....                                                         | 82 |
| 4.3.2. Оценка показателя правильности методики анализа методом добавок.....                                                   | 83 |
| 4.4. Построение градуировочного графика.....                                                                                  | 84 |
| 4.4 Метод прямого счета клеток и флуориметрический метод определения общего содержания бактерий. Сравнительные испытания..... | 86 |

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.1. Определение общего содержания бактерий в природных водах методом флуориметрии.....             | 86  |
| 4.4.2. Определение общего содержания бактерий в воде метод прямого счета клеток в камере Горяева..... | 89  |
| 4.4.2.1. Исследование флуоресцентных свойств фуксина.....                                             | 89  |
| 4.4.2.2. Подсчет клеток в камере Горяева.....                                                         | 92  |
| Обсуждение результатов.....                                                                           | 95  |
| Выводы.....                                                                                           | 99  |
| Список литературы.....                                                                                | 100 |
| Приложение 1.....                                                                                     | 111 |
| Приложение 2.....                                                                                     | 123 |
| Приложение 3.....                                                                                     | 128 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ПДК – предельно допустимая концентрация

ГН – гигиенические нормативы

МУК – методические указания

КОЕ – колониеобразующая единица

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МПА – мясо-пептонный агар

УФ – ультрафиолет

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

АТФ – аденозинтрифосфат

NAD – никотинамидадениндинуклетотид в окисленной форме

NADH – никотинамидадениндинуклеотид в восстановленной форме

NADP – никотинамидадениндинуклетотид фосфат в окисленной форме

NADPH – никотинамидадениндинуклеотид фосфат в восстановленной форме

GTP – гуанозинтрифосфат

FAD – флавинадениндинуклеотид

FMN – флавинмонопнуклеотид

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

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 диссертационной работы**

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

### **Для достижения цели были 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, влияние бактерицидных веществ).

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. 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.

### **Основные 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.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на:

1. Первой Зимней молодежной школе-конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии» (Санкт-Петербург, 2013).

2. XVII Международном симпозиуме имени академика М. А. Усова студентов и молодых ученых «Проблемы геологии и освоения недр» (Томск, 2013).

3. XVII международной конференции EuroFoodChem (Стамбул, Турция, 2013).

4. XIV Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием (Томск, 2013).

5. XV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2014).

6. VII Всероссийской научной студенческой конференции с элементами научной школы имени профессора М.К.Коровина «Творчество юных – шаг в успешное будущее» (Томск, 2014).

7. Всероссийском конкурсе научно-технического творчества молодежи «НТТМ-2015» в рамках Московского международного салона образования ММСО-2015. (Москва, 2015).

8. XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2015).

9. Научно-технических семинарах кафедры физической и аналитической химии Томского политехнического университета.

### **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.

6. 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.

### **Объем и структура диссертации**

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  $\text{Fe}^{3+}$  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.

## ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Основные показатели качества воды

Вода является основной составляющей не только жизни человека, но и разнообразных технологических процессов во всех отраслях промышленности. В чистом виде вода в природе не присутствует из-за своей сильно поляризованной структуры и способности растворять как неорганические вещества, так и органические вещества. Природная вода формируется под влиянием естественных процессов и в отсутствие антропогенного воздействия [1]. Источниками водоснабжения для городов и населенных пунктов являются поверхностные воды – реки, озера, водохранилища. Стремительное развитие промышленности и резкое увеличение численности населения приводят к увеличению вредных выбросов в окружающую среду. Такими выбросами могут быть отходы различных производств, бытовые сточные воды, выбросы сельского хозяйства и т.д.

Обязательным условием использования воды, как в повседневной жизни человека, так и для промышленных нужд является ее высокое качество и отсутствие вредных примесей. Нормирование качества воды состоит в установлении совокупности допустимых значений показателей ее состава и свойств, в пределах которых надежно обеспечиваются здоровье населения, благоприятные условия водопользования и экологическое благополучие водного объекта [2].

К основным показателям качества воды относятся [3,4]:

#### 1. Физические показатели:

- а) содержание взвешенных веществ (прозрачность)
- б) солесодержание (общая минерализация)
- в) концентрация водородных ионов

г) общая жесткость

д) окисляемость

е) общая щелочность

ж) содержание коррозионно-активных газов (кислород и углекислый газ)

## 2. Химические показатели:

а) основные ионы (хлорид-ионы, сульфат-ионы, карбонат и гидрокарбонат-ионы; катионы натрия, калия, кальция, магния, железа)

б) растворенные газы (кислород, углекислый газ, сероводород и т.д)

в) биогенные вещества (соединения азота и фосфора, необходимые для жизнедеятельности водных организмов)

г) микроэлементы (йод, фтор, литий, медь, никель, хром)

д) органические вещества (нефтепродукты, фенолы, синтетические ПАВы, пестициды)

## 3. Биологические показатели (содержание гидробионтов и гидрофлоры)

4. Бактериологические показатели (содержание бактерий группы кишечной палочки, общее микробное число)

Физико-химические показатели качества нормируются в соответствии с ГН 2.1.5.1315-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового использования». В таблице 1 представлены значения ПДК основных нормируемых показателей.

Таблица 1.

## ПДК некоторых химических веществ в воде

| Наименование вещества | Величина ПДК, мг/л |
|-----------------------|--------------------|
| Магний                | 50                 |
| Медь                  | 1                  |
| Кадмий                | 0,001              |
| Цинк                  | 1                  |
| Марганец              | 0,1                |
| Железо                | 0,3                |
| Свинец                | 0,01               |
| Сульфаты              | 500                |
| Хлориды               | 350                |
| Фосфаты               | 3,5                |
| Нефтепродукты         | 0,3                |
| Аммиак                | 2,0                |
| Фенолы                | 0,001              |
| Нитриты               | 45                 |

Биологические и бактериологические показатели нормируются в соответствии с ГОСТ 17.1.3.07-82 «Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков». Определение бактериологических показателей качества представляет особый интерес, так как причиной более половины всех смертей от потребления воды является высокое содержание в ней микроорганизмов.

## 1.2 Бактериологические показатели качества воды

Бактерии — одни из наиболее часто встречающихся в воде микроорганизмов наряду с вирусами, фагами, грибами, водорослями и т.д. Под общим понятием «бактерии» описано более 1600 видов микроорганизмов — прокариот, не имеющих настоящего

сложноорганизованного ядра. Большинство бактерий – одноклеточные организмы, различающиеся по размерам и физиологическим свойствам. Размеры бактерий колеблются в пределах от 1 до 100 мкм (рис.1)

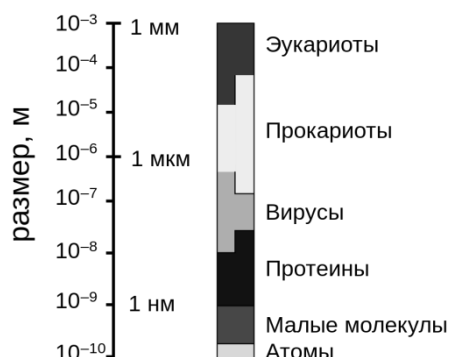


Рис.1. Шкала размеров бактерий

Все существующие бактерии можно условно разделить на патогенные, условно-патогенные и непатогенные. Патогенные микроорганизмы вызывают инфекционные заболевания у здоровых лиц, проникая внутрь чувствительного организма и паразитируя в нем. Условно-патогенные микроорганизмы, как правило, лишены болезнетворных свойств и не вызывают инфекционных заболеваний у здорового человека. Однако они могут вызывать поражения после пассивного переноса во внутреннюю среду организма. Важные условия их развития - массивность инфицирования и нарушения сопротивляемости организма. Непатогенные микроорганизмы не вызывают инфекционных заболеваний при попадании внутрь другого организма.

Почва, вода, организмы животных и человека являются естественной средой обитания микроорганизмов. Свое широкое распространены в природе они получили из-за их малых размеров, способности усваивать самые разнообразные вещества в качестве источников питания и легко приспосабливаться к условиям внешней среды [5].

Численность и видовое разнообразие микроорганизмов водных объектов определяются наличием в воде органических веществ. Строение и жизнедеятельность всех микроорганизмов, находящихся в чистых и загрязненных водах изучает направление водная микробиология [6].

В таблице 2 представлена классификация природных вод по степени ее бактериальной загрязненности согласно ГОСТ 17.1.3.07-82 «Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков»

Таблица 2.

Классификация качества воды водоемов и водотоков по  
микробиологическим показателям

| Класс<br>качества<br>воды | Степень<br>загрязненности<br>воды | Микробиологические показатели                                            |                                                                                |                                                                              |
|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|                           |                                   | Общее<br>количество<br>бактерий,<br>$10^6$ кл/см <sup>3</sup><br>(кл/мл) | Количество<br>сапрофитных<br>бактерий, $10^3$<br>кл/см <sup>3</sup><br>(кл/мл) | Отношение общего количества<br>бактерий к количеству сапрофитных<br>бактерий |
| I                         | Очень чистые                      | Менее 0,5                                                                | Менее 0,5                                                                      | Менее $10^3$                                                                 |
| II                        | Чистые                            | 0,5-1,0                                                                  | 0,5-5,0                                                                        | Более $10^3$                                                                 |
| III                       | Умеренно<br>загрязненные          | 1,1-3,0                                                                  | 5,1-10,0                                                                       | $10^3 - 10^2$                                                                |
| IV                        | Загрязненные                      | 3,1-5,0                                                                  | 10,1-50,0                                                                      | Менее $10^2$                                                                 |
| V                         | Грязные                           | 5,1-10,0                                                                 | 50,1-100,0                                                                     | Менее $10^2$                                                                 |
| VI                        | Очень<br>грязные                  | Более<br>10,0                                                            | Более<br>100,0                                                                 | Менее $10^2$                                                                 |

Основными представителями микрофлоры всех природных водоемов являются бактерии группы кишечной палочки и синегнойная палочка.

### 1.3 Характеристика бактерий группы кишечной палочки

Кишечная палочка (*E.coli*) – грамотрицательная палочковидная бактерия, встречается в кишечнике человека и животных (рис. 2). В организме человека и животных кишечная палочка является антагонистом патогенных кишечных бактерий, грибов рода *Candida*, так же принимает участие в синтезе витаминов В, Е, К.



Рис.2. Чистая культура *E.coli*, окраска по Грамму

При ослабленной иммунной системе условно-патогенные штаммы, обитающие в кишечнике, могут стать причиной гнойно-воспалительных заболеваний за пределами пищеварительного тракта: циститы, отиты, менингиты и т.д. Существуют так же патогенные штаммы *E.coli*, которые при попадании в организм извне, вызывают кишечные эпидемические эшерихиозы [7]. Автор [8] описывает три патогенных штамма бактерий *E.coli*: энтероксигенный штамм (O148), энтерогеморрагический штамм (O157), энтероинвазивный штамм (O124). Попадание в организм штамма O148 вызывает сильную диарею, длящуюся в течение нескольких дней, вызывающую сильное обезвоживание организма. Штамм O157 вызывает сильные боли в животе, кровавый понос и гемолико-уремический синдром, передается чаще всего орально-фекальным путем. Штамм O124 вызывает спазмы в животе, диарею, рвоту, лихорадку, появление крови и слизи в кале больного. Фактором патогенности *E.coli* является образование эндотоксина, оказывающего нейротропное, энтеротропное и пирогенное действие.

Являясь факультативным анаэробом, кишечная палочка не требовательна к питательным средам, хорошо растет на простых питательных средах при температуре 37°C и рН среды 7,2 – 7,4. Обладает высокой ферментативной активностью, расщепляет лактозу в течение 24 часов [7].

#### 1.4 Характеристика синегнойной палочки

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) – условно – патогенная бактерия рода *Pseudomonas* (рис.3). Грамотрицательная, неферментирующая палочка. Строгий аэроб. Продуцирует бактериоцины, по которым производится внутривидовая идентификация культур. Характерная особенность – образование слизи. Данные бактерии производят пигмент пиоцианин, окрашивающий отделяемое ран, перевязочный материал, питательную среду в сине-зеленый цвет – флюоресцеин, светящийся при облучении ультрафиолетом.

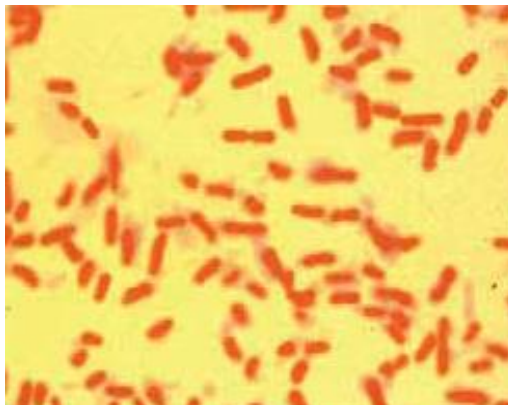


Рис.3. Чистая культура *Pseudomonas aeruginosa* окраска по Грамму

Один из возбудителей внутрибольничных инфекций, поражающих людей с ослабленным иммунитетом. Отличается множественной устойчивостью к антимикробным препаратам [9]. Многие виды являются свободноживущими бактериями и распространены в почве, воде, на растениях и у животных.

Многие микроорганизмы независимо от их вида осуществляют одни и те же биохимические процессы превращения определенных соединений. По наличию этих процессов можно судить о жизненной активности бактерий, а по количеству выделившихся продуктов или метаболитов в процессе превращений – о количестве бактерий. Количественное определение бактерий в различных объектах проводится для оценки общей обсемененности, санитарно-эпидемиологической безопасности, а так же при биологической очистке воды [5].

Критерием безопасности воды является отсутствие возбудителей инфекционных болезней - патогенных микроорганизмов. Однако, несмотря на высокий уровень микробиологического оборудования, и техник исследований, анализ воды на содержание микроорганизмов продолжительный, трудоемкий и сложный и процесс. Такие исследования проводятся только в случае неблагоприятной эпидемической ситуации, например, при вспышках инфекционных болезней, если есть подозрение на водный путь передачи. Во всех других случаях эпидемическую безопасность воды оценивают путем косвенного определения возможного присутствия патогенной микрофлоры. В санитарной практике используются два санитарно-микробиологических показателя бактериальной загрязненности — общее микробное число и содержание санитарно-показательных микроорганизмов.

Многочисленные наблюдения за поверхностными источниками водоснабжения, в которые попали сточные воды населенных пунктов, подтвердили, что существует прямая связь между количеством сапрофитов и степенью бактериального загрязнения. Сапрофиты – организмы (растения, бактерии, грибы), питающиеся остатками растений и животных и превращающие органические вещества в неорганические [10]. Доказано, что большое количество этих бактерий (сапрофитов) в воде обычно свидетельствует о том, что вода вступила в контакт с загрязнениями, которые

могли содержать и патогенные микроорганизмы. При этом считают, что чем больше загрязнена вода сапрофитами, тем выше ее эпидемическая опасность [11].

Общее микробное число – это общее количество колоний, вырастающих в течение 24 часов при температуре 37° С при посеве 1 мл воды на 1,5% мясо-пептонный агар [12]. Общее микробное число для незагрязненных артезианских вод не превышает 20—30, для незагрязненных шахтных колодцев — 300—400, для чистых открытых водоемов — 1000—1500, для водопроводной воды в случае эффективного ее обеззараживания — 100 колониобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл [11].

### **1.5 Определение бактериальной загрязненности природных вод**

Традиционными прямыми методами определения содержания бактерий в воде являются чашечный метод Коха и подсчет клеток под микроскопом. Весь санитарно-бактериологический контроль качества воды осуществляется по двум методикам определения: определение содержания бактерий кишечной палочки (колиформных бактерий) и определение общего микробного числа.

#### **1.5.1 Определение колиформных бактерий**

Бактерии группы кишечной палочки объединяют под общим названием «колиморфные бактерии». К этой группе относятся представители родов *Escherichia* (в том числе и *E. coli*), *Citrobacter* (типичный представитель *Citr. coli citrovorum*), *Enterobacter* (типичный представитель *Ent. aerogenes*), которые, благодаря общности морфологических и культуральных свойств объединены в одно семейство *Enterobacteriaceae* [13].

Основные методы определения содержания колиформных бактерий описаны в МУК 4.2.1018-01 «Санитарно – микробиологический анализ питьевой воды. Методические указания» и МУ 2.1.4.1184-03. 2.1.4.

«Питьевая вода и водоснабжение населенных мест». Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-02 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества». В данных методических указаниях приведены два метода определения содержания колиформных бактерий:

1.Метод мембранной фильтрации - основан на фильтрации установленного объема воды через мембранные фильтры, выращивании посевов на дифференциальной питательной среде с лактозой и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим свойствам.

2.Титрационный метод - основан на накоплении бактерий после посева установленного объема воды в жидкую питательную среду с последующим пересевом на дифференциальную плотную питательную среду с лактозой и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам.

Авторы [14] определяли колиформные бактерии путем фильтрации трех объемов воды (25, 100 и 333 мл) через нитроцеллюлозные фильтры, которые затем помещали на диагностическую среду Эндо. Чашки с фильтрами инкубировали при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение  $24\pm 2$  ч. Сходная работа представлена авторами [15]. В работе показан способ определения *E.coli*, основанный на пропускании проб воды через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы, на котором оседали бактерии, впоследствии подвергавшиеся культивированию. После культивирования готовили серийные разведения, которые высевались на агар с метиленовым синим и эозином. Через 24 часа колонии *E.coli* определяли по морфологическим и физиологическим особенностям.

Широко распространены нетрадиционные способы определения колиформных бактерий в воде и других объектах.

Авторами [16] предлагается способ определения содержания кишечной палочки в морской воде. В основе способа лежит культивирование бактерий

в специальных трубках, в которые помещали серийно разведенные пробы и культивировали на среде Eiken Chemical в течение 24 часов при температуре 44,5°C. При наличии роста бактериальной массы в трубках, делали вывод о присутствии в пробе бактерий *E.coli*. В работе [17] представлен многостадийный процесс определения содержания бактерий в воде. На первом этапе в пробы воды добавляли соли лантана, железа или алюминия в качестве флокулянтов и подвергали центрифугированию с целью концентрирования бактерий. На втором этапе, после центрифугирования, образовавшийся надосадочный слой снимали и обрабатывали соляной кислотой и ЭДТА для восстановления клеток бактерий и нейтрализации ионов металлов. Далее, обработанный объем воды отфильтровывали, после чего определение бактерий проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР широко используется для определения бактерий. Авторы работы [18] используют для определения бактерий *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.* в воде курортных зон метод ПЦР с обратной транскрипцией. Способ заключается в превращении одноцепочечной молекулы РНК в комплиментарную ДНК, которая далее подвергается амплификации как в традиционном ПЦР анализе. В работе [19] представлен способ определения штамма O157:H7 бактерий *E.coli* в воде, основанный на определении наличия гена Шига-токсина методом ПЦР.

В патенте [20] представлен метод определения бактерий группы кишечных палочек в продукции животного происхождения (мясная продукция, молочная продукция), по изменению цвета жидкой питательной среды Кода или ХБ. Проба выдерживалась в течение 5-8 часов при температуре 18 – 25°C. Определение изменения цвета среды проводилось визуально или фотометрически. В работе [21] показан метод определения бактерий *E.coli* в продуктах питания, с использованием микротитровальных планшетов, стандартных чашек Петри и мини-пластин. Культивирование

проводили в питательном агаре при температуре  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Подсчет колоний осуществлялся методом цифровой микроскопии

Авторы [22] оценивали присутствие и количество бактерий *E.coli* в поверхностных водах по интенсивности колориметрического сигнала, получаемого от пробы. Было установлено, что при малейшем загрязнении бактериями исследуемой воды, через 5 – 17 часов культивирования наблюдается увеличение выработки тепловой энергии за счет роста содержащихся в воде бактерий. По степени выработки тепловой энергии определяли количество бактерий в воде.

В работе [23] представлен способ определения количества бактерий, основанный на измерении количества микробного АТФ. Количество микробного АТФ определяли, как разница между количеством общего и свободного АТФ. Количество общего АТФ измеряли люминесцентным методом при добавлении к пробе лизирующего реагента, а затем люциферазы, при этом происходит химическая реакция и выделение кванта излучения, которое фиксирует прибор. Количество свободного АТФ измеряли без предварительного лизиса клеток, а только при добавлении люциферазы. Вызывает интерес работа [24], в которой для определения *E.coli* в воде использовалась бумага для иммунологического анализа, на которую иммобилизовали антитела для захвата бактерий. Затем специальным промывочным раствором удаляли не задержавшиеся на поверхности бактерии. Далее, полученную бумагу обрабатывали в темноте раствором с ионами серебра, высушивали и сканировали при помощи обычного сканера.

Несмотря на широкое распространение методов определения отдельных штаммов бактерий в различных объектах, задача выделения этих штаммов из общего числа микроорганизмов является сложной и трудоемкой, поэтому достаточное распространение получили методы определения общего содержания бактерий в различных объектах.

### 1.5.2 Определение общего содержания бактерий

Для определения общего количества микроорганизмов широкое применение находит метод посева анализируемого субстрата на питательные среды с последующим культивированием. Такой метод называется чашечный метод Коха (рис.4). В основе данного метода лежит принцип Коха, согласно которому одна клетка образует одну колонию. На основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду (мясо-пептонный агар, МПА) определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов [25].

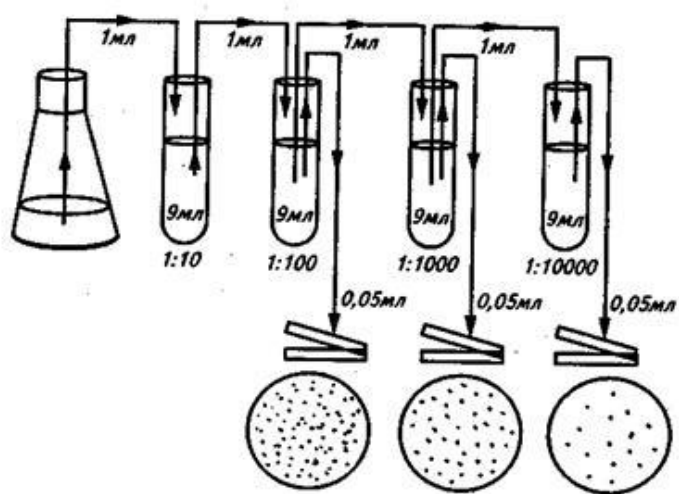


Рис.4. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов

В чашку Петри с подсушенной средой вносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стеклянным шпателем по поверхности среды. Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, причем из каждого делают от двух до четырех параллельных высевок. Посевы можно делать одной пипеткой, но при этом начинать следует обязательно с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз [26, 27].

После инкубации на питательной среде в чашках Петри может наблюдаться следующая картина (рис.5).

Данный показатель носит название «микробное число» и выражается количеством колоний, вырастающих на МПА из 1 мл (1 гр) исследуемого материала.

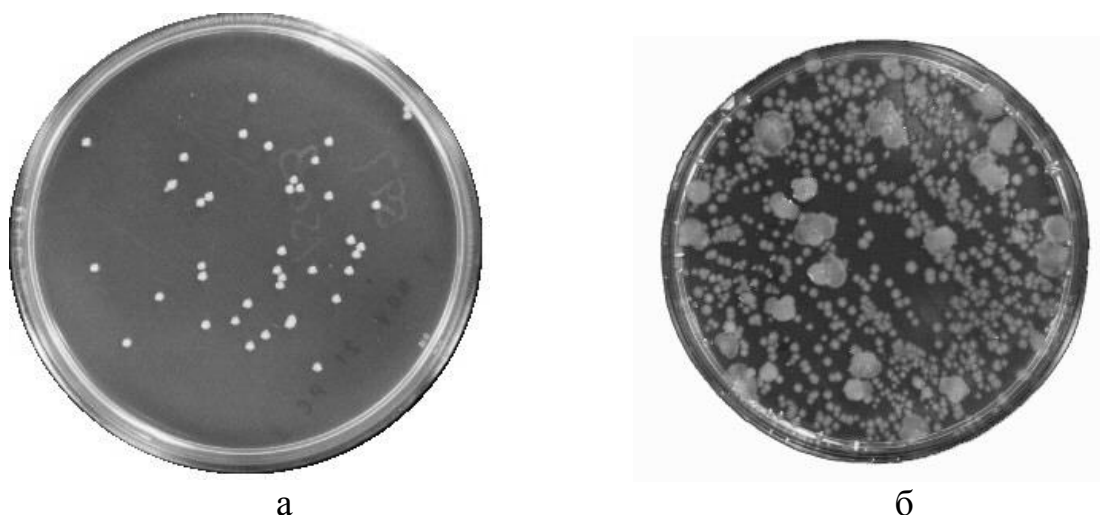


Рис.5. Положительный тест на содержание бактерий в исследуемой пробе.

а – низкое микробное число, б – высокое микробное число.

Микробное число соответствует содержанию в анализируемом материале аэробных метатрофных мезофильных микроорганизмов, среди которых преобладают сапрофитные бактерии [28].

В обзоре [29] авторами рассмотрены методы определения гетеротрофных бактерий в питьевой воде путем посева исследуемого образца на твердую питательную среду с последующим культивированием при температуре от 20°C до 37°C в течении различных промежутков времени (от нескольких часов до нескольких суток). Для повышения чувствительности такого подхода в питательную среду добавляли различные ферменты, которые при контакте с определенными микроорганизмами вызывают видимое изменение цвета анализируемой пробы. Авторами [30] применен

метод Коха для определения количества энтерококковых микроорганизмов в воде путем культивирования исследуемой пробы воды в питательном агаре в течение 18 – 24 часов при температуре 44,5°C.

Известно, что сред, пригодных для роста всех микроорганизмов не существует, метод высева дает возможность определить число микроорганизмов, способных расти на среде данного состава, но не позволяет учесть те микроорганизмы, которые не растут или растут крайне медленно [25,32], следовательно, количество микробов, вырастающих на МПА, оказывается во много раз меньше, чем их истинное содержание в высеваемом субстрате.

В отличие от микробного числа, существует понятие «общее число микробов» в исследуемом субстрате, которое определяется прямым микроскопированием [28]. Метод прямого счета бактерий позволяет более точно, чем культуральные методы, оценить общую численность микроорганизмов.

Традиционные методы прямого счета клеток можно разделить на четыре группы:

1. Подсчет клеток в счетных камерах
2. Подсчет клеток с использованием счетных капилляров
3. Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках (метод Виноградского-Брида)
4. Подсчет клеток на мембранных фильтрах

На ранних этапах развития микроскопических методов микробиологического анализа воды, анализируемую воду помещали на предметное стекло и испаряли, оставляя клетки на поверхности. В дальнейшем развитие получили прямые методы с использованием мембранных фильтров из нитроцеллюлозы. Такие фильтры позволили определять даже минимальные содержания бактерий в воде [32].

Подсчет клеток в счетных камерах применяется для определения относительно крупных объектов, таких как клетки водорослей, дрожжей, спор грибов. Содержание клеток в исследуемом субстрате должно быть не менее  $1 \cdot 10^6$ . Так же необходимо учитывать, что в счетных камерах подсчитываются как живые клетки, так и мертвые. Число клеток подсчитывают с объективом 8х (10х). Счетные камеры могут иметь разные конструкции (Горяева, Фукс-Розенталя, Петрова-Хауссера, Тома-Цейса и др.) [26,33,34]. Счетные капилляры, разработанные Б.В.Перфильевым, по принципу подсчета аналогичны счетной камере, однако при работе с ними можно использовать объективы с большим увеличением. Благодаря этому, капиллярный метод прямого счета позволяет подсчитывать мелкие микроорганизмы. Такой метод находит применение для бактериологического контроля в пищевой промышленности и медицинской микробиологии [25].

Подсчет клеток на фиксированных окрашенных мазках преимущественно применяется для определения численности микроорганизмов в естественных субстратах - почве, воде, оптически непрозрачных средах. Для анализа готовят препарат, который наносят на предметное стекло, помещенное на миллиметровую бумагу. Исследуемую субстанцию равномерно распределяют по поверхности предметного стекла, подсушивают на воздухе, фиксируют 96%-ным спиртом и окрашивают красителем. Затем препарат промывают и микроскопируют [26].

Подсчет клеток на мембранных фильтрах применяется для анализа субстратов с низкой плотностью клеток, поскольку фильтрование пробы известного объема позволяет сконцентрировать клетки микроорганизмов на поверхности фильтра. После этого клетки окрашиваются и подсчитываются под микроскопом [26]. Окрашивание производится карболовым эритрозином.

Также, на практике широко распространена люминесцентная микроскопия. Для нее используются нефлуоресцирующие фильтры, препарат окрашивается акридином оранжевым или другим флуоресцирующим

красителем. Преимущество этого способа перед обычным микропированием в том, что окрашенные флуорохромами клетки более четко видны на темном фоне препарата, подсчет проводится более точно, так как клетки бактерий легко отличимы от небиологических объектов (частицы почвы, ила и т.д. [25]. В работе [35] представлен способ прямого подсчета клеток с использованием флуоресцентной микроскопии. Исследуемый материал пропусклся через фильтры и окрашивался красителем акридиновым оранжевым. Фильтры, на которых оседали окрашенные клетки, исследовались под микроскопом, оснащенным УФ лампой для возбуждения флуоресценции.

Существует множество альтернативных косвенных методов определения содержания бактерий, без применения питательных сред и микроскопии. В работе [36] описывается способ определения качества воды, основанный на исследовании устойчивости к антибиотикам содержащихся в воде бактерий. По увеличению количества популяций таких микроорганизмов судят о неблагоприятном состоянии водного источника. Высокую экспрессность микробиологического анализа можно достичь, используя способ проточной цитометрии (рис.6). Данный метод основан на измерении светорассеяния частицами, содержащимися в исследуемом объекте или на флуоресценции химических соединений, входящих в состав клеток, или внесенных в образец непосредственно перед анализом.

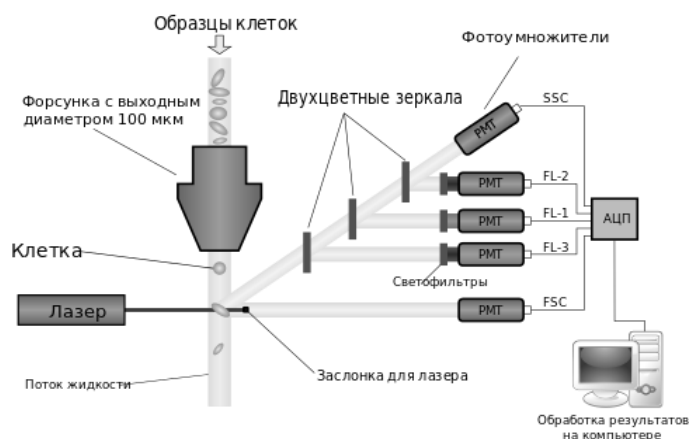


Рис.6. Схема оборудования для проведения проточной цитометрии

Такой способ представлен в работах [37,38], где пробы воды перед измерением предварительно окрашивали флуоресцентным индикатором двухцепочечной ДНК «SYBR Green I». Количество бактерий оценивали по интенсивности флуоресценции, фиксированной на длине волны 533 нм. Методы спектроскопии часто используются для определения содержания бактерий в различных объектах.

Авторы [39] для определения в воде присутствия бактерий рода *Legionella* использовали метод Рамановской микроспектроскопии. Предварительно бактерии культивировали в течение 72 ч на среде с добавлением пирофосфата железа, L-цистеин гидрохлорида и  $\alpha$ -кетоглутарата. Далее бактериальную суспензию подвергали центрифугированию, супернатант убирали, а клетки подсушивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Полученный материал подвергали возбуждению длинной волны 532 нм, каждая клетка давала свой спектр рассеяния, при наложении множества спектров отдельных клеток друг на друга на выходе формировалось Рамановское изображение.

Авторы [40] показали способ косвенного определения содержания бактерий в воде в процессе ее подготовки по количеству кислорода в системе. Было установлено, что для замкнутых циклов увеличение количества кислорода в системе свидетельствует об увеличении популяции бактерий. Данный способ является простым и экспрессным, однако, подходит только для замкнутых систем технологических процессов.

Для анализа воды из природных источников находит применение метод прямой потенциометрии с применением йодидселективных электродов [41]. Метод заключается в пропускании зараженной воды через бактерицидную ионообменную смолу, при этом выделяется положительно заряженный ион-радикал, нейтрализующий отрицательный заряд клеток, приводя к их гибели. В результате в водной среде накапливаются йодид-ионы, количество которых пропорционально количеству микробных клеток. В качестве зараженной

воды использовали воду с добавлением бактерий *E.coli*, однако, данный метод может быть применен к определению любых типов микроорганизмов, обитающих в воде.

Традиционные методы определения содержания бактерий по сей день широко используются для анализа состояния окружающей среды. Наряду с традиционными методами, большое распространение получили косвенные инструментальные методы анализа, однако такие методы зачастую обладают рядом недостатков, такими как дорогостоящее оборудование, сложная пробоподготовка, длительное время анализа.

Наиболее активно развивающимся методом анализа состояния окружающей среды является метод флуориметрии. Высокая чувствительность, селективность, экспрессность делают этот метод незаменимым при анализе содержания микрокомпонентов и микропримесей в субстратах различной природы.

## 1.6 Люминесценция

Люминесценцией называется свечение атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в нормальное [42]. Схематично этот процесс можно представить в виде диаграммы Яблонского (рис.7)

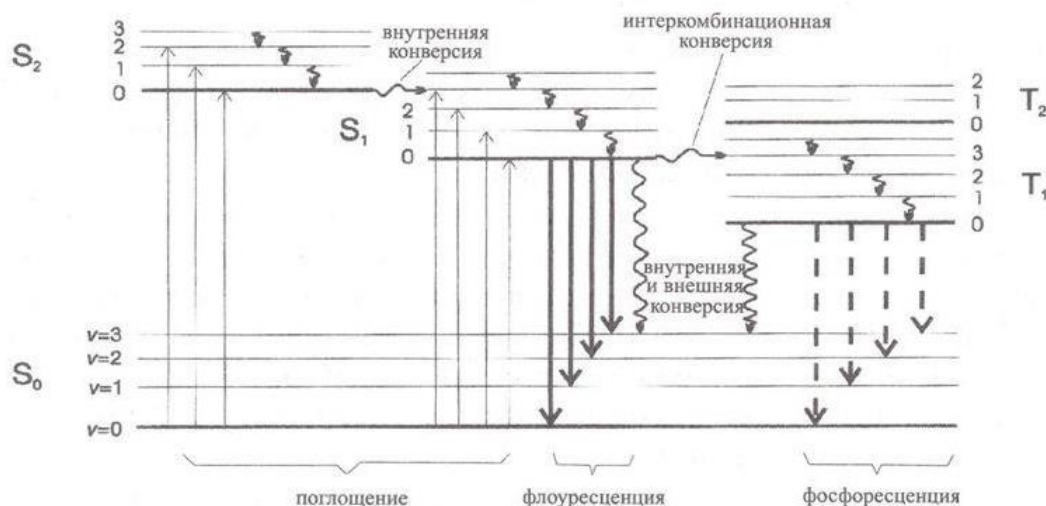


Рис.7. Диаграмма Яблонского

Вещества, способные излучать люминесценцию называются люминофорами. Наибольшее распространение на практике получила фотолюминесценция – явление, при котором свечение возникает под действием кванта света. Данный вид люминесценции является наиболее применимым на практике, так как есть возможность контролировать условия проведения анализа путем варьирования длин волн возбуждения [43 - 45]. Выбирая определенную длину волны возбуждающего света, можно подвести энергию к определенному компоненту химической системы и избавиться, таким образом, от осложнений, возможных в случае поглощения энергии всей системой.

При комнатной температуре большинство молекул находится на самом нижнем колебательном уровне основного электронного состояния. При действии на молекулу возбуждающего излучения, она попадает на верхний колебательный уровень любого возбужденного состояния, однако, процесс испускания всегда происходит с нижнего уровня первого возбужденного состояния и поэтому форма спектра люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего света. Это явление известно как правило Вавилова [46-49].

Существует несколько типов электронных переходов (Таблица 3). Каждому типу электронного перехода соответствует положение полосы в спектре.

Таблица 3.

Типы электронных переходов в молекулах

| Тип перехода        | Описание                                                       |                                                       |              |                                                  |
|---------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------|
|                     | Структура полос                                                | Влияние полярности растворителя                       | Кислая среда | Положение полосы в спектре                       |
| $\sigma - \sigma^*$ |                                                                |                                                       |              | дальняя УФ-область, от 100 до 200 нм             |
| $\pi - \pi^*$       | заметна в большинстве растворителей;                           | переходы сдвигаются в bathochromную сторону (красную) | не влияет    | средняя и ближняя УФ-область, от 130 до 300 нм   |
| $n - \pi^*$         | отчетливая в неполярных растворителях; размазанная в полярных; | переходы сдвигаются в гипсохромную (синюю) область    | исчезает     | ближняя УФ-область или видимая; от 250 до 500 нм |
| $n - \sigma^*$      |                                                                |                                                       |              | средняя УФ-область, от 190 до 250 нм             |

$\sigma - \sigma^*$  переход характерен для соединений с насыщенными углерод-углеродными связями (алканы, циклоалканы). Для осуществления этого перехода требуется наибольшая энергия.

Значительно меньшей энергии требуют  $\pi - \pi^*$  переходы, которые характерны для ненасыщенных соединений. Интенсивность полос этого электронного перехода максимальная.

Переход  $n - \pi^*$  характерен для кислород, азот, серо- и галогенсодержащих соединений, проявляющийся в ближней УФ области (~200-250 нм).

Переход  $n - \sigma^*$  является запрещённым, поэтому его интенсивность всегда мала (характерен для карбонильных соединений).

Длина волны, на которой происходит поглощение света веществом, зависит от наличия в нем определенных двойных связей и от их числа.

Группы атомов, вызывающие поглощение в УФ и видимой областях спектра получили название хромофорных; они содержат кратные связи или атом со свободной парой электронов ( $C=O$ ,  $NO$ ,  $N=N$ ). Помимо хромофорных групп, в протекании люминесценции принимают участия ауксохромные группы – это функциональные группы, не имеющие собственного поглощения, однако их введение в вещество с хромофорными группами может усиливать сигнал или приводить к смещению сигнала вдоль оси длин волн ( $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-SH$  и др.) [50-52].

### **1.6.1 Применение люминесцентного анализа**

Люминесцентные методы анализа включают в себя исследования с использованием флуоресценции (флуориметрия) и фосфоресценции (фосфориметрия).

В аналитических целях люминесцентный анализ применяется для идентификации веществ, для обнаружения малых концентраций веществ, для контроля изменений, претерпеваемых веществом, для определения степени чистоты веществ. Высокая чувствительность метода позволяет фиксировать малую степень превращения веществ, а иногда по люминесценции промежуточных соединений становится возможным установить механизм химической реакции.

Известно, что интенсивность флуоресценции биологических объектов незначительна из-за малой величины квантовых выходов и низкой концентрации флуоресцирующих компонентов. Чтобы это компенсировать требуется увеличение чувствительности измеряющей аппаратуры, тщательная фокусировка света, выбор оптимальных условий регистрации флуоресценции, позволяющих исключить влияние возможных примесей, оптики и «паразитного» свечения кювет [53].

Образование соединений многих не люминесцирующих в водных растворах катионов с молекулой органического реагента сопровождается изменением или появлением люминесценции этого реагента. Например, ион натрия с цинк-уранилацетатом дает зелено-желтую люминесценцию, а бериллий с морином образует комплекс, люминесцирующий ярко-зеленым цветом [54]. Задача качественного анализа усложняется, когда смесь состоит из нескольких люминесцирующих веществ; в этом случае применяют светофильтры или сочетание люминесцентного анализа с хроматографическим. Наиболее избирательные методы анализа основаны на спектральном разложении света люминесценции и изучения спектральных характеристик люминесценции спектрофотометрическим методом.

Количественный люминесцентный анализ — основан на зависимости между интенсивностью люминесценции и концентрацией анализируемого вещества, т. е. на пропорциональности интенсивности люминесценции количеству поглощающих и излучающих центров и доле поглощенного света. Флуометрические измерения выполняются как визуально, так и с помощью аппаратурных методов регистрации возникающего излучения [55].

Наиболее широко люминесцентные измерения используются как методы анализа протекающих биохимических и химических реакций, а также для кинетических исследований быстрых реакций электронно-возбужденных молекул. Особую роль данный метод играет в микробиологических исследованиях. Известно, что все микроорганизмы содержат в своем составе компоненты, способные к флуоресценции в различных областях. В УФ области — это белки и нуклеиновые кислоты, в видимой области — коферменты метаболизма, в ближней ИК области — порфирины, цитохромы. Рассматривая различные классы бактерий можно выделить один компонент, общий для всех микроорганизмов — это кофермент процесса метаболизма никотинамидадениндинуклеотид (NADH).

## 1.7 Ферменты и коферменты метаболизма

Ферменты – это простейшие единицы метаболической активности; каждый из них катализирует какую-нибудь одну химическую реакцию. Продукты последовательных превращений, объединяемых в данный метаболический путь называются промежуточными продуктами или метаболитами [56,57]

Коферменты – вещества небелковой природы, выступающие в роли дополнительных реагентов, специфически соединяющиеся с соответствующими белками, и играющие роль активного центра или простетической группы молекулы фермента. Во многих случаях коферменты служат также переносчиками – катализаторами, которые попеременно принимают и отдают химические группы, атомы водорода или электроны [58]. Коферменты можно разделить на три группы:

1.Соединения с высоким потенциалом химических групп, такие как АТФ (аденозинтрифосфат) и ГТФ (гуанозинтрифосфат), которые участвуют в трансформации энергии в клетках.

2.Соединения, являющиеся производными витаминов, которые находясь в активном центре фермента, взаимодействуют с субстратом и так изменяют его структуру, что его реакционная способность повышается. К таким соединениям относятся кофермент А (CoA), коферментные формы витамина B<sub>12</sub> и т.д.

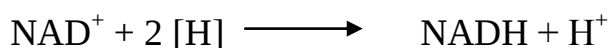
3.Окислительные коферменты (коферменты переноса водорода), в состав которых входят особые структуры со строго определенным окислительно-восстановительным потенциалом.

### 1.7.1 Коферменты переноса водорода

В начале XX века было установлено, что два удаляемых протона водорода от окисляемых веществ перемещаются на водородпереносящие коферменты, такие как никотинамидадениндинуклеотид (НАД, NAD),

никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФ, NADP), флавинадениндинуклеотид (ФАД, FAD) и рибофлавин-5-фосфат (флаavinмононуклеотид, ФМН, FMN) [58]. Данные коферменты распространены как коферменты дегидрогеназ, они действуют всегда в растворимой форме и переносят гидрид-ион [59].

Происходит эта реакция следующим образом:



Флавиновые коферменты построены на основе витамина рибофлавина, а пиридиновые нуклеотиды – на основе никотинамида.

Существование двух пиридиновых нуклеотидов ( $\text{NAD}^+$  и  $\text{NADP}^+$ ), отличающихся друг от друга только наличием фосфатной группы у последнего, участвуют в двух различных окислительно – восстановительных системах при различных окислительно – восстановительных потенциалах, но в одном и том же участке клетки. Функции этих коферментов заключаются в том, что  $\text{NAD}^+$  чаще всего является окислительным агентом при отщеплении атома водорода от субстратов, а  $\text{NADP}^+$ , восстанавливаясь до NADPH, выступает в качестве восстановителя в биосинтетических процессах [58].

Являясь непосредственным участником процесса метаболизма, сходный для всех бактерий метаболит NADH может быть использован как маркер жизненной активности бактериальной клетки.

### 1.7.2 Строение и свойства никотинамидадениндинуклеотида

NADH представляет собой сложную молекулу, в состав которой входят аденин, никотинаимд, дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты [60]. NADH является бихромофором, значимыми для спектрального анализа фрагментами молекулы являются аденин и модифицированный никотинамид (рис.8)

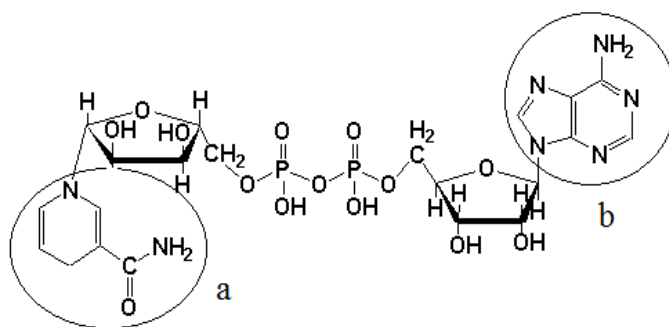


Рис.8. Структурная формула NADH, а – фрагмент никотинамида, б – фрагмен аденина

Никотинамидадениндинуклеотид может находиться в окисленной (NAD) и восстановленной (NADH) формах. Схема восстановления NADH представлена на рисунке 9.

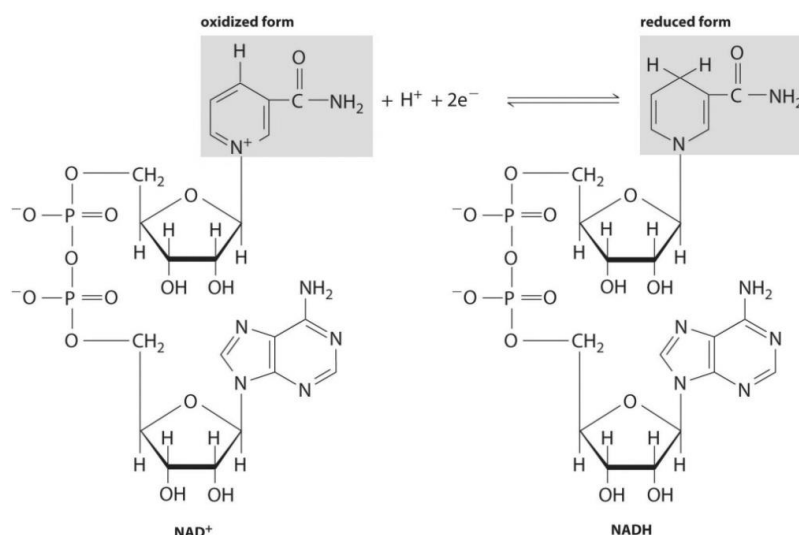


Рис.9. Восстановление кофермента NADH

Окисленная форма имеет спектр поглощения с максимумом 260 нм. При переходе в восстановленную форму появляется полоса поглощения с максимумом 340 нм и способность флуоресцировать (рис.10). Это обусловлено исчезновением одной двойной связи в никотинамидном комплексе кофермента при его восстановлении [61]

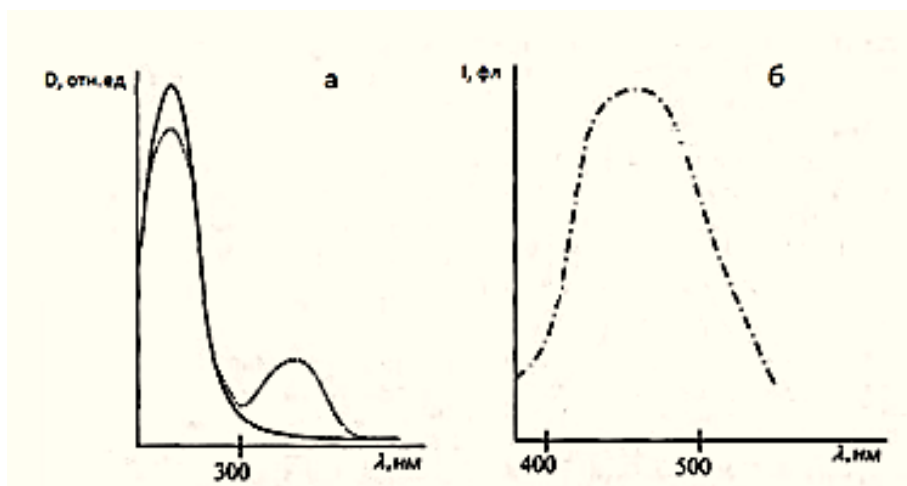


Рис.10. Спектр поглощения (а) и флуоресценции (б) NADH

Максимум полосы флуоресценции лежит в области 465 – 480 нм. Известно, что концентрация кофермента NADH является важным физиологическим показателем, так как он принимает участие в клеточном метаболизме и такие изменения как перевод клетки из аэробного в анаэробное состояние, действие на нее специфических субстратов и ингибиторов окислительных систем, изменение физиологического состояния повлияют на содержание NAD/NADH [62,63].

### 1.8 Метаболизм бактерий

Метаболизм всех бактерий проходит по одному и тому же пути – пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (рис.11)

Исходный субстрат (например, глюкоза) поступает через плазматическую мембрану вовнутрь клетки по средствам протекания реакции фосфорилирования глюкозы в глюкозо-6-фосфат.

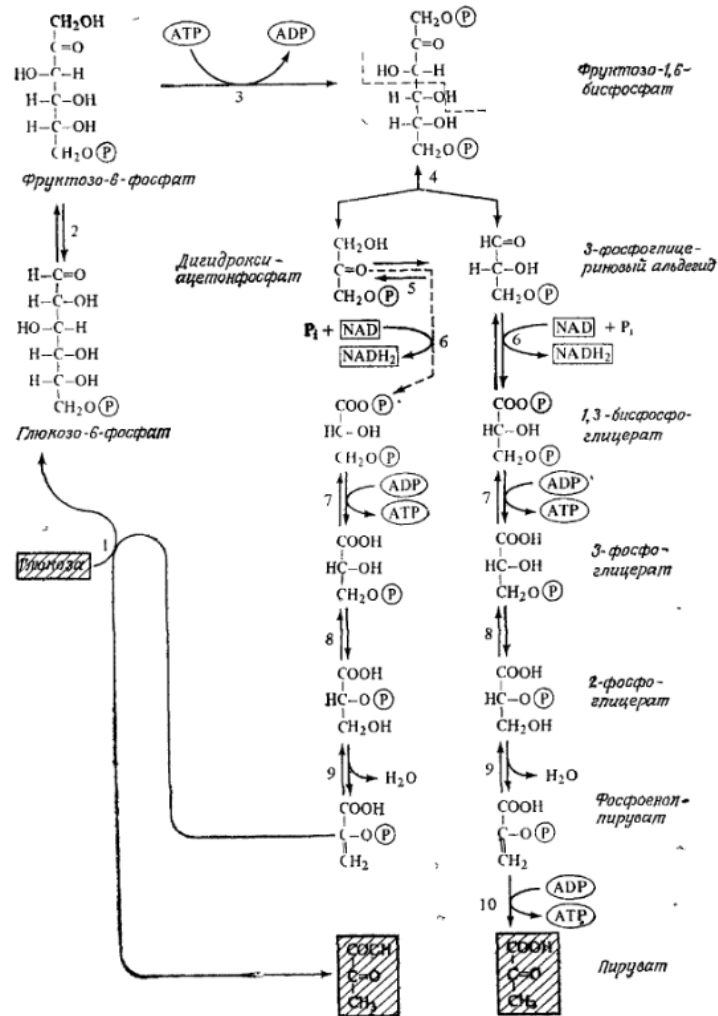
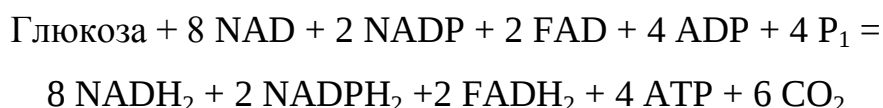


Рис.11. Путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса

После транспорта глюкозы через цитоплазматическую мембрану, образовавшийся глюкозо-6-фосфат под действием ферментов глюкозофосфат-изомеразы и фосфофруктокиназы превращается во фруктозо-1,6-бисфосфат, который далее распадается на дигидрооксиацетонфосфат и 3-фосфоглицериновый альдегид под действием фермента фруктозобисфосфат-альдолаза. Дальнейшее превращение образовавшихся С<sub>3</sub> веществ идет через окисление 3-фосфоглицеринового альдегида под действием фермента глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа с образованием 1,3-бисфосфоглицерата. Далее, под действием фермента 3-фосфоглицераткиназа 1,3-бисфосфоглицерат превращается в 3-фосфоглицерат, данная реакция

сопровождается высвобождением молекулы АТФ (аденозинтрифосфат). Далее, 3-фосфоглицерат превращается в фосфоенолпируват, а затем, под действием фермента пируваткиназа в пируват, на этой стадии также высвобождается молекулы АТФ. Дальнейшая судьба пирувата зависит от наличия кислорода в среде. В анаэробных условиях происходит процесс брожения, а в аэробных – из пирувата образуется ацетил-СоА (ацетилкофермент А), который в дальнейшем поступает в цикл трикарбоновых кислот, где расщепляется до конечных продуктов: углекислого газа и восстановленных форм коферментов [64]. Общее уравнение метаболизма описывается следующим образом:



Поскольку все бактерии обладают схожим метаболизмом, для исследования свойств и поведения внутриклеточного NADH в различных условиях, были выбраны наиболее простые, безопасные и хорошо изученные молочнокислые бактерии.

### 1.9 Характеристика лактобактерий

Лактобациллы (лактобактерии, молочнокислые бактерии) — грамположительные, микроаэрофильные бактерии (рис.12). Обладают сахаролитическим характером метаболизма, расщепляя углеводы с образованием органических кислот [65,66].



Рис.12. Чистая культура *Lactobacillus* окраска по Граму

Лактобациллы входят в группу молочнокислых микроорганизмов, включающую представителей 11 родов: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Camobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Oenococcus* [67]. В зависимости от количества потребляемых кисломолочных продуктов, в организме человека может содержаться от  $1 \cdot 10^6$  до  $1 \cdot 10^8$  бактерий в 1 г [68].

Продукция органических кислот, пероксида водорода и образование антибиотикоподобных веществ обеспечивают антагонистические свойства лактоабктерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Механизм проявления антагонистических свойств можно описать следующим образом: образование органических кислот приводит к снижению pH среды, что предотвращает рост и развитие других микроорганизмов. Пероксид водорода, который так же образуется в результате метаболизма, подавляет рост бактерий за счет сильного окислительного действия на молекулярные структуры их белков [69]. Известно, что основным процессом, обеспечивающим взаимоотношения макро- и микроорганизмов, является адгезия. Адгезивность бактериальных клеток к эукариотическим является одним из механизмов защитного действия представителей микрофлоры ЖКТ. Имеются сведения, что у грамположительных бактерий, в том числе у лактобацил, бифидобактерий и пропионовокислых бактерий, адгезинами являются липитейхоевые кислоты или лектины, входящие в состав их клеточных стенок [70].

На основании продукции молочной кислоты из глюкозы, ферментации фруктозы, потребности в тиамине и продукции фруктозодифосфатальдозазы они делятся на две группы: гомо- и гетероферментативные. При гомоферментативном брожении из исходного субстрата образуется преимущественно молочная кислота. При гетероферментативном брожении наряду с молочной кислотой образуется этанол, углекислый газ, уксусная кислота и т.д [71].

Обладая высокой функциональной и биологической активностью, лактобактерии нашли практическое использование не только в медицине, но и в производстве пищевых продуктов в качестве полезной пробиотической добавки к йогуртам, молоку, кефиру и т.д.

## **Постановка задачи исследования**

Как показал литературный обзор, одним из важных показателей качества воды является «общее число бактерий», который, наиболее полно отражает бактериальную загрязненность исследуемого объекта. Определение общего числа бактерий проводится несколькими методами, каждый из которых обладает определенными недостатками, например, метод прямого микроскопирования является достаточно трудоемким, так как включает стадии приготовления препарата, фиксацию, окрашивание и т.д; метод проточной цитометрии является дорогостоящим и его применение экономически целесообразно только в случае проведения большого числа анализов; метод нефелометрии обладает строгими требованиями к прозрачности питательной среды и ограниченному количеству клеток.

Таким образом, необходимость создания новых подходов, направленных на сокращение времени анализа, его стоимости, трудовых затрат, является актуальной задачей.

## ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

### 2.1 Приборы, объекты исследования и реактивы

#### 2.1.1 Оборудование

Экспериментальные исследования в данной работе проводились на спектрофлуориметре «Флюорат-02 Панорама» (г. Санкт-Петербург) в комплекте с персональным компьютером.

Спектрофлуориметр состоит из источника, имеющего непрерывный спектр в видимой и УФ областях, монохроматор для выделения требуемой длины волны возбуждения, держателя образца и второго монохроматора с фотоумножителем для анализа света флуоресценции (рис. 13).

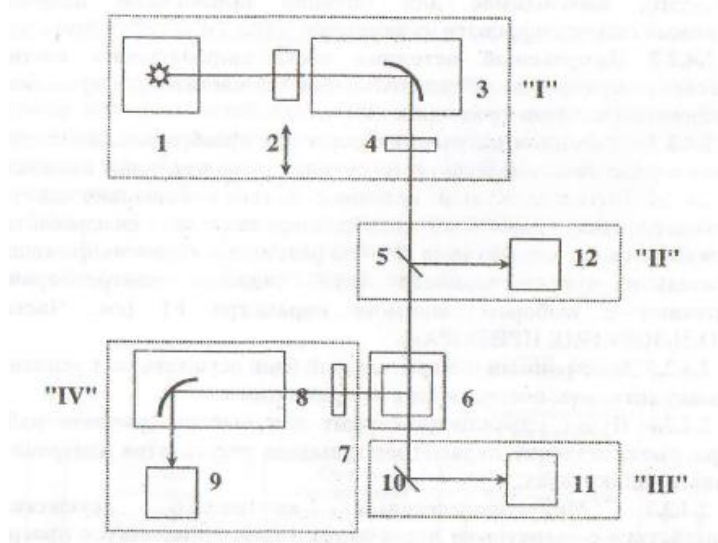


Рис.13. Оптическая схема спектрофлуориметрического анализатора «Флюорат-02-Панорама»: 1 - источник излучения; 2 - устройство отсечки второго порядка дифракции; 3 - монохроматор осветительного канала (возбуждения); 4 и 7 - светофильтры каналов возбуждения и регистрации люминесценции; 5 и 10 - светоделительные пластины; 6 - кювета с анализируемой пробой; 8 - монохроматор флуориметрического канала; 9 - фотоприемник флуориметрического канала (ФЭУ); 11 - фотоприемник

канала пропускания (фотометрического); 12 - фотоприемник опорного канала.

«Флюорат-02 Панорама» - классический исследовательский спектрофлуориметр. При флуориметрических исследованиях производится измерение спектральных характеристик возбуждения и/или испускания люминесценции исследуемых объектов в момент воздействия импульсов возбуждающего света. При исследовании задержанной люминесценции (фосфоресценции) анализируется кинетика затухания свечения при заранее выбранных условиях возбуждения и регистрации люминесценции. Дискретность изменения параметров кинетических изменений 0,05 мкс. Максимальная длительность измерительного строба 8000 мкс. При исследовании хеми- или биолюминесценции регистрируется интенсивность собственного свечения образца, вызванного химическими или биологическими процессами в нем. Максимальная частота наблюдения за объектом 50 Гц. Возможны также измерения с автоматическим усреднением по выбранным интервалам. Погрешность установки монохроматоров не более 3 нм. Отношение сигнал/шум - 100/1

Прибор может использоваться в качестве внешнего спектрофлуориметрического детектора систем ВЭЖХ с возможностью перенастроек монохроматоров для детектирования очередного пика в оптимальных условиях его регистрации. При регистрации хроматограмм реализован режим быстрого спектрального сканирования во время выхода пика без остановки потока элюента и без потери точности количественного определения анализируемого вещества.

При фотометрических исследованиях проводятся измерения спектральных характеристик поглощения зондирующего излучения в анализируемых объектах. Широкое использование жгутов волоконных световодов, соединяющих спектрофлуориметр с различными приставками,

позволяет создавать специализированные аналитические комплексы, ориентированные на исследование спектрально-временных характеристик объектов, не помещающихся в кюветное отделение прибора, в том числе объектов, замороженных до температуры жидкого азота. Спектральные области в каналах возбуждения и регистрации люминесценции анализатора задаются встроенными светосильными монохроматорами. Монохроматоры управляются независимо. Аналитик может запрограммировать любую функцию их состояний в процессе измерения, в частности, можно проводить синхронное сканирование спектров. Оригинальная оптическая схема обеспечивает высокую чувствительность прибора, особенно в ультрафиолетовой области спектра, где фильтровая спектральная селекция затруднена. Как сертифицированный анализатор, спектрофлуориметр «Панорама» применяется для аналитического контроля объектов окружающей среды, санитарного контроля и контроля технологических процессов.

Подготовка и проверка работы спектрофлуориметра «Панорама» производили в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

Взвешивание точной навески вещества проводили на лабораторных аналитических весах общего назначения с погрешностью взвешивания  $\pm 0,0002$  г.

В работе была использована мерная лабораторная стеклянная посуда: колбы наливные вместимостью 25, 50, 100 и 250 мл; цилиндр вместимостью 20 мл.

Добавки исследуемых веществ осуществляли при помощи дозатора типа ДО-100-1000 с дискретностью установки доз 5 мкл и погрешностью не более 1,5 % отн.; дозатора типа ДО-20-200 с дискретностью установки доз 1 мкл и погрешностью не более 3 % отн. Для каждого раствора какого-либо вещества использовали отдельную пипетку или сменный наконечник дозатора.

Чистоту кювет определяли методом люминесцентного анализа. Перед началом каждой серии опытов снимали спектр фонового растворителя, с целью контроля его чистоты и чистоты посуды. В случае отсутствия пиков на спектре люминесценции, растворитель и посуда считались чистыми.

Для проведения экспериментальных исследований в работе использовали кварцевые кюветы объемом 4 мл с объемом анализируемой пробы 3 мл и длиной оптического пути 10 мм.

### **Приготовление фоновых и исследуемых растворов**

Воду, используемую в работе, очищали дистилляцией с использованием дистиллятора ДЭ-4.

Растворы исследуемых веществ готовили растворением навесок этих веществ, взвешенных с погрешностью не более 0,0002 г, в подходящем растворителе. Все используемые растворы готовились непосредственно перед работой.

#### **2.1.2 Объекты исследования**

Медицинский препарат «Лактобактерин», представляющий собой микробную массу живых, антагонистически активных лактобактерий штаммов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, или *L. plantarum* 38, или *L. fermentum* 90T-C4 или *L. fermentum* 39, лиофилизированную в среде культивирования с добавлением защитной сахарозо-желатиновой или сахарозо-желатино-молочной среды (произв. ФГУП «НПО «Микроген», Россия).

Медицинский препарат «Колибактерин» сухой представляет собой микробную массу живых бактерий кишечной палочки штамма M17, высушенных в среде культивирования с добавлением сахарозо-желатиновой защитной среды. (произв. ФГУП «НПО «Микроген», Россия).

### 2.1.3 Реактивы

Никотинамидадениндинуклеотид - стандартный образец (натриевая соль, произв. AppliChem, Германия).

Физраствор (натрия хлорид 0,9%)

Натрий двууглекислый (ГОСТ 2156-76)

Гуминовые кислоты

Железо треххлористое 6-водное (ГОСТ 4147 – 74)

Фенол (ГСО 7270 – 96 Стандартный образец состава раствора фенола)

Перекись водорода (ГОСТ 177 – 88)

Спирт этиловый 96% (ГОСТ 51652 – 2000)

## 2.2 Методика эксперимента

### 2.2.1 Исследование флуоресцентных свойств растворителя и стандартного раствора NADH

Дистиллированную воду, объемом 3 мл, помещали в кювету. Кювету устанавливали в кюветное отделение, закрывали крышку и снимали синхронный спектр исследуемого вещества в диапазоне длин волн 200 – 650 нм. Всю операцию повторяли не менее трех раз.

Далее в кювету помещали анализируемый стандартный раствор и снимали синхронный спектр в аналогичных условиях. На спектре выделяли длину волны с максимальным пиком, далее данную длину волны устанавливали в качестве длины волны возбуждения флуоресценции и снимали спектр регистрации со смещением 20 нм от значения длины волны возбуждения. Полученный спектр люминесценции применяли для качественного и количественного анализа вещества в реальном объекте.

## 2.2.2 Исследование флуоресцентных свойств медицинских препаратов

### Колибактерин

Суспензия препарата «Колибактерин» была приготовлена путем растворения содержимого ампулы в 15 мл физраствора. В кюветное отделение помещали кювету с анализируемым раствором, устанавливали длину волны возбуждения 360 нм и снимали спектр регистрации флуоресценции. Измерения проводили не менее пяти раз.

### Лактобактерин

Суспензия препарата «Лактобаткерин» была приготовлена путем растворения содержимого ампулы в 25 мл физраствора. В кюветное отделение помещали кювету с анализируемым раствором, устанавливали длину волны возбуждения 360 нм и снимали спектр регистрации флуоресценции. Измерения проводили не менее пяти раз.

## 2.2.3 Определение количества бактерий методом прямого счета клеток в камере Горяева – Тома.

Камера Горяева - Тома представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками (рис.14)

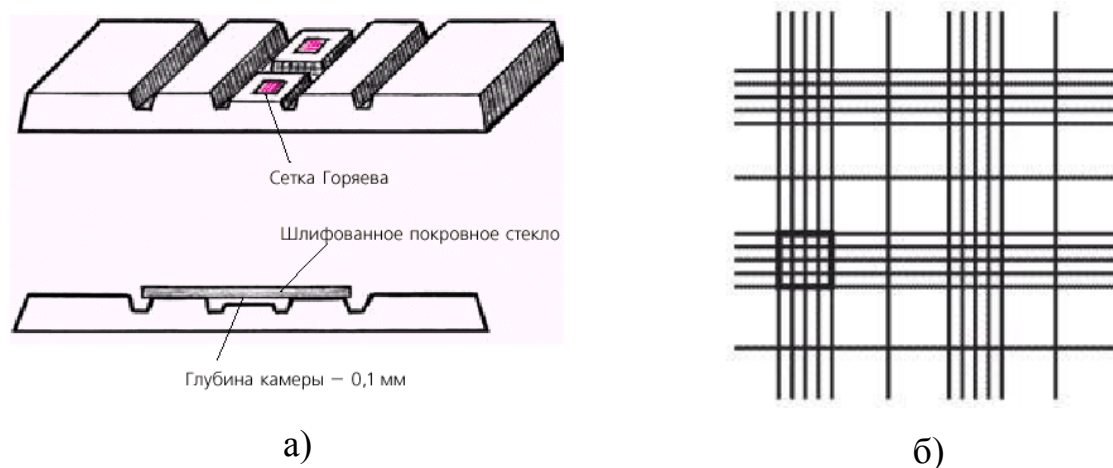


Рис.14. Счетная камера Горяева – Тома: а) вид сверху и сбоку; б) сетка камеры под малым увеличением микроскопа

Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка и боковые пластины, к которым притирается покровное стекло.

Перед началом работы покровное стекло притирали к боковым пластинам до появления колец интерференции, свидетельствующих о том, что стекло притерто к сторонам камеры. Камера позволяет проводить подсчет всех, содержащихся в исследуемом объекте клеток. Для отделения живых клеток от мертвых использовали слабый раствор (0,2 – 0,001 %) красителя фуксина. Полученную суспензию вносили под покровное стекло, под действием капиллярных сил суспензия затягивается в область нанесенной сетки. Подсчет проводился через 2 – 3 минуты после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании находились в одной плоскости.

Число клеток подсчитывалось с объективом 10 х. Подсчет проводится в 10 больших и в 20 малых квадратах сетки. Подсчет повторялся 3 – 5 раз, перед каждым подсчетом камера заполнялась заново для получения более точных результатов [33]. Количество клеток в 1 мл исследуемого объекта рассчитывалось по формуле:

$M = 2,5 \cdot 10^5 \cdot N$ , где  $N$  – количество клеток в одном большом квадрате

$M = 4 \cdot 10^6 \cdot N$ , где  $N$  – количество клеток в одном малом квадрате

## ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ФЛУОРИМЕТРИИ

### 3.1 Изучение флуоресцентных свойств стандартного раствора NADH

Химическая реакция, в результате которой образуется NADH – восстановленная форма кофермента NAD, является частью цикла метаболизма, направленная на выработку основной доли энергии, необходимой для жизнедеятельности клеток [72,73]. Открытие кофермента NAD было сделано в 1906 английскими биохимиками Артуром Харденом и Уильямом Джоном Янгом [74], однако, установление факта присутствия этого фермента в биосинтетических путях произошло только в начале 1940-х годов американским биохимиком Артуром Корнбергом [75].

Поглощая свет на длине волны 340 нм, NADH обладает характерной люминесценцией, максимальный пик которой появляется на 460 нм. Поскольку форма спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света, можно проводить подбор оптимальной длины волны возбуждения, с этой целью исследованы спектры регистрации флуоресценции NADH при различных длинах волн возбуждения (рис.15).

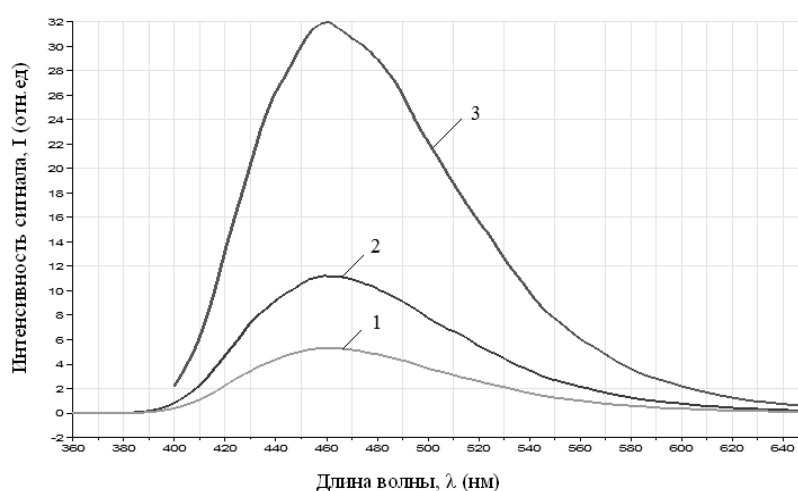


Рис.15. Спектры регистрации флуоресценции раствора NADH  $C_m = 0,001M$ :

1 – длина волны возбуждения 340 нм, 2 – длина волны возбуждения 360 нм, 3 – длина волны возбуждения 380 нм.

Максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается 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. Ту же длину волны выбрал автор работы [76], описывая ее как наиболее оптимальную.

Следует отметить, что флуоресцентный сигнал от восстановленного никотинамидадениндинуклеотида обладает высокой стабильностью, что делает возможным его дальнейшее исследование в модельных и реальных объектах.

### **3.2 Изучение природы сигнала внутриклеточного NADH методом флуориметрии на примере лактобактерий.**

Лактобактерии характеризуются высокой функциональной и биологической активностью [77]. Метаболизм лактобактерий представляет собой процесс брожения простых углеводов [64]. В качестве продуктов брожения, в зависимости от штамма, выделяются молочная кислота, этиловый спирт, пероксид водорода, уксусная кислота, бутиловый спирт, бактериоцины и т.д [78 – 82].

Процессу брожения предшествует этап гликолиза, Именно на этом этапе происходит образование NADH:



Для подтверждения наличия кофермента был снят спектр регистрации флуоресценции суспензии молочнокислых бактерий (рис.16). Было установлено, что данное вещество действительно присутствует в анализируемой среде.

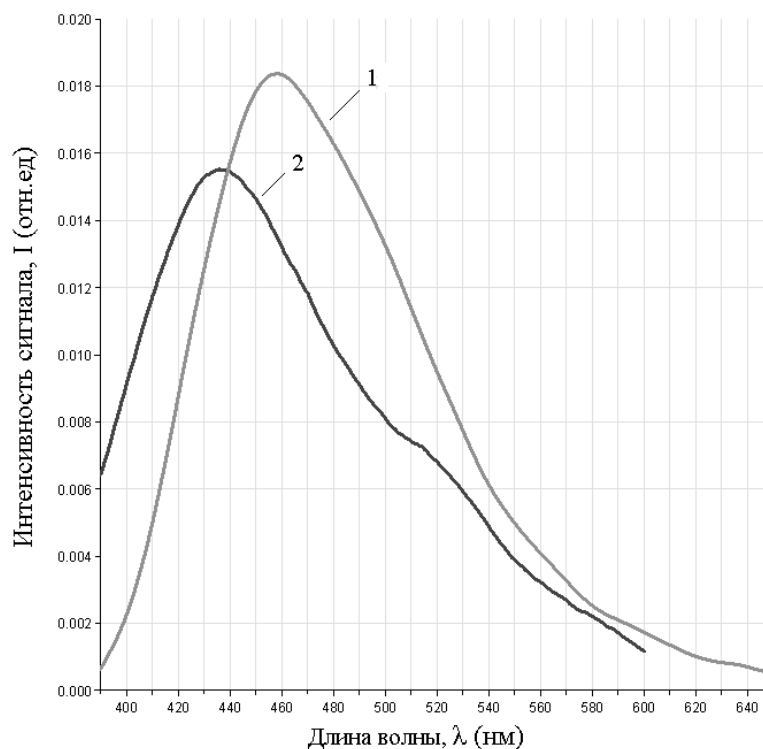


Рис.16. Спектр регистрации флуоресценции стандартного раствора NADH ( $C_m = 0,01$  M) (1), внутриклеточного NADH в *E.coli* (2).

Длина волны возбуждения 360 нм

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 [62].

Известно, что термин «люминесценция» объединяет под собой два понятия: флуоресценцию и фосфоресценцию. Оба данных процесса сопровождаются испусканием света, однако, они различаются временем жизни возбужденного состояния (для флуоресценции время жизни составляет  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  с, для фосфоресценции -  $10^{-2}$ – $10^{-4}$  с.) и положением полосы эмиссии относительно длины волны возбуждения (полоса

фосфоресценции сдвинута в более длинноволновую область, чем полоса флуоресценции).

Для определения типа испускания (фосфоресценция или флуоресценция) и подбора оптимального соотношения сигнал/шум было проведено варьирование параметров измерительного строба спектрофлуориметра. Стробом называется измерительный интервал, в течение которого происходит накопление информации об интенсивности сигнала с фотоэлектронного умножителя. Измерительный строб характеризуется временем задержки (время после подачи лампой импульса, через которое приемник начинает регистрацию) и длительностью (время регистрации).

Был проведен анализ влияния параметров измерительного строба прибора на флуоресцентный сигнал внутриклеточного NADH двумя способами: при изменении длительности при постоянном значении задержки, и при изменении задержки при постоянном значении длительности.

Установлено, что изменение времени длительности строба не влияет на интенсивности сигнала, в связи с этим для анализа было взято значение длительности, установленное по умолчанию производителем прибора - 40 мкс.

Иная картина наблюдалась при варьировании значений времени задержки строба – при увеличении времени задержки строба с 1 до 5 мкс наблюдалось уменьшение интенсивности сигнала (рис.17), это говорит о том, что процесс испускания света метаболитом NADH по природе является флуоресценцией.

Так же необходимо отметить немаловажную роль коррекции получаемого сигнала. С целью исключения влияния шумов самого прибора, была выбран режим полной коррекции.

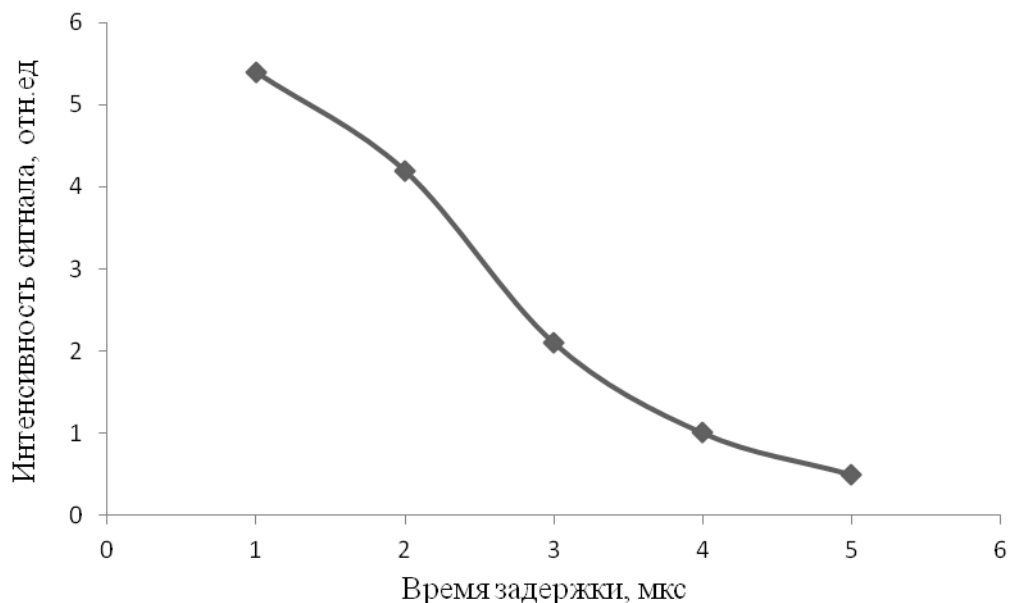


Рис.17. Влияние времени задержки измерительного строба на интенсивность сигнала

С увеличением времени задержки интенсивность сигнала уменьшается, что говорит о природе регистрируемого сигнала – флуоресценция.

Максимальная интенсивность сигнала наблюдается при величине задержки 1 мкс.

Проведенные исследования показали, что оптимальными параметрами для регистрации сигнала флуоресценции NADH в чистом виде и в составе клеток бактерий являются:

1. Длина волны возбуждения 360 нм;
2. Режим полной коррекции сигнала
3. Время задержки измерительного строба – 1 мкс;
4. Длительность измерительного строба – 40 мкс.

### 3.3 Влияние различных факторов на сигнал внутриклеточного NADH

#### 3.3.1 Влияние водородного показателя

Водородный показатель (pH) воды - один из важнейших критериев качества вод. Для вод из природных источников pH варьируется от 6,5 – 8,5. Растворенные в воде гуминовые и фульвокислоты обеспечивают кислую среду, а растворенные гидрокарбонаты и карбонаты щелочных и щелочноземельных металлов – щелочную [83,84]. От величины pH зависит развитие и жизнедеятельность водных растений, устойчивость различных форм миграции элементов. pH воды также влияет на процессы превращения различных форм биогенных элементов, изменяет токсичность загрязняющих веществ.

Поскольку величина концентрации ионов водорода имеет большое значение для химических и биологических процессов, происходящих в природных водах, интерес представляет анализ влияния кислой и щелочной сред на жизненную активность типичных представителей микрофлоры водоемов - бактерий группы *E.coli*.

Для исследования были взяты буферные растворы со значениями pH 1,65; 4,01; 6,86; 9,18; 12,5, соответствующие кислой, нейтральной и щелочной средам и бактериальные суспензии *E.coli* с содержанием бактерий  $1 \cdot 10^6$  КОЕ.

Результаты представлены на рисунке 18.

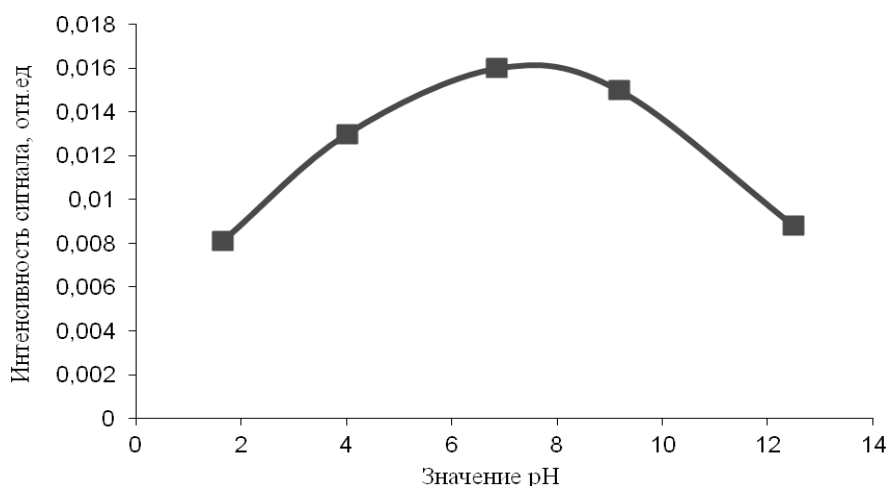


Рис.18. Зависимость интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH *E.coli* от pH среды

Исследования показали, что при pH 1,65 и 12,5 наблюдается резкое уменьшение интенсивности сигнала NADH, что обусловлено бактерицидным действием данных сред на микроорганизмы. Действию агрессивных сред подвергаются белки и липиды цитоплазматической мембраны, ферменты и коферменты. Уменьшается количество вырабатываемого NADH.

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 [85], из которых известно, что кишечная палочка характеризуется активно протекающими жизненными процессами при значениях pH в интервале от 4,4 до 9,0.

### 3.3.2 Влияние температуры

Для определения влияния высоких температур на флуоресцентный сигнал NADH были приготовлены суспензии бактерий *E.coli* с содержанием микроорганизмов от  $1 \cdot 10^4$  до  $1 \cdot 10^9$  КОЕ. Все образцы подвергались автоклавированию при температуре 121° С в течение 20 минут. Результаты представлены на рисунке 19

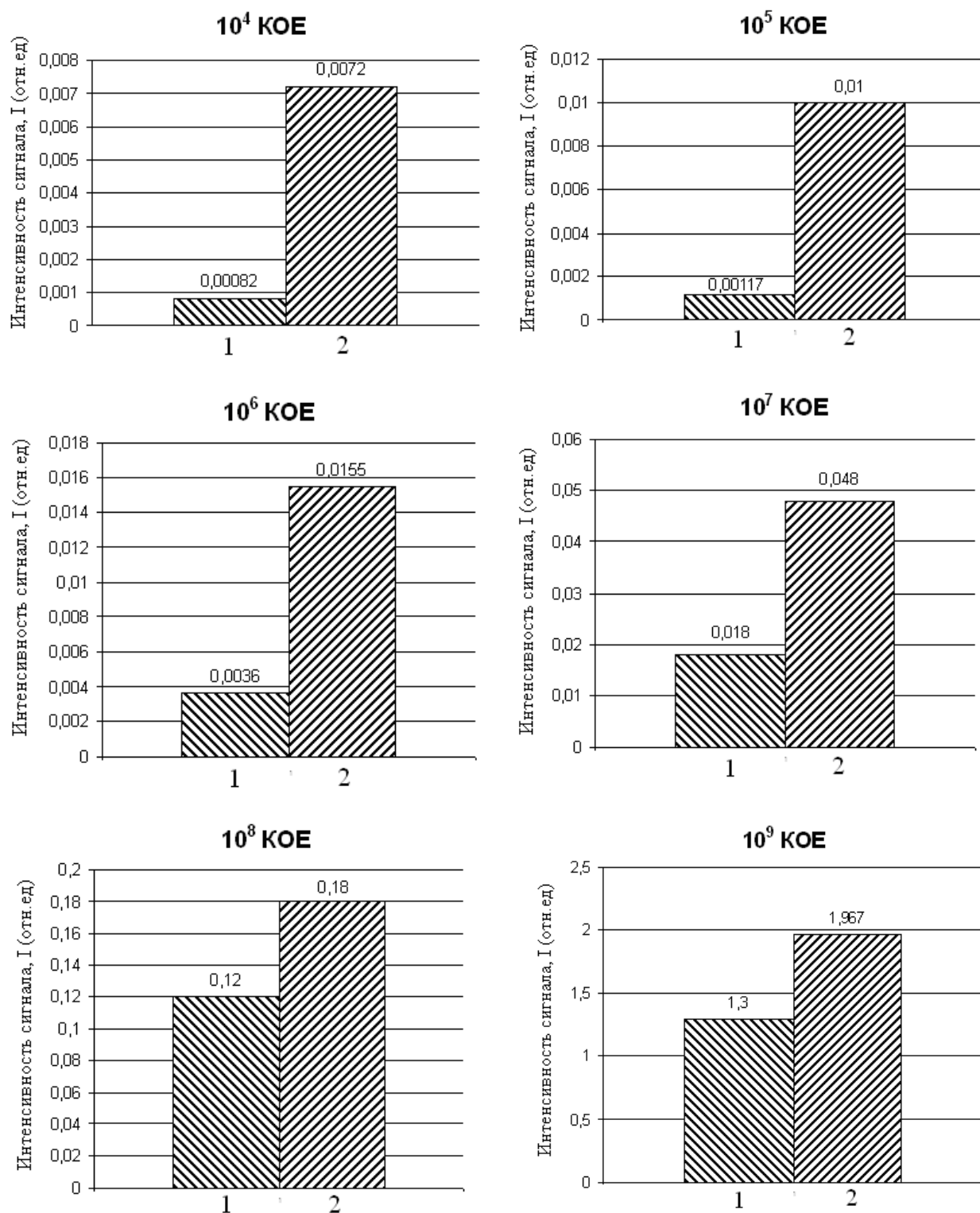


Рис.19. Диаграммы изменения интенсивности флуоресценции NADH для проб с различным содержанием бактерий под действием высоких температур: 1 – до автоклавирования; 2 – после автоклавирования.

Исследование показало, что после автоклавирования интенсивности сигнала в области регистрации флуоресценции NADH для всех концентраций увеличились. Это связано с тем, что при нагревании находящийся в клетке кофермент  $\text{NAD}^+$  гидролизует до никотинамида и аденозиндифосфат рибозы. Никотинамид при длине волны возбуждения 360 нм обладает пиком флуоресценции при 430 нм, что приводит к увеличению интенсивности сигнала в данной области после автоклавирования. Это совпадает с литературными данными [58]. Причем, чем выше концентрация бактерий, тем меньше изменение сигнала, что может быть связано со структурными изменениями внутриклеточных компонентов в концентрированных растворах.

Степень изменения интенсивностей флуоресцентного сигнала представлена в таблице 4

Таблица 4.

Степень изменения интенсивности флуоресцентного сигнала в зависимости от количества бактерий

| Содержание бактерий, КОЕ | Интенсивность сигнала до автоклавирования, отн.ед | Интенсивность сигнала после автоклавирования, отн.ед | Примечание           |
|--------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------|
| $1 \cdot 10^4$           | $0,0008 \pm 0,0003$                               | $0,0070 \pm 0,0025$                                  | Увеличение в 8 раз   |
| $1 \cdot 10^5$           | $0,0012 \pm 0,0004$                               | $0,010 \pm 0,0035$                                   | Увеличение в 7,5 раз |
| $1 \cdot 10^6$           | $0,0036 \pm 0,0013$                               | $0,0160 \pm 0,0056$                                  | Увеличение в 3 раза  |
| $1 \cdot 10^7$           | $0,0180 \pm 0,0063$                               | $0,048 \pm 0,0168$                                   | Увеличение в 2 раза  |
| $1 \cdot 10^8$           | $0,1200 \pm 0,0420$                               | $0,1800 \pm 0,0630$                                  | Увеличение на 50%    |
| $1 \cdot 10^9$           | $1,3000 \pm 0,4550$                               | $1,9600 \pm 0,6860$                                  | Увеличение на 50%    |

### 3.3.3 Влияние бактерицидных растворов

Для подтверждения корректности идентификации сигнала внутриклеточного NADH от живых клеток, проведен анализ влияния на микроорганизмы бактерицидных веществ, таких как пероксид водорода и этиловый спирт.

Известно, что 6% раствор пероксида водорода и 70% раствор этилового спирта являются дезинфицирующими растворами и при добавлении их к суспензии бактерий должна происходить их гибель.

На рисунке 20 представлен спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH при добавлении к суспензии микроорганизмов 6% раствора пероксида водорода.

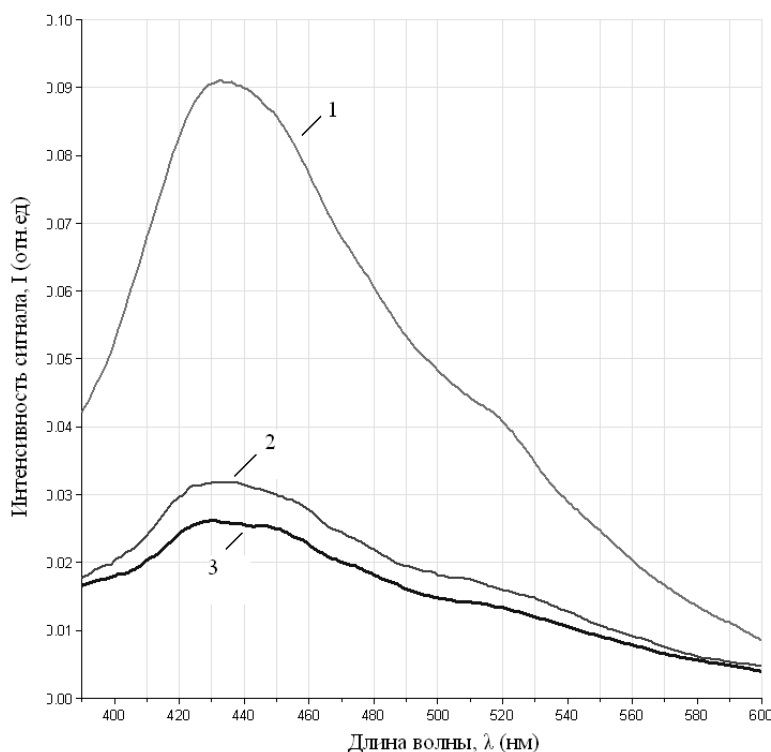


Рис.20. Спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH при добавлении пероксида водорода: 1 – суспензия бактерий *E.coli* (содержание бактерий  $2 \cdot 10^6$  КОЕ); 2 – суспензия бактерий *E.coli* с добавлением пероксида водорода через час после добавки; 3 - суспензия бактерий *E.coli* с добавлением пероксида водорода через два часа после добавки.

Из рисунка видно, что добавление к суспензии бактерий *E.coli* 6 % раствора пероксида водорода приводит к уменьшению интенсивности флуоресцентного сигнала NADH на 0,06 отн. ед. через час после добавки, и дальнейшему уменьшению интенсивности через два часа после добавки еще на 0,01 отн.ед. Являясь сильным окислителем, пероксид водорода окисляет компоненты цитоплазмы (сульфгидрильные группы активных белков, фенольные, тиоэтильные, индольные, аминные) [86].

Аналогичным образом оказывает влияние на микроорганизмы 70 % раствор этилового спирта (рис.21)

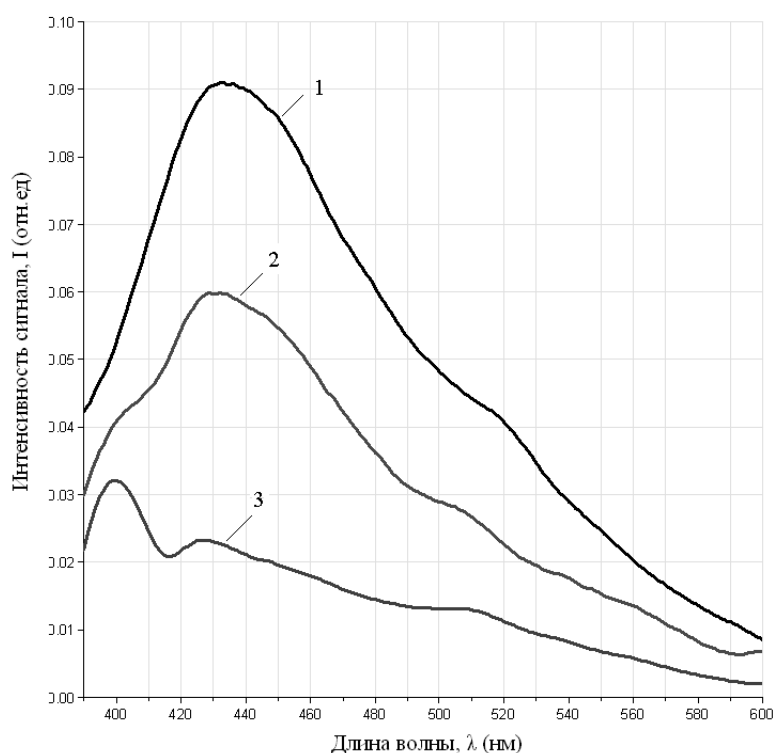


Рис.21. Спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH при добавлении этилового спирта: 1 – суспензия бактерий *E.coli* (содержание бактерий  $2 \cdot 10^6$  КОЕ); 2 – суспензия бактерий *E.coli* с добавлением этилового спирта через час после добавки; 3 – раствор этилового спирта.

Из рисунка видно, что добавление к суспензии бактерий *E.coli* 70 % раствора этилового спирта приводит к уменьшению интенсивности

флуоресцентного сигнала NADH на 0,03 отн. ед. через час после добавки. Дальнейшего падения интенсивности сигнала не наблюдалось.

Действие на бактерии этилового спирта аналогично действию пероксида водорода – при добавлении каждого из исследуемых растворов наблюдается уменьшение интенсивности сигнала NADH, что свидетельствует о гибели микроорганизмов.

Таким образом, показано, что регистрация сигнала внутриклеточного NADH возможна только в живых клетках, следовательно, по степени изменения данного сигнала можно судить о жизненной активности микроорганизмов.

#### **3.3.4 Влияние антибиотиков**

Универсальность внутриклеточного метаболита NADH, как маркера количества бактерий и их жизненной активности, позволяет применять создаваемую методику для проведения широкого спектра исследований различных микроорганизмов.

В данной работе был проведен анализ влияния антибиотиков различных классов на жизненную активность молочнокислых бактерий. Антибиотики – химиотерапевтические вещества, продуцируемые микроорганизмами, животными клетками, растениями, а также их производные и синтетические продукты, обладающие избирательной способностью угнетать и задерживать рост микроорганизмов, а также подавлять развитие злокачественных образований. [7]. Под действием антибиотиков погибают не только патогенные микроорганизмы, но и полезные бактерии – представители нормальной микрофлоры ЖКТ человека. В связи с этим было проведено исследование влияния антибиотиков на лактобактерии, как типичных представителей нормальной микрофлоры ЖКТ человека.

Для исследования были выбраны следующие антибиотики: амоксициллин, тетрациклин и цефазолин. Данные антибиотики являются

наиболее распространенными и широко применяемыми в лечении, в связи с этим они были выбраны для исследования.

Для анализа были приготовлены следующие концентрации растворов антибиотиков:

1. Амоксициллин - 4 мг/мл

2. Цефазолин - 20 мг/мл

3. Тетрациклин - 6 мг/мл

Приготовление образцов включало в себя измельчение таблетки антибиотика в ступке с последующим растворением в дистиллированной воде.

**Амоксициллин** - антибиотик широкого спектра действия пенициллинового ряда. Активен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [87].

Влияние амоксициллина на лактобактерий представлено на рисунке 22.

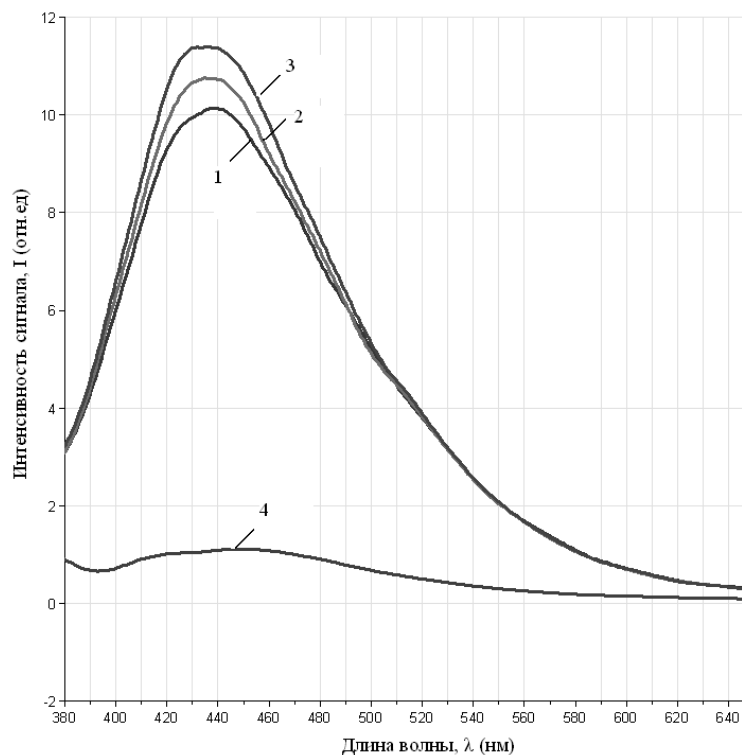


Рис.22. Спектр флуоресценции NADH в образце лактобактерий с добавлением амоксициллина концентрации 4 мг/мл: 1 – сигнал NADH в

исходной суспензии лактобактерий, 2 – сигнал NADH в суспензии лактобактерий после добавления амоксициллина, 3 – сигнал NADH в суспензии лактобактерий через 30 минут после добавления амоксициллина, 4 – раствор амоксициллина 4 мг/мл. Длина волны возбуждения – 360 нм,

Из полученных спектров видно, что при добавлении амоксициллина с суспензии лактобактерий происходит увеличение интенсивности сигнала внутриклеточного NADH на 1 отн.ед., а через полчаса увеличение происходит еще на 0,5 отн.ед. Это говорит о том, что данный антибиотик не вызывает гибель молочнокислых бактерий.

**Цефазолин** – антибиотик широкого спектра действия. Оказывает бактерицидное влияние на стафилококки, как чувствительных, так и устойчивых к пенициллину, большинство штаммов *E.coli*, *Klebsiella* и *Proteus mirabili* [88]. Представленные на рисунке 23 спектры показывают влияние данного антибиотика на лактобактерии.

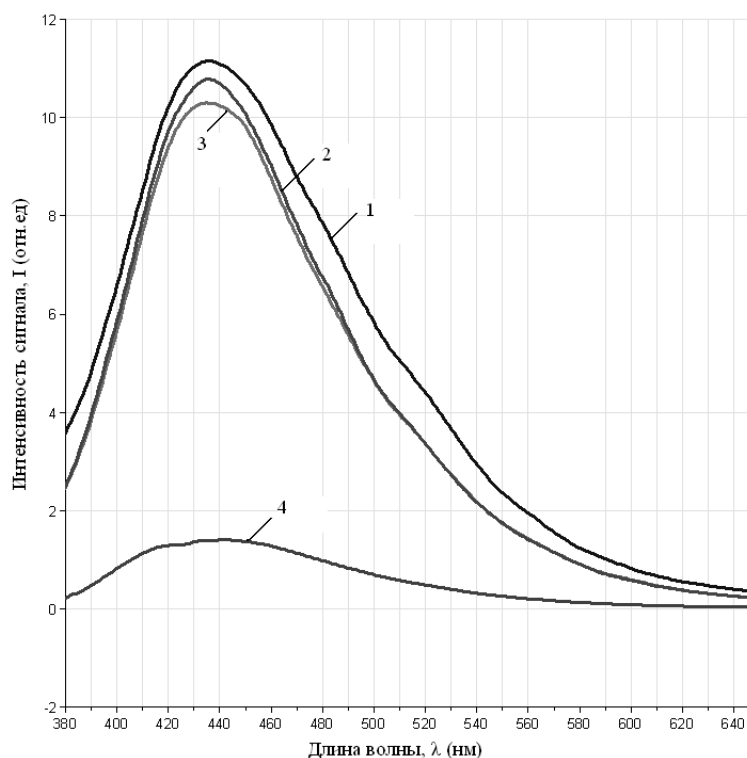


Рис.23. Спектр флуоресценции НАДН в образце лактобактерий с добавлением цефазолина концентрации 20 мг/мл: 1 – сигнал NADH в исходной суспензии лактобактерий, 2 – сигнал NADH в суспензии лактобактерий после добавления цефазолина, 3 – сигнал NADH в суспензии лактобактерий через 30 минут после добавления цефазолина, 4 – раствор цефазолина 20 мг/мл. Длина волны возбуждения – 360 нм.

Из графика видно, что непосредственно после добавления цефазолина интенсивность флуоресценции NADH уменьшилась на 0,5 отн.ед., через 30 минут произошло уменьшение сигнала еще на 2 отн.ед. Следовательно, цефазолин негативно влияет на жизненную активность лактобактерий, вызывает гибель микроорганизмов. Данный факт согласуется с тем, что цефазолин относится к антибиотикам бактерицидного типа.

**Тетрациклин** - антибиотик, продуцируемый *Streptomyces aureofaciens* или родственными организмами. Влияние данного антибиотика на лактобактерии показано на рисунке 24. Тетрациклин характеризуется

широким спектром действия. Активен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также спирохет, лептоспир, риккетсий и крупных вирусов [89].

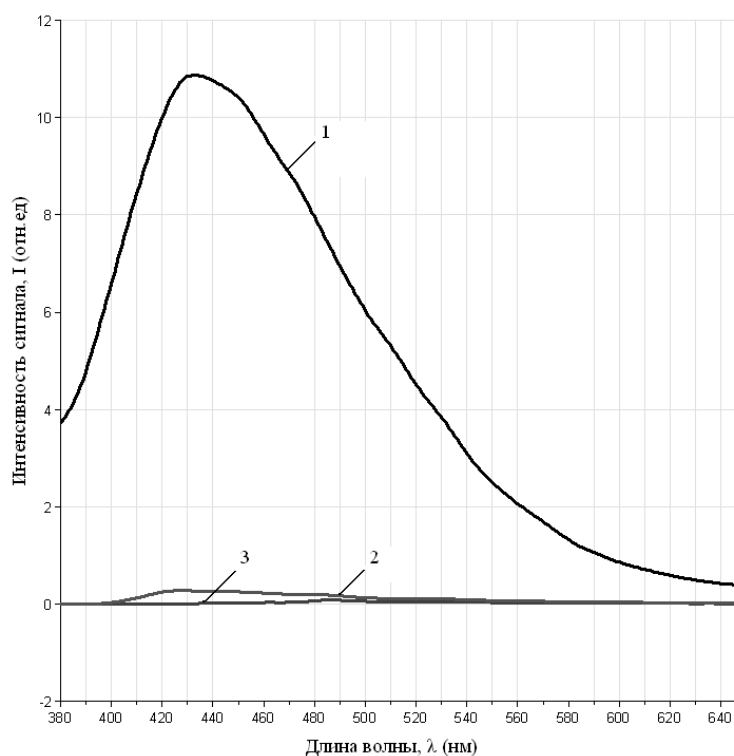


Рис.24. Спектр флуоресценции NADH в образце лактобактерий с добавлением тетрациклина концентрации 6 мг/мл: 1 – сигнал NADH в исходной суспензии лактобактерий, 2 – сигнал NADH в суспензии лактобактерий после добавления тетрациклина, 3 – раствор тетрациклина 6 мг/мл. Длина волны возбуждения – 360 нм

Из рисунка видно, что добавка тетрациклина к суспензии лактобактерий вызывает уменьшение сигнала практически до нуля. Это говорит о том, что тетрациклин полностью подавляет рост и размножение бактерий, что способствует полной гибели всех клеток. Под его воздействием нарушается синтез белка в бактериях, что приводит к остановке размножения и угнетению жизненной активности бактерий. Поскольку сразу после добавки интенсивность сигнала резко уменьшилась, повторное измерение флуоресценции NADH через 30 минут нецелесообразно.

## **ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИЙ В ПРИРОДНЫХ ВОДАХ**

Природные водоемы являются благоприятной средой обитания для большого числа различных микроорганизмов: простейших, грибов, водорослей, вирусов и бактерий. Всю микрофлору можно разделить на две группы: автохтонную (собственная микрофлора водоема) и аллохтонную (попадающую в водоем со сточными водами, осадками и другими загрязнениями) [90, 33, 91].

Для проведения анализа воду из источника отбирают в объеме не менее 500 мл с глубины 10 – 15 см от поверхности, а при небольшой глубине водоема – на расстоянии 10 – 15 см от дна. Обязательным условием при анализе воды является время хранения пробы. Анализ проводят непосредственно после забора проб или не позднее 2 часов. Если нет возможности провести анализ быстро, то допускается хранение пробы не более 6 часов при температуре  $+1...+5^{\circ}\text{C}$  в холодильнике [92].

### **4.1 Пробоподготовка и выбор условий анализа**

Пробоподготовка включает в себя доведение пробы до комнатной температуры, доведение пробы до  $\text{pH} = 4$  с целью удаления гуминовых кислот, отстаивание, добавление красителя фуксина. Как было установлено ранее, в среде при  $\text{pH}=4$  бактерии остаются активными (рис.18), следовательно, исключено некорректное определение их количества в исследуемой воде из-за их гибели на этапе пробоподготовки.

Одним из этапов пробоподготовки является добавление красителя фуксина. Использование красителя продиктовано выбором сравнительного метода анализа – метод прямого подсчета клеток под микроскопом. При использовании метода прямого подсчета клеток, исследуемый материал

необходимо окрасить красителем для корректной идентификации клеток бактерий; чтобы условия определения одного и того же показателя двумя различными методами были идентичными, перед проведением флуориметрических измерений в пробу так же добавлялся фуксин.

Анализ выполнялся на спектрофлуориметре «Флюорат-02 ПАНОРАМА» при следующих условиях:

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;

Полученные спектры были записаны в программе «Panorama Pro» и обработаны путем кубического сглаживания кривой по 20 точкам.

Для определения количества содержащихся в пробе микроорганизмов, была построена градуировочная зависимость интенсивности сигнала флуоресценции внутриклеточного метаболита NADH от количества бактерий (рис.25,26).

Для построения градуировочной зависимости были взяты стандартные штаммы бактерии E.coli, как типичные представители водной микрофлоры.

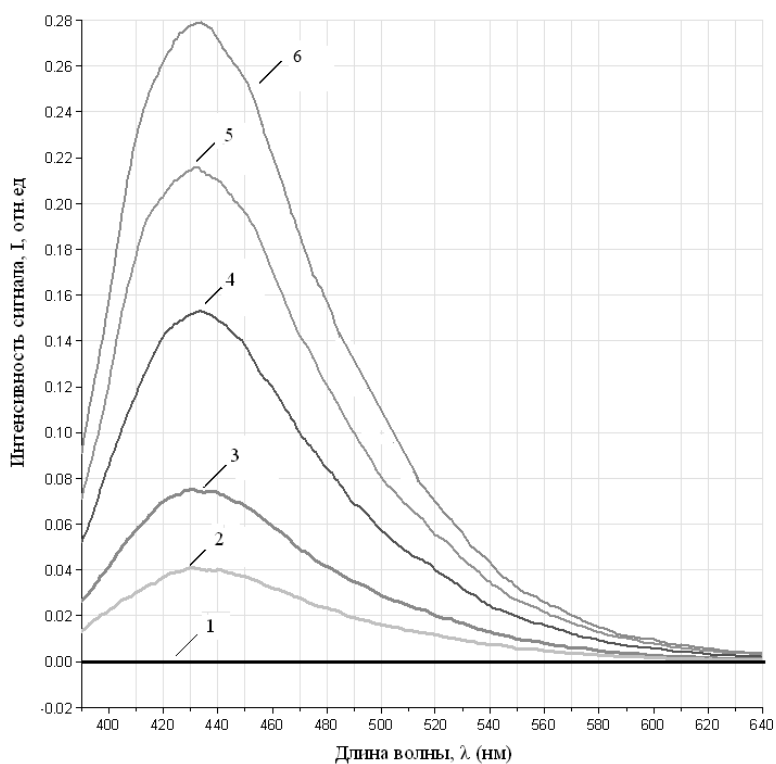


Рис.25. Изменение интенсивности флуоресценции внутриклеточного NADH в зависимости от содержания бактерий: 1 – дистиллированная вода; 2 -  $10^6$  КОЕ; 3 –  $2 \cdot 10^6$  КОЕ; 4 –  $4 \cdot 10^6$  КОЕ; 5 –  $6 \cdot 10^6$  КОЕ; 6 –  $8 \cdot 10^6$  КОЕ

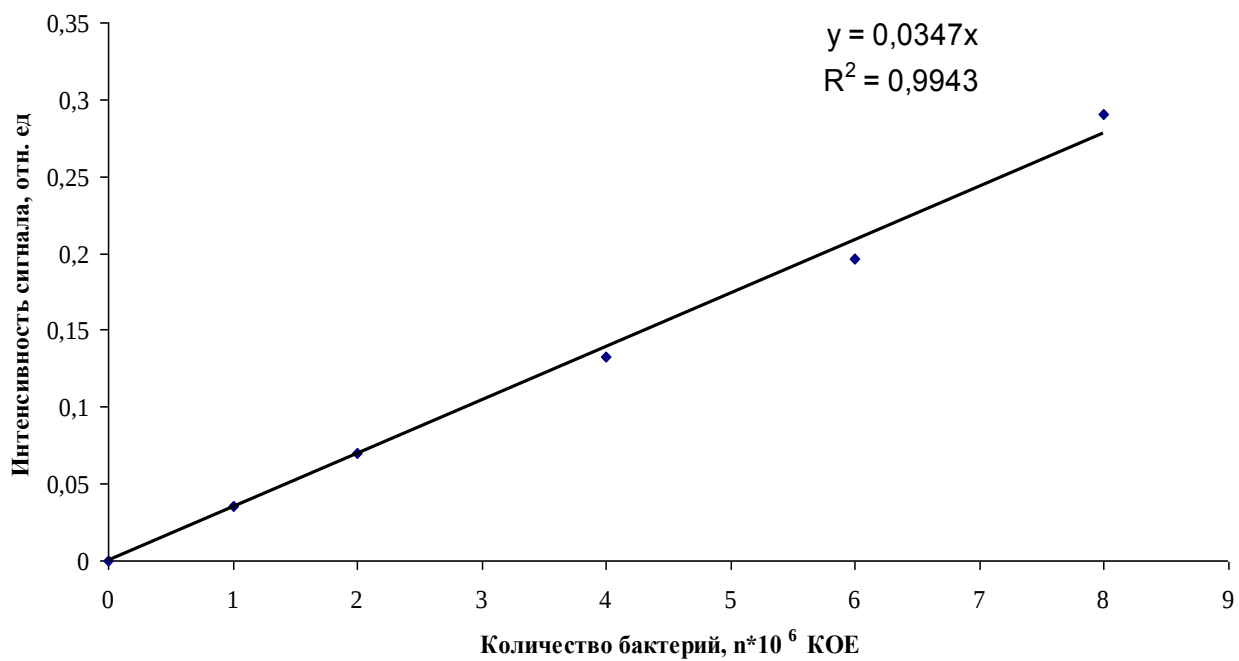


Рис.26. Градуировочная зависимость интенсивности сигнала флуоресценции внутриклеточного NADH от содержания бактерий.

## **4.2 Исследование мешающего влияния различных компонентов на флуоресцентный 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

### **4.2.1 Влияние фенола на флуоресцентный сигнал NADH**

Фенолы являются одним из наиболее распространенных загрязнений, поступающих в поверхностные воды со стоками предприятий нефтеперерабатывающей, сланцеперерабатывающей, лесохимической, коксохимической, анилиноокрасочной промышленности, в результате лесосплава, а также со стоками гидролизной промышленности (переработка непищевого растительного сырья целлюлозно-бумажной и отчасти текстильной промышленности). Фенолы химически нестойки, и подвергаются в водной среде активному распаду. Процесс самоочищения воды от фенолов протекает по пути биохимического окисления под влиянием ферментов, вырабатываемых микроорганизмами [93, 94].

Влияние фенола на флуоресцентный сигнал NADH показано на рисунке 27.

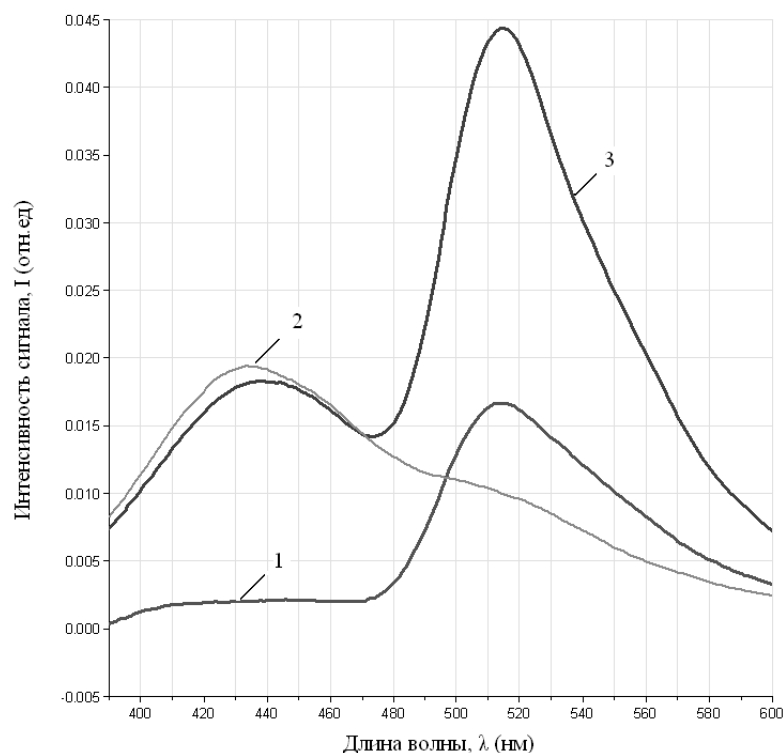


Рис.27. Спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH в присутствии фенола 0,001 мг/л: 1 – раствор фенола; 2 – суспензия бактерий *E.coli*; 3 - раствор фенола + 1 мл бактерий *E.coli*

Из рисунка видно, что чистый раствор фенола при данных условиях флуоресцирует в области 530 нм, при добавлении суспензии бактерий *E.coli* к раствору фенола интенсивность данного пика возрастает, а также появляется пик при длине волны 440 нм, соответствующий флуоресценции NADH. Интенсивность данного сигнала не изменяется при добавке к суспензии бактерий раствора фенола, это свидетельствует о том, что присутствие фенола в воде в концентрации, равной ПДК не мешает флуоресцентному определению внутриклеточного NADH. При концентрации фенола превышающей ПДК вода не соответствует органолептическим показателям качества, в связи с этим определение содержания бактерий в такой воде становится нецелесообразным.

#### 4.2.2 Влияние железа (III) на флуоресцентный сигнал NADH

Вследствие перехода соединений железа из различных горных пород в раствор, в любых природных источниках можно обнаружить самые разнообразные формы нахождения этого элемента. Выделяют 4 формы железа, присутствующих в природной воде: элементарное железо; двухвалентное железо (почти всегда находится в виде растворимых соединений); трехвалентное железо (гидроксид железа, хлорид железа, сульфат железа); органическое железо (бактериальное железо, коллоидное железо, комплексы железа с гуминовыми кислотами). Воды, содержащие достаточно большое количество железа, обычно имеют кислую среду. Присутствие железа в воде обуславливает неприятный привкус воды и приводит к появлению ржавчины [85].

Для исследования влияния соединений железа на флуоресцентный сигнал NADH (рис.28) был выбран хлорид железа (III), как наиболее доступная для создания модельного раствора форма, содержащегося в воде железа.

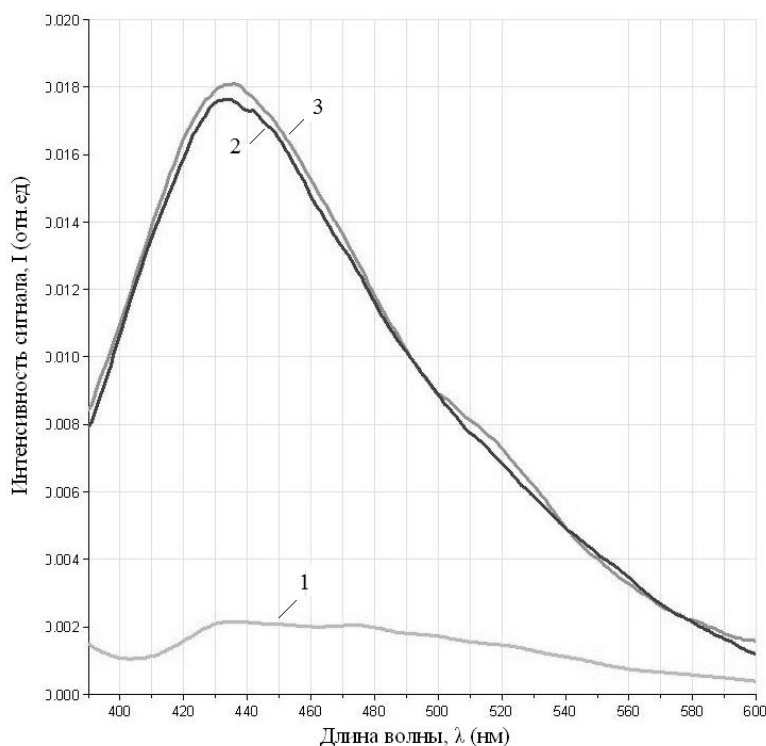


Рис.28. Спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH в присутствии железа (III) 0,3 мг/л: 1 – раствор железа (III); 2 – суспензия бактерии *E.coli*; 3 – *E.coli* + раствор железа (III).

Из рисунка видно, что раствор хлорида железа (III) не обладает флуоресценцией во всем диапазоне длин волн. При добавлении к суспензии бактерий *E.coli* раствора хлорида железа интенсивность флуоресцентного сигнала при 440 нм, соответствующего коферменту NADH, остается практически неизменной. Это свидетельствует о том, что присутствие хлорида железа (III) в воде в концентрации, равной ПДК не мешает флуоресцентному определению внутриклеточного NADH.

#### 4.2.3 Влияние гидрокарбонат-ионов на флуоресцентный сигнал NADH

Гидрокарбонатные ионы попадают в водоемы со сточными водами предприятий химической, силикатной и содовой промышленности. Наличие в воде карбонатных и гидрокарбонатных ионов определяют карбонатную щелочность воды. Щелочность является важной характеристикой

поверхностных вод, по которой можно судить об основных гидрохимических и геохимических процессах, таких, как формирование химического состава вод, эрозия земной поверхности, образование осадочных пород и т.д. [96] Для исследования влияния гидрокарбонат-ионов на флуоресцентный сигнал NADH (рис.29) был выбран гидрокарбонат натрия.

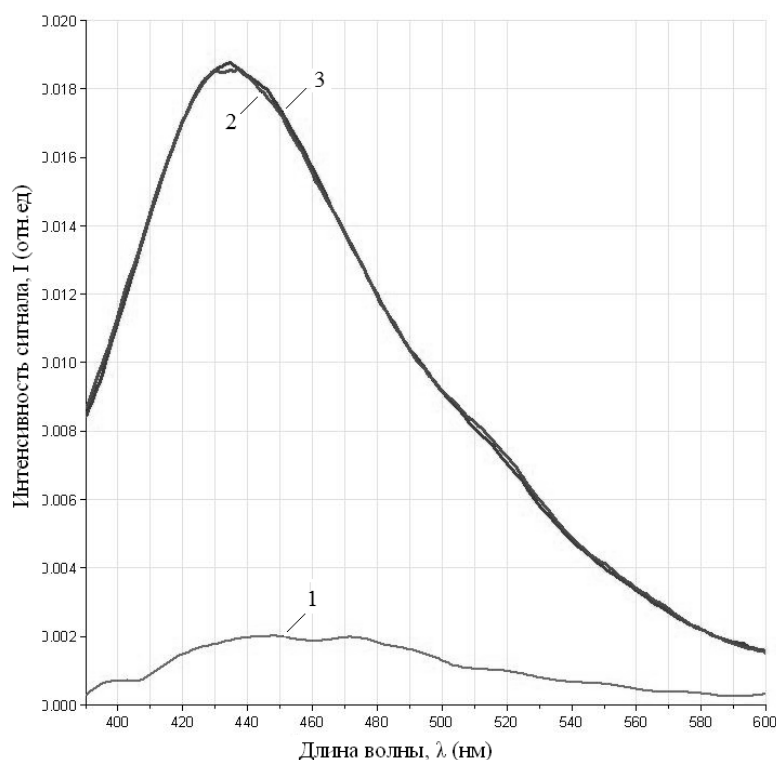


Рис. 29. Спектр регистрации флуоресценции внутриклеточного NADH в присутствии гидрокарбоната натрия 500 мг/л: 1 – раствор гидрокарбоната натрия; 2 – суспензия бактерий *E.coli*; 3 – *E.coli* + раствор гидрокарбоната натрия.

Из рисунка видно, что раствор гидрокарбоната натрия при условиях анализа не флуоресцирует во всем диапазоне длин волн регистрации. При добавлении суспензии бактерий *E.coli* к раствору хлорида железа появляется пик при длине волны 440 нм, соответствующий флуоресценции NADH. Интенсивность данного сигнала также растет пропорционально добавке

бактерий, это свидетельствует о том, что присутствие гидрокарбоната натрия в воде в концентрации, равной ПДК не мешает флуоресцентному определению внутриклеточного NADH.

#### **4.2.4 Влияние гуминовых кислот на флуоресцентный сигнал NADH**

В природной воде из любого источника всегда можно обнаружить большое количество растворенных в ней веществ. Зачастую, состав растворенных компонентов зависит от состава почвы, с которой вода соприкасается. Некоторые растворенные в воде вещества обладают способностью флуоресцировать. Установлено, что при УФ возбуждении спектр флуоресценции присутствующих в воде компонентов состоит из двух широких полос: полоса с максимумом в области 300 – 350 нм (фенольные и белковые соединения) и полоса с максимумом в области 400 – 450 нм (гуминовые вещества) [97].

Поскольку сигнал флуоресценции внутриклеточного NADH приходится на длину волны 440 нм, что попадает в область флуоресценции гуминовых веществ, было проведено исследование мешающего влияния гуминовых веществ на определение сигнала NADH.

В качестве объекта исследования были выбраны гуминовые кислоты, которые попадают в воду из почвы. Основываясь на литературных данных [97,98] для получения спектров флуоресценции гуминовых кислот используют три значения длины волны возбуждения: 270, 310 и 355 нм. В данной работе был получен спектр флуоресценции гуминовых кислот при длине волны возбуждения 360 нм, что соответствует возбуждению флуоресценции внутриклеточного NADH. Результаты исследования представлены на рисунке 30.

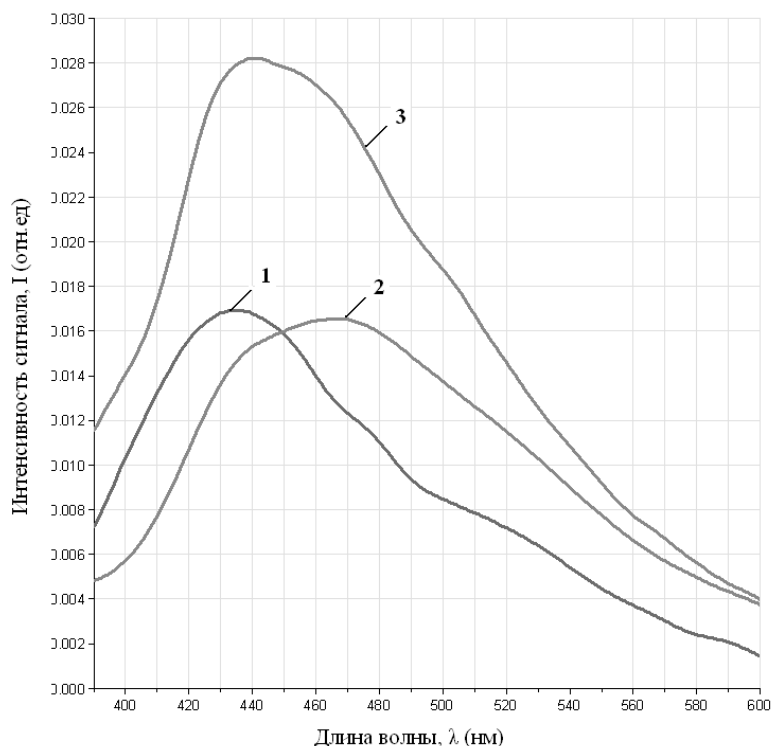


Рис.30. Влияние гуминовых кислот на флуоресцентный сигнал внутриклеточного NADH: 1 – суспензия бактерий E.coli, содержание бактерий  $4 \cdot 10^6$  КОЕ; 2 – раствор гуминовых кислот, концентрация 20 мг/л; 3 – раствор гуминовых кислот + 1 мл бактерий E.coli.

Из рисунка видно, что 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 pH=4 с последующей их коагуляцией и отстаиванием.

#### 4.3 Метрологические аспекты методики определения общего числа бактерий в природных водах

Метрологическое обеспечение – это цикл мероприятий, правил, действий, направленных на получение достоверных, правильных, точных и

воспроизводимых результатов измерений (испытаний, анализа, контроля и т.п.), по которым можно судить о показателях, включая показатели качества и показатели безопасности [99].

В стандартах ГОСТ Р ИСО 5725-2002 подробно изложены основные положения и определения показателей точности методов измерений и результатов измерений, способы экспериментальной оценки показателей точности и использования значений точности на практике. Следует обратить внимание на представленную в стандарте ГОСТ Р ИСО 5725 новую терминологию.

В соответствии с ГОСТ Р 5725-1-2002 - 5725-6-2002 в описании точности КХА используется три термина: прецизионность, правильность и точность.

Прецизионность - степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит только от случайных факторов и не связана с истинным значением или принятым опорным значением.

Правильность - характеризует степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений к истинному или в случае его отсутствия к принятому опорному значению. Показателем правильности обычно является значение систематической погрешности.

Точность - степень близости результата анализа к истинному или принятому опорному значению.

Опорное значение - значение, которое служит в качестве согласованного. В качестве опорного значения может быть принято:

- теоретическое или научно установленное значение;
- аттестованное значение СО;
- аттестованное значение смеси (АС);

- математическое ожидание измеряемой характеристики, т.е. среднее значение заданной совокупности результатов анализа.

На изменчивость результата химического анализа могут оказывать различные факторы: время (интервал времени между измерениями), калибровка, оператор, оборудование, параметры окружающей среды.

В зависимости от влияющих факторов прецизионность результатов анализа включает:

- прецизионность анализа в условиях повторяемости - условия при которых результаты анализа получают по одной и той же методике в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования, практически одновременно (параллельные определения);

- прецизионность анализа в условиях воспроизводимости - условия при которых результаты анализа получают по одной и той же методике в разных лабораториях, варьируя различными факторами (разное время, оператор, условия окружающей среды);

- внутрилабораторную прецизионность анализа - условия при которых результаты анализа получают по одной и той же методике в одной и той же лаборатории при вариации различных факторов (время, оператор, разные партии реактивов и т.д.).

Мерой оценки прецизионности является среднеквадратическое отклонение (СКО):

$\sigma_T$  - СКО повторяемости;

$\sigma_R$  - СКО воспроизводимости;

$\sigma_{Rл}$  - СКО внутрилабораторной прецизионности.

### 4.3.1 Флуориметрический метод определения общего числа бактерий

Процедура определения содержания общего числа бактерий в объектах заключалась в измерении сигнала флуоресценции выбранного ранее клеточного метаболита NADH. Предварительно была построена градуировочная зависимость интенсивность сигнала флуоресценции NADH от содержания микроорганизмов бактерий группы E.coli (рис.25,26). Выбор данных микроорганизмов для построения градуировочной зависимости обусловлен тем, что именно они составляют основу микрофлоры водоемов.

Были определены следующие метрологические характеристики создаваемой методики:

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

Алгоритм расчета приведен в Приложении 1.

Обобщенные результаты, полученные для диапазона исследуемых содержаний бактерий E.coli в модельных суспензиях представлены в таблице 5.

Таблица 5.

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                                  |

Указанные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности при любой совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики при ее реализации в отдельной лаборатории.

Правильность методики оценивалась по методу добавок.

#### **4.3.2 Оценка показателей повторяемости, правильности и точности методики анализа методом добавок**

Для оценки качественных характеристик любой методики необходимо определить показатели повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности измерений.

Показатель повторяемости методики анализа — приписанная характеристика случайной погрешности результатов единичного анализа, полученных в условиях повторяемости.

Показатель внутрилабораторной прецизионности методики анализа — приписанная характеристика случайной погрешности результатов анализа, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности.

Показатель правильности методики анализа — приписанная характеристика систематической погрешности методики анализа.

Показатель точности методики анализа — приписанная характеристика погрешности методики анализа.

Необходимый для расчета массив экспериментальных данных для каждого  $m$ -го поддиапазона получают в соответствии с методикой анализа в виде серии  $L$  результатов анализа определяемого компонента в пробе без добавки и в пробе с добавкой, максимально варьируя при этом условия проведения анализа: средства измерения, разное время, разные операторы, разные наборы мерной посуды и т. д [100].

По полученным экспериментальным данным проведен расчет показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности,

правильности и точности (Приложение 2). При проведении экспериментов и расчетов использован метод добавок. Обобщенные результаты расчетов представлены в таблице 6.

Таблица 6.

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

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

Из таблицы 6 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 методики максимальную погрешность 60 % во всем диапазоне определяемых содержаний.

#### 4.4 Построение градуировочного графика

В практике лабораторного контроля при осуществлении госсаннадзора все большее применение находят физико-химические методы исследования.

Функциональная зависимость между численным значением физического или физико-химического свойства и содержанием анализируемого вещества может быть выражена графиком или формулой.

Основой для построения градуировочного графика является приготовление стандартных растворов.

В практике для построения градуировочных графиков и расчета коэффициента уравнения регрессии используется метод наименьших квадратов, который имеет погрешность 1–5% при доверительной вероятности  $\alpha = 0,95$ .

Точная зависимость между концентрацией определяемого ингредиента (X) и оптической плотностью (Y) будет выражаться уравнением:  $y=a+bx$ , которое называется уравнением регрессии или уравнением градуировочного графика. На градуировочном графике это уравнение представляет уравнение прямой. Первая и последняя точка отрезка есть диапазон определения, регламентируемый данной методикой.

Алгоритм расчетов коэффициентов уравнения регрессии, а также воспроизводимости и сходимости результатов анализа приведен в приложении 3.

Для построения градуировочного графика было приготовлено 5 стандартных растворов. Набранный после флуориметрического анализа материал представлен в таблице 7.

Таблица 7.

Расчетные данные для построения градуировочного графика и расчетов коэффициентов в уравнении регрессии

| N<br>п/п | X*10 <sup>6</sup> | Y1    | Y2    | Y3    | Y <sub>ср</sub> | XY    | X <sup>2</sup> | Y <sub>расч</sub> | P,% | Δ,% |
|----------|-------------------|-------|-------|-------|-----------------|-------|----------------|-------------------|-----|-----|
| 1        | 1                 | 0,044 | 0,039 | 0,044 | 0,042           | 0,042 | 1              | 0,037             | 12  | 14  |
| 2        | 2                 | 0,075 | 0,079 | 0,077 | 0,077           | 0,154 | 4              | 0,074             | 6   | 3   |
| 3        | 4                 | 0,154 | 0,150 | 0,143 | 0,149           | 0,594 | 16             | 0,146             | 7   | 2   |
| 4        | 6                 | 0,227 | 0,234 | 0,242 | 0,234           | 1,406 | 36             | 0,223             | 6   | 5   |
| 5        | 8                 | 0,283 | 0,306 | 0,300 | 0,296           | 2,37  | 64             | 0,287             | 8   | 3   |
| Σ        | 21                |       |       |       | 0,797           | 4,566 | 121            |                   |     |     |

Рассчитанные коэффициенты в уравнении регрессии:

$$a = 0,000331,$$

$$b = 0,0371.$$

Вид уравнения регрессии для массива экспериментальных данных:

$$Y = 0,000331 + 0,0371X$$

Максимальные расчетные значения воспроизводимости и сходимости результатов анализа имеют значения 14% и 12% соответственно при минимальном содержании бактерий в анализируемой пробе.

По результатам расчетов целесообразно приписать разрабатываемой методики максимальную погрешность построения градуировочного графика 14 % во всем диапазоне определяемых содержаний.

#### **4.4 Метод прямого счета клеток и флуориметрический метод определения общего содержания бактерий. Сравнительные испытания.**

##### **4.4.1 Определение общего содержания бактерий в воде методом флуориметрии**

Для проведения анализа были взяты пробы воды из рек г. Томска: р. Ушайка, р. Басандайка, р. Томь. На рисунке 31 представлен спектр флуоресценции образца воды из р. Ушайка.

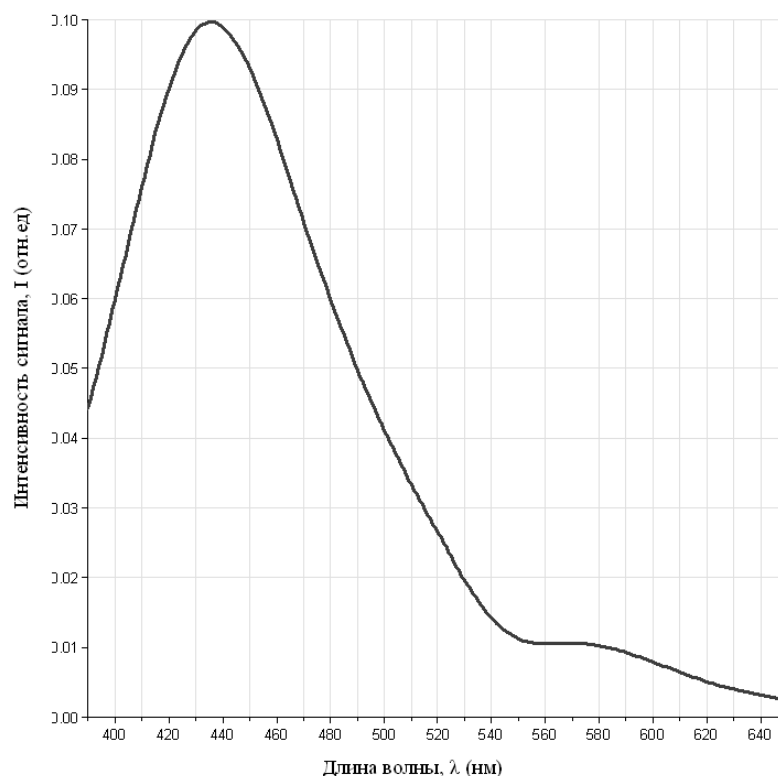


Рис.31. Спектр регистрации флуоресценции пробы воды из р. Ушайка

На спектре наблюдался один пик, максимум которого приходится на длину волны 435 нм, что, как было установлено ранее, соответствует флуоресценции бактериального кофермента NADH.

Полученный спектр аналогичен спектрам флуоресценции образцов воды из других рек, поэтому спектры флуоресценции остальных проб не приводятся. Количественный анализ проводился с использованием градуировочного графика, результаты определения приведены в таблице 7.

Для доказательства того, что полученный сигнал относится именно к NADH, к образцу воды из р. Ушайка были сделаны добавки стандартного раствора NADH концентрации  $10^{-4}$  М. После каждой добавки снимался спектр флуоресценции (рис. 32)

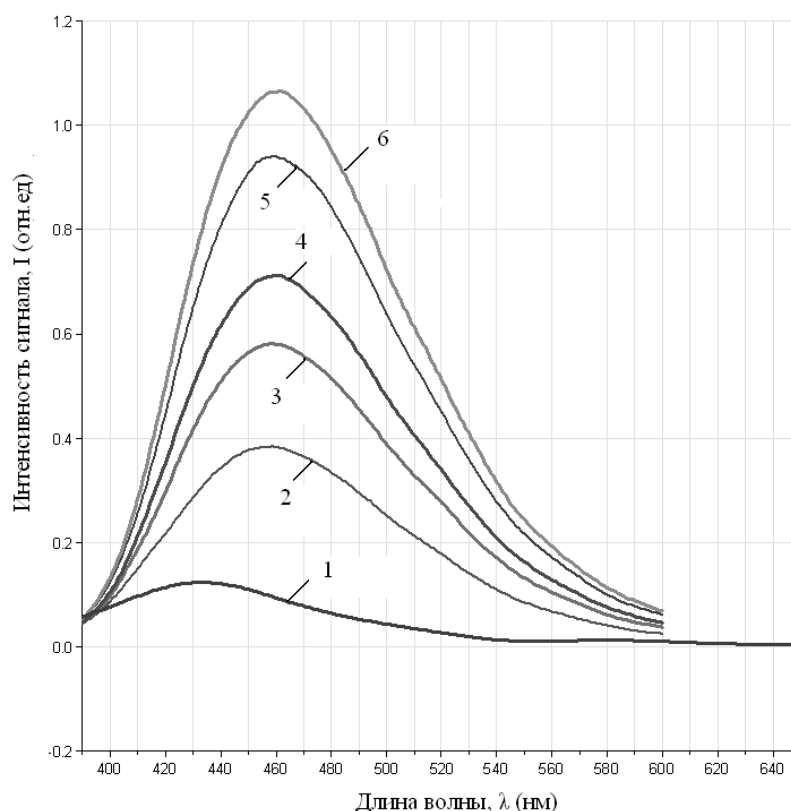


Рис.32. Спектр флуоресценции образца воды из р. Ушайка с добавлением стандартного раствора NADH: 1 – вода из р. Ушайка; 2 – вода + 1 мл NADH; 3 – вода + 2 мл NADH; 4 – вода + 3 мл NADH; 5 – вода + 4 мл NADH; 6 – вода + 5 мл NADH.

Из рисунка видно, что при постепенном добавлении стандартного раствора NADH интенсивность сигнала увеличивается, и положение максимума пика сдвигается в длинноволновую область с 435 до 460 нм. Наличие такого смещение объяснено в литературе и связано с протеканием реакцией кофермента с соответствующей ему дегидрогеназой [62] Так как при добавлении NADH наблюдается рост интенсивности сигнала пропорционально добавке, можно сделать вывод о том, что регистрируемый нами сигнал в образцах воды принадлежит коферменту NADH.

#### 4.4.2 Определение общего содержания бактерий в воде методом прямого счета клеток в камере Горяева

Методы прямого счета клеток позволяют определить общее количество клеток в единице объема. Главным условием использования этого метода является высокая концентрация клеток в единице исследуемого субстрата. Для этого метода могут быть использованы препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембранных фильтрах, счетные камеры и капилляры. В качестве окрашивающего препарата был использован краситель фуксин.

##### 4.4.2.1 Исследование флуоресцентный свойств фуксина

Фуксин (рис.33) относится к группе трифенилметановых красителей и является производным углеводорода трифенилметана и третичного спирта – трифенилкарбинола [101].

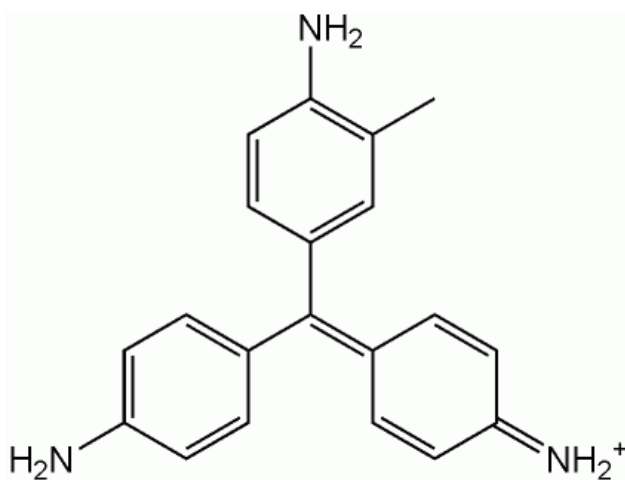


Рис.33. Структурная формула фуксина

Окраску данным красителям придают первичные, вторичные и третичные аминогруппы или оксигруппы, находящиеся в *para*-положении к центральному атому углерода. Фуксин хорошо растворим в этаноле, хлороформе, диметилформамиде и воде. Обладает зеленовато – желтой люминесценцией. Максимальное поглощение наблюдается в интервале длин волн 500 - 550 нм.

На рисунке 34 представлен спектры поглощения фуксина в сравнении с дистиллированной водой и спектр возбуждения флуоресценции фуксина.

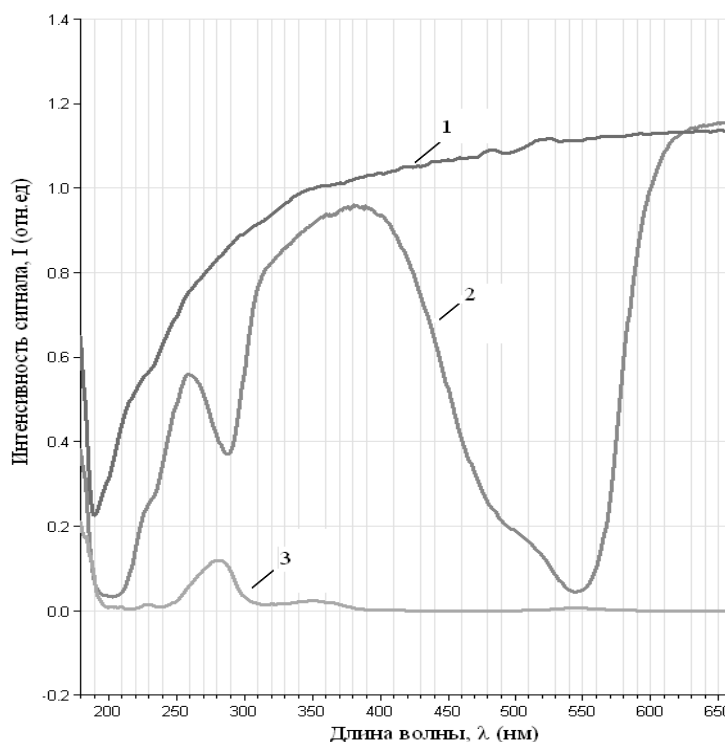


Рис.34. Спектры поглощения воды (1), водного раствора фуксина (2); спектр возбуждения люминесценции водного раствора фуксина (3)

Водный раствор фуксина имеет два пика поглощения: длины волн 287 и 548 нм. На длине волны 548 нм наблюдается максимум поглощения, что согласуется с литературными данными [102]. С другой стороны, полученный спектр возбуждения люминесценции водного раствора фуксина имеет максимум на длине волны 284 нм. Это говорит о том, что флуоресценция водного раствора фуксина возможна только при возбуждении ее длиной волны в интервале 284 – 287 нм. Возбуждение длиной волны 548 нм не приводит к флуоресценции, поэтому в качестве возбуждающей была выбрана длина волны 284 нм.

Для исследования мешающего влияния фуксина на определение содержания бактерий в пробе был снят спектр регистрации флуоресценции водного раствора фуксина (рис.35)

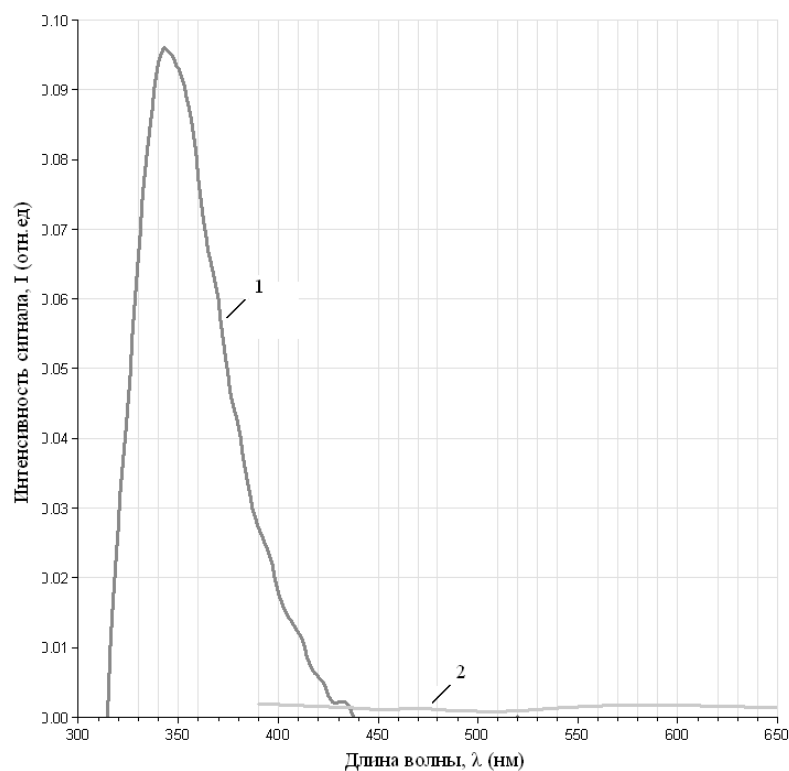


Рис.35. Спектры регистрации флуоресценции водного раствора фуксина: 1 – длина волны возбуждения 284 нм; 2 – длина волны возбуждения 360 нм

Показано, что при возбуждении длиной волны 284 нм наблюдается флуоресценция, максимум которой приходится на длину волны 343 нм. Пик выражен четко, интенсивность сигнала составляет 0,095 отн.ед. При возбуждении длиной волны 360 нм (данная длина волны возбуждения соответствует коферменту NADH), флуоресценции не наблюдается (рис 36).

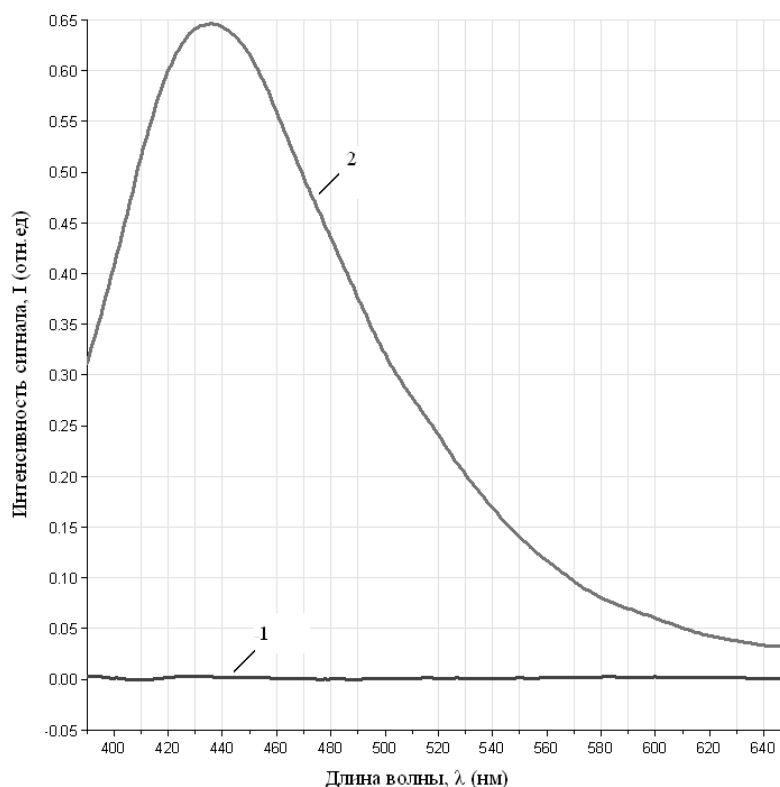


Рис.36. Спектры регистрации флуоресценции водного раствора фуксина (1) и внутриклеточного кофермента NADH (2)

Фуксин не оказывает мешающего влияния на регистрацию сигнала флуоресценции NADH. Таким образом, на основании проведенных исследований было показано, что фуксин может быть использован для проведения анализов по определению содержания бактерий в природных водах. Так же необходимо отметить, что водный раствор фуксина не оказывает губительного воздействия на сами микроорганизмы, что также делает его применимым для анализа водных проб.

#### 4.4.2.2 Подсчет клеток в камере Горяева

После окрашивания микроорганизмов фуксином проводился подсчет клеток с помощью счетной камеры Горяева.

На рисунке 37 представлена фотография поля зрения микроскопа при 10-кратном увеличении в процессе подсчета клеток проб воды из различных источников.



Рис.37. Проба воды из р. Ушайка.

Полученная картина, как и в случае флуориметрического анализа, аналогична для всех образцов воды из других рек, поэтому фотографии остальных проб не приводятся, а численные значения содержания микроорганизмов занесены в таблицу 8.

Таблица 8.

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,<br>р. Ушайка, Каменный мост      | $3,0 \pm 1,77$                             | $2,3 \pm 1,36$             |
| 2       | 14 октября,<br>р. Ушайка, пос. Степановка    | $4,0 \pm 2,36$                             | $4,8 \pm 2,83$             |
| 3       | 15 октября,<br>р. Томь, пр. Ленина           | $1,1 \pm 0,65$                             | $0,7 \pm 0,41$             |
| 4       | 18 октября<br>р. Басандайка, пос.<br>Аникино | $3,6 \pm 2,12$                             | $3,3 \pm 1,95$             |

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.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время флуориметрические методы анализа получают все более широкое распространение во многих областях науки и техники благодаря высокой чувствительности, селективности и экспрессности.

Метод флуориметрии широко используется для анализа клеток, клеточных структур и различных внутриклеточных метаболитов. Одним из таких метаболитов является NAD, восстановленная форма которого (NADH) имеет стабильный флуоресцентный сигнал.

NADH представляет собой сложную молекулу, в состав которой входят аденин, никотинаимид, дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты. Выполняя функцию переносчика водорода и двух электронов, образуется на стадии окисления питательного субстрата и расходуется на стадии образования продуктов метаболизма, что позволяет использовать его в качестве маркера жизненной активности любых клеток.

На основании проведенного литературного обзора были обозначены условия флуориметрического определения внутриклеточного NADH. Необходимо отметить, что различные источники литературы представляют различные значения длин волн возбуждения и регистрации флуоресценции для определения NADH, что связано с различной приборной базой, используемой для исследований. В связи с этим было проведено исследование свойств данного кофермента с целью выбора оптимальных условий его определения на конкретном лабораторном оборудовании.

Исследования показали, что максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается при возбуждении длиной волны 380 нм, при этом регистрация флуоресценции начинается с длины волны 390 нм. Однако, учитывая тот факт, что работа ведется с живыми объектами, которые могут рассеивать поступающий на них свет, длину волны возбуждения необходимо выбирать с некоторым сдвигом от длины волны начала регистрации, такой

длиной волны была выбрана 360 нм, что согласуется с литературными источниками.

По экспериментальным данным были получены спектры регистрации флуоресценции стандартного вещества NADH и NADH внутриклеточного. Было установлено, что максимумы спектров эмиссии имеют разное положение – для чистого вещества 460 нм, для внутриклеточного – 440 нм. Данное смещение также согласуется с литературными данными и объясняется протеканием ферментативной реакции при восстановлении кофермента NAD до NADH.

На примере непатогенных молочнокислых бактерий были подобраны рабочие условия анализа: средняя чувствительность ФЭУ (позволяет избежать зашкала сигнала при сохранении достаточной чувствительности), полная коррекция флуоресцентного сигнала, время задержки измерительного строба 1 мкс, длительность строба – 40 мкс (позволяет исключить влияние побочных явлений, таких как фосфоресценция).

На примере бактерий групп кишечной палочки и молочнокислых бактерий было исследовано влияние различных параметров, таких как водородный показатель, температура, добавление бактерицидных средств на их жизненную активность по изменению интенсивности флуоресцентного сигнала внутриклеточного NADH.

Показано неоднозначное влияние значения водородного показателя среды на микроорганизмы – в сильноокислых ( $\text{pH} = 1,65$ ) и сильнощелочных ( $\text{pH} = 12,5$ ) средах происходила гибель бактерий, что обуславливало падение интенсивности флуоресценции NADH почти в 2 раза. Однако, в интервале значений  $\text{pH}$  от 4,01 до 9,18 гибель бактерий не происходит, причем, максимум флуоресценции NADH соответствовал  $\text{pH} = 6,86$ . Данный факт подтверждается литературными данными, из которых известно, что оптимальные значения  $\text{pH}$  для жизни бактерий *E.coli* лежат в пределах от 4 до 9.

Влияние температуры также было исследовано на бактериях *E.coli*, приготовленные пробы с содержанием микроорганизмов в интервале от  $1 \cdot 10^4$  до  $1 \cdot 10^9$  КОЕ подвергались автоклавированию. Показано, что после автоклавирования интенсивность флуоресцентного сигнала увеличилась во всех исследуемых суспензиях. При высокой температуре бактерии погибают и теряют способность вырабатывать NADH, однако, установлено, что при нагреве суспензий до  $121^\circ \text{C}$  в клетке произошел процесс разрушения окисленной формы кофермента  $\text{NAD}^+$  до никотинамида и аденозиндифосфат рибозы. Никотинамид при длине волны возбуждения 360 нм обладает пиком флуоресценции при 430 нм, что приводит к увеличению интенсивности сигнала в данной области после автоклавирования.

Исследование влияния бактерицидных растворов на флуоресцентный сигнал внутриклеточного NADH показало, что при добавлении к суспензии бактерий *E.coli* 6% раствора пероксида водорода и 70% раствора этилового спирта наблюдается резкое уменьшение интенсивности флуоресценции NADH. Это связано с тем, что данные вещества в указанных концентрациях вызывают гибель микроорганизмов, следовательно, останавливают выработку внутриклеточного NADH.

На группе молочнокислых бактерий было исследовано влияние антибиотиков. Показано, что антибиотики разных классов оказывают различное влияние на микроорганизмы. Например, амоксициллин не убивает молочнокислые бактерии – на спектре флуоресценции наблюдается рост интенсивности сигнала NADH, с другой стороны, цефазолин и тетрациклин оказывает губительное воздействие на бактерии и на спектре наблюдается уменьшение интенсивности сигнала.

Таким образом, в результате исследований были выбраны оптимальные параметры анализа внутриклеточного NADH, получен его аналитический сигнал.

Применимость метода флуориметрии для исследования свойств и функционирования клеток дает возможность его использования в целях определения количественного содержания различных микроорганизмов в разнообразных объектах. Одним из таких объектов является вода, бактериальное загрязнение которой является угрозой здоровья, а иногда, и жизни человека.

В литературе описано несколько основных методов определения содержания бактерий в воде, однако, все эти методы обладают определенными недостатками, такими как дороговизна оборудования (метод проточной цитометрии), продолжительность анализа (чашечный метод Коха), обязательное минимальное содержание определенного количества бактерий в воде (нефелометрический метод) и т.д.

На основании подобранных ранее условий при исследовании бактерий, был предложен флуориметрический подход к определению содержания микроорганизмов в воде. Анализ показал, что метод флуориметрии пригоден для определения содержания бактерий в количестве  $n \cdot 10^6$  КОЕ, что соответствует классификации природных вод согласно ГОСТ 17.1.3.07-82 «Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков».

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана методика определения содержания бактерий в воде. Правильность разработанной методики подтверждена методом добавок.

Разработанная методика обладает высокой чувствительностью, экспрессностью, простотой пробоподготовки и выполнения анализа. Аналитический сигнал обладает воспроизводимостью и стабильностью. Методика подходит для проведения рутинных анализов на различных производствах и может успешно конкурировать с другими инструментальными методами.

## 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Петрова Л.В., Калюкова Е.Н. Химия воды. Учебное пособие. - Ульяновск: УлГТУ, 2004. – 48 с.
2. Гусева Т.В., Молчанова Я.П. и др. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды Справочные материалы/Т.В.Гусева, Я.П.Молчанова, Е.А.Заика, В.Н.Виниченко, Е.М.Аверочкин/ М. «Эколайн», 2000. – 87 с.
3. Ивчатов А.Л., Малов В.И. Химия воды и микробиология. Учебник. – М.: ИНФРА-М, 2010. – 218 с.
4. Рябчиков Б.Е. Современные методы подготовки воды для промышленного и бытового использования. – М.: ДеЛи принт, 2004. – 328 с.
5. Карюхина Т.А., Чурбанова И.Н. Химия воды и микробиологи: Учебник для техникумов, 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Стройиздат, 1995. – 208 с.
6. Траубе П.Р., Баранова А.Г. Химия и микробиология воды: Учебник для студентов вузов. – М.: Высшая школа, 1983. – 280 с.
7. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология: Учебник, 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.
8. João P. S. Cabral. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water // International Journal of Environmental Research and Public Health. - 2010. – № 7. - P. 3657 – 3703.
9. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под.ред. А.А.Воробьева, А.С.Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.
10. Фирсов Н.Н. Микробиология: словарь терминов. – М.: Дрофа, 2006. – 46 с.

11. Гончарук Е.И., Бардов В.Г., Гаркавий С.И., Яворовский А.П. и др. Коммунальная гигиена / Под ред. Е.И. Гончарука. - К.: Здоровье, 2006. — 792 с.
12. Кутолин С.А., Писиченко Г.М. Химия и микробиология воды: Учебное пособие. – Новосибирск: Изд-во СГУПС, 2002. – 134 с.
13. Peter Feng, Stephen D. Weagant, Michael A. Grant, William Burkhardt. BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4. - September 2002.
14. Сулова М.Ю., Кравченко О.С., Косторнова Т.Я., Парфенова В.В. Санитарно-бактериологическая оценка качества вод в местах выходов минеральных источников долины реки Шумак (Тункинские Гольцы, восточная Сибирь) // Сибирский медицинский журнал. – 2013. - №2. – С. 92 – 95.
15. Raquel Costa de Luca Rebello, Adriana Hamond Regua-Mangia. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil // Science of The Total Environment. – 2014. – V 490. – P. 19 – 27.
16. Hisae Kasai, Koji Kawana, Matthura Labaiden. Elimination of *Escherichia coli* from oysters using electrolyzed seawater // Aquaculture. – 2011. – V 319. – Issues 3-4. – P. 315-318.
17. Yanyan Zhang, Lela K. Riley, Mengshi Lin, Zhiqiang Hu. Determination of low-density *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* suspensions in water // Water Research. – 2012. – V 46. – Issue 7. – P. 2140-2148.
18. P. Bergeron, H. Oujati, V. Catalán Cuenca, J.M. Huguet Mestre, S. Courtois. Rapid monitoring of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in bathing water using Reverse Transcription-quantitative PCR // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2011. – V 214. – Issue 6. – P. 478-484.
19. G.A. Ngwa, R. Schop, S. Weir, C.G. León-Velarde, J.A. Odumeru. Detection and enumeration of *E. coli* O157:H7 in water samples by culture and

molecular methods // Journal of Microbiological Methods. – 2013. – V 92. – Issue 2. – P. 164-172.

20. Горлов И.Ф., Митрофанов А.З., Стребкова З.В., Шинкарева С.В., Щепина М.А. Способ определения бактерий группы кишечных палочек. Патент РФ № 2003135653, МПК C12Q1/04, C12N1/20.

21. W. Sangadkit, O. Rattanabumrung, P. Supanivatin, A. Thipayarat. Practical coliforms and *Escherichia coli* detection and enumeration for industrial food samples using low-cost digital microscopy // Procedia Engineering. – 2012. – V 32. – P. 126-133.

22. Thomas Maskow, Katrin Wolf, Wolfgang Kunze, Sabine Enders, Hauke Harms. Rapid analysis of bacterial contamination of tap water using isothermal calorimetry // Thermochimica Acta. – 2012. – V 543. – P. 273-280.

23. Óluva K. Vang, Charlotte B. Corfitzen, Christian Smith, Hans-Jørgen Albrechtsen. Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water // Water Research. Available online 17 July 2014. Article in press.

24. Sai Ma, Yanyan Tang, Jingqing Liu, Jianmin Wu. Visible paper chip immunoassay for rapid determination of bacteria in water distribution system // Talanta. – 2014. – V 120. – P. 135-140.

25. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учебное пособие / Под. ред. Н.С.Егорова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.

26. Каменская Е.П. Количественный учет микроорганизмов: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ по курсам «Основы микробиологии», «Микробиология», «общая биология и микробиология» / Е.П.Каменская, Е.В.Аверьянова. Изд-во Алт. гос. тех. ун-та, БТИ. – Бийск, 2007. – 35 с.

27. Никитина Е.В., Решетник О.А. Методы общей и специальной микробиологии. Учебное пособие. Казан.гос.технол.ун-т. Казань, 2006. – 123 с.
28. Ветеринарный энциклопедический словарь М.: "Советская Энциклопедия". 1981.
29. Isabel Douterelo, Joby B. Boxall, Peter Deines et al. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems // Water Research. – 2014. – V 65. – P. 134-156.
30. Daniel Ekane Nnane. Sustainable microbial water quality monitoring programme design using phage-lysis and multivariate techniques //Science of The Total Environment. – 2011. – V 409. – Issue 24. – P. 5188-5195.
31. Сакович Г.С., Безматерных М.А.. Физиология и количественный учет микроорганизмов: Уч.пособие / Под.ред. И.С.Селезневой. – ГОУ ВПО УГТУ – УПИ, 2005. – 40 с.
32. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А.Заварзин; Отв.ред. Н.Н.Колотилова; Ин-т микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 348 с.
33. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студ.высш.учеб.заведений / Под ред. А.И.Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
34. Креккер Л.Г., Хамагаева И.С.. Пищевая микробиология: Учебно-методическое пособие – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2010. – 108 с.
35. Barry A. Cragg, R. John Parkes. Bacterial and Archaeal direct counts: A faster method of enumeration, for enrichment cultures and aqueous environmental samples // Journal of Microbiological Methods. – 2014. – V 98. – P. 35-40.
36. Monika Harnisz. Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment // Environmental Pollution. – 2013. – V 174. – P. 85-92.

37. E.I. Prest, F. Hammes , S. Köttsch. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method // Water Research. – 2013. – V 47. – Issue 19. – P. 7131-4142.
38. Simon Gillespie, Patrick Lipphaus, James Green. Assessing microbiological water quality in drinking water distribution systems with disinfectant residual using flow cytometry // Water Research. – 2014. – V 65. – P. 224-234.
39. Dragana Kusić, Bernd Kampe, Petra Rösch, et al. Identification of water pathogens by Raman microspectroscopy // Water Research. – 2014. – V 48. – P. 179-189.
40. Виноградов В.Н., Горбунов А.В., Аван В.К. Бактериальные нарушения водоподготовки и микробиологический контроль качества воды. Повышение эффективности работы энергосистем: Тр. ИГЭУ. Вып. IX / Под. ред. В.А.Шуина, М.Ш.Мисриханова, А.В.Мошкарина. – М.: Энергоатомиздат, 2009. – 572 с.
41. Голец А. В. и др. Разработка электрохимического сенсора для мониторинга бактериального заражения воды // Известия Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2014. – Т.13. – вып.3. – С. 12-16.
42. Степанов Б.И. Люминесценция сложных молекул. Часть 1. — Изд. академии наук БССР, Минск, 1956. – 328 с.
43. Паркер С. Фотолюминесценция растворов, перевод с англ. к.х.н. Н.Л. Комиссаровой, к.х.н. Б.М.Ужинов / под ред. д.ф-м.н. Р.Ф.Васильева. - изд. «Мир», Москва 1972. – 512 с.
44. Люминесцентный анализ / под ред. М.А.Константиновой-Шлезингер. – государственное издательство физико-математической литературы, Москва, 1961. – 400 с.
45. Мандельберг Е.М. В мире холодного света. – М.: Наука, 1968. – 107 с.
46. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 488 с.

47. Степанов Б.И., Грибовский В.П.. Введение в теорию люминесценции. – Изд. академии наук БССР, Минск, 1963. – 444 с.
48. Ельяшевич М.А.. Атомная и молекулярная спектроскопия, изд. 2-е. – М.: Эдиториал УРСС, 2001. – 896 с.
49. Лёвшин Л.В., Салецкий А.М. Люминесценция и ее измерения: молекулярная люминесценция. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 272 с.
50. Долгов В.В., Ованесов Е.Н., Щетникович К.А. Фотометрия в лабораторной практике. - М.: Российская медицинская академия последипломного образования, 2004. – 142 с.
51. Анисимова Н.А. Идентификация органических соединений: учебное пособие (для студентов, обучающихся по специальности «химия»). – Горно-Алтайск: РИО ГАГУ, 2009. – 95с.
52. Прингсхейм П., Фогель М. Люминесценция жидких и твердых тел и ее практическое применение. – М.: ГИИЛ. 1948. – 265 с.
53. Булычев А. А., Верхотуров В. Н., Гуляев Б. А. и др. Современные методы биофизических исследований: Практикум по биофизике: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / под ред. А. Б. Рубина. — М.: Высш. шк. 1988. — 359 с.
54. Барковский В.Ф. и др. Физико-химические методы анализа, Учебник для техникумов. - М.: Высшая школа, 1972. - 344 с.
55. Аранович Г.И., Коршунов Ю.Н., Ляликов Ю.С. Справочник по физико-химическим методам исследования объектов окружающей среды. – Л.: Судостроение, 1979. – 648 с.
56. Титова Н.М. и др. Биохимия и молекулярная биология, Конспект лекций / Н. М. Титова, А. А. Савченко, Т. Н. Замай и др. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 346с
57. Лениджер А. Основы биохимии, т.2. Пер. с англ. – М.: Мир. 1985. – 568 с.
58. Мецлер Д. Биохимия, т.2. Пер. с англ. – М.: Мир. 1980. – 609 с.

59. Смирнов В.А. Витамин и коферменты: учеб. пособ. Ч. 2/ В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2008. – 91 с.
60. Калоус В., Павличек З. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1985. – 446 с.
61. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэл В. Биохимия человека, т.1. – М.: Мир, 2004. – 384 с.
62. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток. – Пущино, 2002. – 131 с.
63. Аникеев Б.В., Затрудина Р.Ш., Конькова Е.П. Спектр поглощения NADH как суперпозиция спектров аденина и никотинамида // Химическая физика и мезоскопия. – 2011. – Т.13. - № 3. – С. 425-431.
64. Готтшлак Г. Метаболизм бактерий. Пер. с англ. / под ред. Е.Н. Кондратьевой. – М.: Мир, 1982. – 310 с.
65. Шульпекова Ю.О. Кисломолочные бактерии: роль в регуляции кишечной перистальтики // РЖГГИ. – 2010. - № 3. – С. 68-73
66. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
67. Глушанова Н.А. // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. - № 4. – С. 50-51.
68. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 1: учеб. По дисциплине «Микробиология, вирусология и иммунология» для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 «Лечеб. дело», 060103.65 «Педиатрия», 060104.65 «Медико-профилактич. дело» / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 448 с.
69. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А., Белова И.В., Иванова Т.П., Соколова К.Я. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Общая биология. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. - № 2 (2). – С. 462-468.

70. Калюжная О.С. Изучение адгезивных свойств микроорганизмов некоторых пробиотических препаратов / О. С. Калюжная, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников // Актуальная биотехнология. – 2014. - № 1 (8). – С. 28-31.

71. Жизнь растений. В 6-ти т. Гл. ред. чл. -кор. АН СССР, проф. А. А. Федоров. Т. Введение. Бактерии и актиномицеты. Под ред. чл.-кор. АН СССР, проф. Н. А. Красильникова и проф. А. А. Уранова. М., «Просвещение», 1974. – 487 с.

72. Концевая И. И. Микробиология: практическое пособие для студентов специальности 1–31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)» / И. И. Концевая Министерство образования РБ, Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины. – Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины», 2011. – 126 с.

73. Плавский В.Ю., Мостовников В.А., Мостовникова Г.Р. и др. Спектрально-люминесцентные свойства комплексов хлорина  $e_6$  и малатдегидрогеназы // Журнал прикладной спектроскопии. – 2004. – Т.71. - № 6. – С. 749-758.

74. Harden A., Young W. J. (24 October 1906) «The alcoholic ferment of yeast-juice Part II.-The coferment of yeast-juice» 78 (526). – P. 369–375.

75. Kornberg A. The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. (англ.) // The Journal of biological chemistry. — 1948. — Vol. 176. — № 3. — P. 1475.

76. Dominik Berndt Michael Grögel New fluorescent probes and assays for lactate and hydrogen peroxide: Diss...phD. – Degendorf. 2011. – 142 p.

77. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. - № 4. - С. 50 – 58.

78. Fernandez M.F., Boris S., Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – V 94. – P. 449 – 455.

79. Marelli G., Papaleo E., Ferrari A. Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2004. – V 8/ - P. 87 – 95.
80. Zaheer Ahmed, Yanping Wang, Qiaoling Cheng et al. Lactobacillus acidophilus bacteriocin, from production to their application: An overview // African Journal of Biotechnology. – 2010 . – Vol. 9 (20). – P. 2843 – 2850.
81. Martin L.Cross. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2002. – V 34. – P. 245 – 253.
82. Gaspar P, et al. From physiology to system metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria // Biotechnol. Adv. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013/03/011>.
83. Никаноров А.М. Гидрохимия: учеб. пособие - Л.: Гидрометеиздат, 1989. – 144 с.
84. Методы анализа природных вод. Резников А.А.. Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Изд. 3-е, переработ. и доп. М., изд-во «Недра», 1970, 488 с.
85. Основы микробиологии, физиологии питания и санитарии: Методическое пособие для студентов заочной формы обучения / Составитель: М.А. Куликова. - Набережные Челны: НГТТИ, 2008. - 57 с.
86. Мальцев В. Н., Пашков Е. П. Медицинская микробиология и иммунология : учебник / под ред. В. В. Зверева. Издательство: Практическая медицина, 2014. – 508 с.
87. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. Для студентов биолог. Спец. Ун-тов, - 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1986. – 448 с.
88. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. пер.с англ. – М.: Мир, 1985. – 272 с.
89. Навашин С.М., Фомина И.П.. Справочник по антибиотикам. Изд. «Медицина», 1947 г. – 416 с.

90. Красникова Л.В. Микробиология: Учебное пособие. – СПб.: Троицкий мост, 2012. – 296 с.
91. Хотько Н.И., Дмитриев А.П., Водный фактор в передаче инфекции. Пенза: 202. – 232 с.
92. Госманов Р.Г., Волков А.Х., Галиуллин А.К. и др. Санитарная микробиология: Учебное пособие. – СПб.: Издательство «Лань», 2010. – 240 с.
93. Общая экология: Учеб. / Под ред. А. С. Степановских. - М.: ЮНИТИ, 2000. – 510 с.
94. Орлов Д.С. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении: Учеб. пособие / Орлов Д.С, Садовникова Л.К., Лозановская И.Н. - М.: Высшая школа, 2002. – 334с.
95. Алекин О.А., Семенов А.Д., Скопинцев Б.А. Руководство по химическому анализу вод суши. 3-е изд. – Л.: Гидрометеиздат, 1973. – 270 с.
96. Лаптев Ф.Ф. Анализ воды. Изд. М.: Госгеолтехиздат. 1955. – 144 с.
97. О.М. Горшкова и др. // Вода: химия и экология. – 2009. - № 11. – С. 31-37.
98. Гостева О.Ю., Изосимов А.А., Пацаева С.В., и др. Флуоресценция водных растворов промышленных гуминовых препаратов // Журнал прикладной спектроскопии. – Т.78. - №6. – 2011.
99. Пикула Н.П. Метрологическое обеспечение и контроль качества химического анализа: учебное пособие / Н.П.Пикула, А.А.Бакибаев, Г.Б.Слепченко; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. – 222 с.
- 100.РМГ 61 – 2003. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа.
- 101.К.Венкатараман. Химия синтетических красителей. Т.2. – СПб.: Ленгосхимиздат, 1952. – 828 с.

102.Петрова С.С., Шавердова В.Г. Фотоанизотропная композиция с расширенным спектральным диапазоном анизотропии // Журнал технической физики. – 2004. – Т.74. – № 6. – С. 123-125.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### 1 Оценка показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) методики анализа

#### 1.1 Оценка показателя повторяемости методики анализа

1.1.1 Рассчитывают среднее арифметическое  $X_{ml}$  и выборочную дисперсию  $S_{ml}^2$  результатов единичного анализа содержания компонента в  $m$ -м ОО, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений):

$$X_{ml} = \frac{\sum_{i=1}^N X_{mli}}{N}, \quad (1)$$

$$S_{ml}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{mli} - X_{ml})^2}{N-1}, \quad (2)$$

$$m = 1, \dots, M; l = 1, \dots, L.$$

1.1.2 На основе полученных значений выборочных дисперсий проверяют гипотезу о равенстве генеральных дисперсий, используя критерий Кохрена.

Значение критерия Кохрена  $G_{m(\max)}$  рассчитывают по формуле

$$G_{m(\max)} = \frac{(S_{ml}^2)_{\max}}{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2} \quad (3)$$

и сравнивают его с табличным значением этого критерия  $G_{\text{табл}}$  для числа степеней свободы  $\nu = N-1$ , соответствующего максимальной дисперсии, и  $f = L$ , соответствующего числу суммируемых дисперсий, и принятой доверительной вероятности  $P = 0,95$  (значения  $G_{\text{табл}}$ ).

Если  $G_{m(\max)} > G_{\text{табл}}$ , то соответствующее  $(S_{ml}^2)_{\max}$  из дальнейших расчетов исключают и процедуру повторяют до следующего по значению  $S_{ml}^2$  и т.д. до тех пор, пока  $G_{m(\max)}$  не станет меньше либо равно  $G_{\text{табл}}$ .

1.1.3 Не исключенные из расчетов  $S_{ml}^2$  считают однородными и по ним оценивают средние квадратические отклонения (далее - СКО), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа (параллельных определений), полученных для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО. Эти СКО -  $S_{rm}$  рассчитывают по формуле

$$S_{rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L S_{ml}^2}{L}}, \quad (4)$$

где в числе слагаемых нет отброшенных значений.

1.1.4 Показатель повторяемости методики анализа в виде СКО повторяемости -  $\sigma_{rm}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, устанавливают, принимая равным  $S_{rm}$

$$\sigma_{rm} \approx S_{rm}. \quad (5)$$

1.1.5 Показатель повторяемости методики анализа в виде предела повторяемости\* -  $r_{nm}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, рассчитывают по формуле

$$r_{nm} = Q(P, n)\sigma_{rm}, \quad (6)$$

где  $n$  - число параллельных определений, предусмотренных методикой анализа для получения результата анализа,  $Q(P, n) = 3,31$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ ;

## 1.2 Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

1.2.1 Рассчитывают выборочное СКО результатов анализа  $m$ -го ОО, полученных в условиях воспроизводимости, -  $S_{Rm}$  по формуле

$$S_{Rm} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_{ml} - X_m)^2}{L-1} + \left(\frac{1}{n} - \frac{1}{N}\right) S_{rm}^2}, \quad m = 1, \dots, M, \quad (7)$$

где  $X_m$  - общее среднее значение результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

$X_m$  рассчитывают по формуле

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^L X_{ml}}{L}, \quad (8)$$

### 1.2.2 Оценка показателя воспроизводимости методики анализа

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО воспроизводимости -  $\sigma_{Rm}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, устанавливают, принимая равным  $S_{Rm}$ :

$$\sigma_{Rm} \approx S_{Rm}. \quad (9)$$

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде предела воспроизводимости\* -  $R_m$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, рассчитывают по формуле

$$R_m = Q(P, 2) \sigma_{Rm}, \quad (10)$$

где  $Q(P, 2) = 2,77$  при  $P = 0,95$ .

Значение предела воспроизводимости используют при проверке приемлемости результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости.

Примечание - В случае невозможности организации эксперимента в разных лабораториях экспериментальные данные получают в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности (серии результатов единичного анализа получают в разное время, разные операторы, используя разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т.п.). Результаты единичного анализа внутри каждой серии получают в условиях повторяемости. В этом случае показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО рассчитывают по формуле

$$\sigma_{Rm} \approx k S_{R_n, m} \quad (11)$$

где  $S_{R_n, m}$  - выборочное СКО результатов анализа, рассчитанное в соответствии с 1.2.1 на основе результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности;

$k$  - коэффициент, учитывающий условия проведения эксперимента.  $k$  может принимать значения от 1,2 до 2,0.

### 1.3 Оценка показателя правильности методики анализа

1.3.1 Рассчитывают оценку математического ожидания систематической погрешности методики анализа -  $\Theta_m$  как разность между средним значением результатов анализа  $X_m$  и аттестованным значением  $m$ -го ОО (СО или АС) -  $C_m$

$$\Theta_m = X_m - C_m, \quad m = 1, \dots, M. \quad (12)$$

1.3.2 Проверяют значимость вычисленных значений  $\Theta_m$  по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывают значение  $t$ -критерия для  $m$ -го ОО -  $t_m$ :

$$t_m = \frac{|\Theta_m|}{\sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{om}^2}{3}}}, \quad (13)$$

где  $S_m^2 = \frac{\sum_{l=1}^L (X_{ml} - X_m)^2}{L-1}$  - дисперсия, характеризующая разброс средних арифметических значений результатов единичного анализа  $X_{ml}$ , полученных в  $l$ -й лаборатории, относительного среднего значения результатов анализа  $X_m$ ;

$\Delta_{om}$  - погрешность аттестованного значения.

1.3.3 Полученное значение  $t_m$  сравнивают с  $t_{\text{табл}}$  при числе степеней свободы  $f = L - 1$  для доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

1.3.4 Если  $t_m \leq t_{\text{табл}}$ , то оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ( $\Theta_m = 0$ ).

1.3.5 Если  $t_m > t_{\text{табл}}$ , то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и для принятия решения о приемлемости методики анализа вводят еще один дополнительный критерий:

$$|\Theta_m| \leq \xi \sigma_{Rm},$$

где  $\xi$  может принимать значения от 0,5 до 1 в зависимости от используемых в методике анализа метода, условий, средств измерений и т.п., а также характеристик объекта анализа.

При выполнении данного критерия может быть принято решение о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение  $\Theta$ , т.е. значение  $\Theta$ , соответствующее содержанию  $C - \Theta(C)$ , вычитают из любого результата анализа, полученного по методике.

Если данный критерий не выполняется, принимают решение о доработке методики.

1.3.6 При незначимости  $\Theta$  или при принятом для методики анализа решении о введении в результаты анализа поправки показатель правильности методики анализа [верхнюю ( $\Delta_{с.в.м}$ ) и нижнюю ( $\Delta_{с.н.м}$ ) границы, в которых неисключенная систематическая погрешность методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в  $m$ -м ОО) находится с принятой вероятностью  $P=0,95$  рассчитывают по формуле

$$\Delta_{с.в.м} = |\Delta_{с.н.м}| = \Delta_{с.м} = 1,96 * \sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{ом}^2}{3}} = 1,96 \sigma_{с.м}. \quad (14)$$

#### 1.4 Оценка показателя точности методики анализа

Верхнюю ( $\Delta_{в.м}$ ) и нижнюю ( $\Delta_{н.м}$ ) границы, в которых погрешность результата анализа\* (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в  $m$ -м ОО) находится с принятой вероятностью  $P=0,95$ , рассчитывают по формуле

$$\Delta_{в.м} = |\Delta_{н.м}| = \Delta_m = 1,96 \sqrt{\sigma_{Rm}^2 + \sigma_{с.м}^2} = 1,96 \sigma_m(\Delta). \quad (15)$$

Примечания

1. Здесь и далее: при выполнении условия  $\frac{\Delta_{с.т}}{\sigma_{Rm}} < 0,8$

показатель точности методики анализа может быть рассчитан по формуле

$$\Delta_{в(н)т} = \pm 1,96 \sigma_{Rm}. \quad (16)$$

2. В случае, если учет  $\Theta(C)$  при вычислении показателя правильности методики анализа

$$\Delta_{с.в(н)т} = \Theta_t \pm 1,96 \sigma_{с.т}, \quad (17)$$

где  $\Delta_{с.в(н)т}$  - верхняя и нижняя границы, в которых систематическая погрешность методики анализа находится с принятой вероятностью  $P = 0,95$ , не приводит к превышению приписанной характеристики погрешности результата анализа над нормой погрешности, поправку в результат на значение  $\Theta(C)$  можно не вносить.

В этом случае показатель точности методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в  $m$ -м ОО) рассчитывают по формуле

$$\Delta_{в(н)т} = \Theta_t \pm 1,96 \sigma_{т(\Delta)}, \quad (18)$$

Для расчета метрологических показателей методики определения общего содержания бактерий в природных водах была выбрана прямолинейная область градуировочной зависимости интенсивности сигнала флуоресценции внутриклеточного метаболита NADH от содержания в пробе бактерий (рис.1)

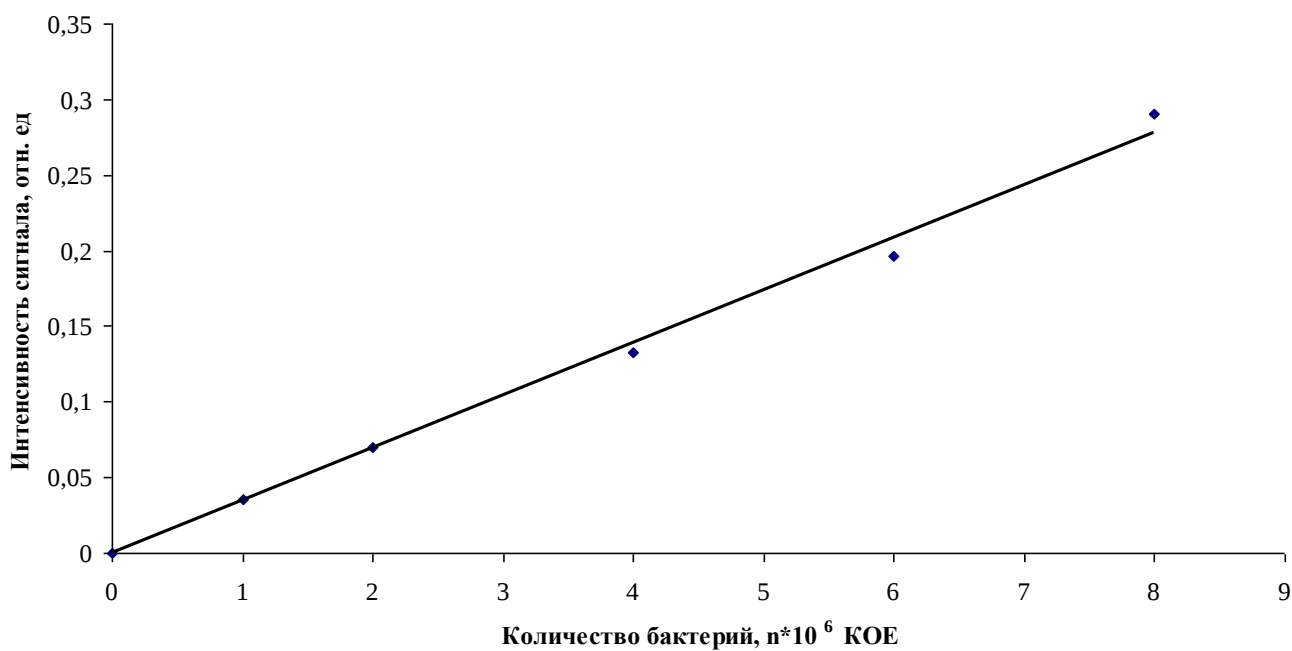


Рисунок 1 - Градуировочная зависимость интенсивности сигнала флуоресценции внутриклеточного NADH от содержания бактерий.

## 1. Содержание бактерий $10^6$

Повторяемость:

| Аттестованное значение КОЕ | Номер серии | $S^2$         | Параллельные определения количества бактерий ( $10^6$ ) |        |
|----------------------------|-------------|---------------|---------------------------------------------------------|--------|
|                            |             |               | 1                                                       | 2      |
| $10^6$                     | 1           | <b>0,0235</b> | 1,1821                                                  | 1,3988 |
|                            | 2           | 0,0043        | 1,1608                                                  | 1,2539 |
|                            | 3           | 0,0075        | 1,3723                                                  | 1,2499 |
|                            | 4           | 0,0079        | 1,1427                                                  | 1,2686 |
|                            | 5           | 0,0061        | 1,4138                                                  | 1,3038 |
|                            | 6           | 0,0019        | 1,2925                                                  | 1,2314 |
|                            | 7           | 0,0019        | 1,5539                                                  | 1,4919 |
|                            | 8           | 0,0038        | 1,3461                                                  | 1,4329 |
|                            | 9           | 0,0045        | 1,4542                                                  | 1,5490 |
|                            | 10          | 0,0163        | 1,5092                                                  | 1,6899 |

| $S^2_{\max}$ | $\Sigma S^2$ | $G_{\text{расч}}$ | $G_{\text{табл}}$ | Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории   |
|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------|
| 0,0235       | 0,0776       | 0,302             | 0,602             | 0,0881                                                    |
|              |              |                   |                   | СКО повторяемости<br>$\sigma^*_{\text{r}} = S_r = 0,0881$ |

### Внутрилабораторная прецизионность:

|                                             |                                                 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям   | 1,3649                                          |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности | $\sigma^*_{\text{Rл}} = S_{\text{Rл}} = 0,1369$ |

|                                                   |         |
|---------------------------------------------------|---------|
| Оценивание систематической погрешности $\theta^*$ | 0,36    |
| Значимость по критерию Стьюдента                  |         |
| t расчетное                                       | 5,0570  |
| t табличное для 9 серий                           | 2,2622  |
| $\sigma^*_{\text{c}}$                             | 0,07216 |

|                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------|
| Границы, в которых находится не исключенная погрешность                          |
| $\Delta^*_{\text{в,с}} = \Delta^*_{\text{н,с}} =  \Delta^*_{\text{c}}  = 0,1414$ |
| $\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,3032$                  |

### С учетом систематической погрешности:

| $\sigma^*_{\text{r}}$ КОЕ | $\sigma^*_{\text{R}}$ КОЕ | $\pm \Delta^*_{\text{c}}$ КОЕ | $\pm \Delta^*$ КОЕ |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------|
| 0,09                      | 0,14                      | 0,51                          | 0,66               |

## 2. Содержание бактерий $2 \cdot 10^6$

Повторяемость:

| Аттестованное значение КОЕ | Номер серии | $S^2$         | Параллельные определения количества бактерий ( $n \cdot 10^6$ ) |        |
|----------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|--------|
|                            |             |               | 1                                                               | 2      |
| $2 \cdot 10^6$             | 1           | 0,0076        | 2,2634                                                          | 2,1403 |
|                            | 2           | 0,0157        | 2,4764                                                          | 2,2991 |
|                            | 3           | 0,0117        | 2,1963                                                          | 2,3493 |
|                            | 4           | 0,0023        | 2,7346                                                          | 2,8020 |
|                            | 5           | 0,0073        | 2,8680                                                          | 2,7470 |
|                            | 6           | 0,0193        | 2,7948                                                          | 2,5983 |
|                            | 7           | <b>0,0400</b> | 2,5285                                                          | 2,8112 |
|                            | 8           | 0,0292        | 2,9836                                                          | 2,7418 |
|                            | 9           | 0,0148        | 3,0539                                                          | 2,8818 |
|                            | 10          | 0,0096        | 3,3401                                                          | 3,2012 |

| $S^2_{\max}$ | $\Sigma S^2$ | $G_{\text{расч}}$ | $G_{\text{табл}}$ | Показатель повторяемости $S_g$ в конкретной лаборатории         |
|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 0,0400       | 0,1575       | 0,253             | 0,602             | 0,1255                                                          |
|              |              |                   |                   | СКО повторяемости $\sigma^*_{\text{г}} = S_{\text{г}} = 0,1255$ |

Внутрилабораторная прецизионность:

|                                             |                                                 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям   | 2,6906                                          |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности | $\sigma^*_{\text{Рл}} = S_{\text{Рл}} = 0,3280$ |

|                                                   |        |
|---------------------------------------------------|--------|
| Оценивание систематической погрешности $\theta^*$ | 0,6905 |
| Значимость по критерию Стьюдента                  |        |
| t расчетное                                       | 5,8175 |
| t табличное для 9 серий                           | 2,2622 |
| $\sigma^*_c$                                      | 0,1187 |

|                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------|
| Границы, в которых находится не исключенная погрешность               |
| $\Delta^*_{\text{в,с}} = \Delta_{\text{н,с}} =  \Delta^*_c  = 0,2326$ |
| $\Delta^*_b = \Delta^*_n = \Delta^* = 0,6836$                         |

С учетом систематической погрешности:

| $\sigma^*_{\text{г}} \text{ КОЕ}$ | $\sigma^*_{\text{Р}} \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^*_c \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^* \text{ КОЕ}$ |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>0,12</b>                       | <b>0,32</b>                       | <b>0,93</b>                  | <b>1,40</b>                |

### 3. Содержание бактерий $4 \cdot 10^6$

Повторяемость:

| Аттестованное значение КОЕ | Номер серии | $S^2$         | Параллельные определения количества бактерий ( $n \cdot 10^6$ ) |         |
|----------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|---------|
|                            |             |               | 1                                                               | 2       |
| $4 \cdot 10^6$             | 1           | 0,0082        | 4,4692                                                          | 4,3412  |
|                            | 2           | 0,0075        | 4,3349                                                          | 4,4576  |
|                            | 3           | 0,0103        | 4,2063                                                          | 4,0631  |
|                            | 4           | 0,0190        | 5,7406                                                          | 5,5455  |
|                            | 5           | 0,0675        | 5,1412                                                          | 5,5086  |
|                            | 6           | 0,0005        | 4,8075                                                          | 4,8383  |
|                            | 7           | 0,0012        | 5,3490                                                          | 4,8098  |
|                            | 8           | <b>0,0948</b> | 5,2452                                                          | 5,16916 |
|                            | 9           | 0,0076        | 5,6369                                                          | 5,7602  |
|                            | 10          | 0,0387        | 5,7821                                                          | 6,0605  |

| $S^2_{\max}$ | $\Sigma S^2$ | $G_{\text{расч}}$ | $G_{\text{табл}}$ | Показатель повторяемости $S_g$ в конкретной лаборатории         |
|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 0,0948       | 0,255        | 0,371             | 0,602             | 0,1598                                                          |
|              |              |                   |                   | СКО повторяемости $\sigma^*_{\text{r}} = S^{\text{r}} = 0,1598$ |

Внутрилабораторная прецизионность:

|                                             |                                                 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям   | 5,0748                                          |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности | $\sigma^*_{\text{RЛ}} = S_{\text{RЛ}} = 0,6181$ |

|                                                                       |        |
|-----------------------------------------------------------------------|--------|
| Оценивание систематической погрешности $\theta^*$                     | 1,0748 |
| Значимость по критерию Стьюдента                                      |        |
| t расчетное                                                           | 5,2734 |
| t табличное для 9 серий                                               | 2,2622 |
| $\sigma^*_c$                                                          | 0,2038 |
| Границы, в которых находится не исключенная погрешность               |        |
| $\Delta^*_{\text{в,с}} = \Delta_{\text{н,с}} =  \Delta^*_c  = 0,3994$ |        |
| $\Delta^*_B = \Delta^*_H = \Delta^* = 1,2757$                         |        |

С учетом систематической погрешности:

| $\sigma^*_{\text{r}} \text{ КОЕ}$ | $\sigma^*_{\text{R}} \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^*_c \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^* \text{ КОЕ}$ |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>0,16</b>                       | <b>0,61</b>                       | <b>1,47</b>                  | <b>2,35</b>                |

#### 4. Содержание бактерий $6 \cdot 10^6$

Повторяемость:

| Аттестованное значение КОЕ | Номер серии | $S^2$         | Параллельные определения количества бактерий ( $n \cdot 10^6$ ) |        |
|----------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|--------|
|                            |             |               | 1                                                               | 2      |
| $6 \cdot 10^6$             | 1           | 0,0246        | 6,6533                                                          | 6,4317 |
|                            | 2           | 0,0064        | 6,8035                                                          | 6,6899 |
|                            | 3           | 0,0070        | 7,0594                                                          | 6,9412 |
|                            | 4           | 0,0541        | 8,7086                                                          | 8,3798 |
|                            | 5           | 0,0018        | 7,3585                                                          | 7,4179 |
|                            | 6           | 0,0457        | 7,0720                                                          | 7,3744 |
|                            | 7           | 0,0170        | 6,9928                                                          | 7,1772 |
|                            | 8           | 0,0120        | 7,5271                                                          | 7,3720 |
|                            | 9           | 0,0717        | 7,7862                                                          | 9,1648 |
|                            | 10          | <b>0,1417</b> | 8,0510                                                          | 7,5187 |

| $S^2_{\max}$ | $\Sigma S^2$ | $G_{\text{расч}}$ | $G_{\text{табл}}$ | Показатель повторяемости $S_g$ в конкретной лаборатории         |
|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 0,1417       | 0,3818       | 0,369             | 0,602             | 0,1954                                                          |
|              |              |                   |                   | СКО повторяемости $\sigma^*_{\text{г}} = S_{\text{г}} = 0,1954$ |

Внутрилабораторная прецизионность:

|                                             |                                                 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям   | 7,4740                                          |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности | $\sigma^*_{\text{Рл}} = S_{\text{Рл}} = 0,7703$ |

|                                                                       |        |
|-----------------------------------------------------------------------|--------|
| Оценивание систематической погрешности $\theta^*$                     | 1,4740 |
| Значимость по критерию Стьюдента                                      |        |
| t расчетное                                                           | 5,8882 |
| t табличное для 9 серий                                               | 2,2622 |
| $\sigma^*_c$                                                          | 0,2503 |
| Границы, в которых находится не исключенная погрешность               |        |
| $\Delta^*_{\text{в,с}} = \Delta_{\text{н,с}} =  \Delta^*_c  = 0,4906$ |        |
| $\Delta^*_B = \Delta^*_H = \Delta^* = 1,5874$                         |        |

С учетом систематической погрешности:

| $\sigma^*_{\text{г}} \text{ КОЕ}$ | $\sigma^*_{\text{R}} \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^*_c \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^* \text{ КОЕ}$ |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>0,19</b>                       | <b>0,47</b>                       | <b>1,94</b>                  | <b>3,00</b>                |

## 5.Содержание бактерий $8 \cdot 10^6$

Повторяемость:

| Аттестованное значение КОЕ | Номер серии | $S^2$         | Параллельные определения количества бактерий ( $n \cdot 10^6$ ) |         |
|----------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|---------|
|                            |             |               | 1                                                               | 2       |
| $8 \cdot 10^6$             | 1           | 0,0063        | 8,1876                                                          | 8,5432  |
|                            | 2           | 0,0304        | 8,7147                                                          | 8,9611  |
|                            | 3           | 0,0604        | 8,5960                                                          | 8,9435  |
|                            | 4           | 0,0631        | 10,6447                                                         | 10,2893 |
|                            | 5           | 0,0070        | 10,5458                                                         | 10,6640 |
|                            | 6           | 0,0020        | 9,0688                                                          | 9,0052  |
|                            | 7           | 0,0153        | 9,5406                                                          | 9,3657  |
|                            | 8           | 0,0089        | 9,7421                                                          | 9,6089  |
|                            | 9           | 0,0349        | 9,7037                                                          | 9,9680  |
|                            | 10          | <b>0,2089</b> | 10,5986                                                         | 11,2450 |

| $S^2_{\max}$ | $\Sigma S^2$ | $G_{\text{расч}}$ | $G_{\text{табл}}$ | Показатель повторяемости $S_r$ в конкретной лаборатории |
|--------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------------------------|
| 0,2089       | 0,4941       | 0,420             | 0,602             | 0,2223                                                  |
|              |              |                   |                   | СКО повторяемости $\sigma^*_{\text{r}} = S_r = 0,2223$  |

Внутрилабораторная прецизионность:

|                                             |                                                 |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям   | 9,5968                                          |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности | $\sigma^*_{\text{RL}} = S_{\text{RL}} = 0,8630$ |

|                                                                       |         |
|-----------------------------------------------------------------------|---------|
| Оценивание систематической погрешности $\theta^*$                     | 1,5668  |
| Значимость по критерию Стьюдента                                      |         |
| t расчетное                                                           | 5,7246  |
| t табличное для 9 серий                                               | 2,2622  |
| $\sigma^*_c$                                                          | 0,27894 |
| Границы, в которых находится не исключенная погрешность               |         |
| $\Delta^*_{\text{в,с}} = \Delta_{\text{н,с}} =  \Delta^*_c  = 0,5467$ |         |
| $\Delta^*_B = \Delta^*_H = \Delta^* = 1,7776$                         |         |

С учетом систематической погрешности:

| $\sigma^*_{\text{r}} \text{ КОЕ}$ | $\sigma^*_{\text{R}} \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^*_c \text{ КОЕ}$ | $\pm \Delta^* \text{ КОЕ}$ |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>0,22</b>                       | <b>0,86</b>                       | <b>2,12</b>                  | <b>3,4</b>                 |

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Оценка показателя правильности методики анализа методом добавок.

1. Рассчитывают значения следующих величин:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{l=1}^L x_l}{L} \quad (1)$$

— среднее значение результатов анализа пробы без добавки.

$$\bar{x}' = \frac{\sum_{l=1}^L x'_l}{L} \quad (2)$$

— среднее значение результатов анализа пробы с добавкой.

$$\bar{x}_d = \frac{\sum_{l=1}^L (x'_l - x_l)}{L} \quad (3)$$

— среднее значение экспериментально найденной добавки;

$$S_1 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (x_l - \bar{x})^2}{L-1}} \quad (4)$$

— СКО, характеризующее случайный разброс результатов анализа пробы без добавки;

$$S_2 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (x'_l - \bar{x}')^2}{L-1}} \quad (5)$$

— СКО, характеризующее случайный разброс результатов анализа пробы с добавкой;

$$\Theta = \bar{x}_d - C \quad (6)$$

— оценку математического ожидания систематической погрешности методики анализа, где  $C$  — аттестованное значение добавки к пробе;

$$t = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L} + \frac{\Delta_{\text{доб}}^2}{3}}} \quad (7)$$

— рассчитанное значение  $t$ -критерия,

2. Расчетное значение  $t$  сравнивают с  $t_{\text{табл}}$  при числе степеней свободы  $f = L - 1$  и доверительной вероятности  $P = 0,95$

3. Если  $t \leq t_{\text{табл}}$ , то оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ( $\Theta = 0$ ).

4. Если  $t > t_{\text{табл}}$ , то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и принимается решение о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение  $\Theta$ .

5. При незначимости  $\Theta$  или при принятом для методики анализа решении о введении в результаты анализа поправки показатель правильности методики анализа [верхнюю ( $\Delta_{\text{с.в}}$ ) и нижнюю ( $\Delta_{\text{с.н}}$ ) границы, в которых неисключенная систематическая погрешность методики анализа находится с принятой вероятностью  $P = 0,95$ ] рассчитывают по формуле

$$\Delta_{\text{с.в}} = |\Delta_{\text{с.н}}| = \Delta_{\text{с}} = 1,96 \sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L} + \frac{\Delta_{\text{доб}}^2}{3}} = 1,96\sigma_{\text{с}}. \quad (8)$$

Примечание — В случае, если учет  $\Theta$  ( $C$ ) при вычислении показателя правильности методики анализа

$$\Delta_{\text{с.в(н)}} = \Theta \pm 1,96\sigma_{\text{с}}, \quad (9)$$

где  $\Delta_{\text{с.в(н)}}$  — верхняя и нижняя границы, в которых систематическая погрешность методики анализа находится с принятой вероятностью  $P = 0,95$ , не приводит к превышению приписанной характеристики погрешности результата анализа над нормой погрешности, поправку в результат на значение  $\Theta$  ( $C$ ) можно не вносить.

В этом случае показатель точности методики анализа рассчитывают по формуле

$$\Delta_{\text{в(н)}} = \Theta \pm 1,96\sigma(\Delta). \quad (10)$$

### 1. Содержание бактерий в добавке $1 \cdot 10^6$ КОЕ

| Номер серии | Проба         |          | Проба с добавкой |          | Добавка |
|-------------|---------------|----------|------------------|----------|---------|
|             | Интенсивность | Пересчет | Интенсивность    | Пересчет |         |
| 1           | 0,098         | 2,824    | 0,127            | 3,660    | 0,836   |
| 2           | 0,101         | 2,911    | 0,124            | 3,573    | 0,663   |
| 3           | 0,114         | 3,285    | 0,138            | 3,977    | 0,692   |
| 4           | 0,103         | 2,968    | 0,126            | 3,631    | 0,663   |
| 5           | 0,116         | 3,343    | 0,139            | 4,006    | 0,663   |
| 6           | 0,096         | 2,767    | 0,128            | 3,689    | 0,922   |
| 7           | 0,110         | 3,170    | 0,131            | 3,775    | 0,605   |
| 8           | 0,112         | 3,228    | 0,141            | 4,063    | 0,836   |
| 9           | 0,113         | 3,256    | 0,137            | 3,948    | 0,692   |
| 10          | 0,099         | 2,853    | 0,129            | 3,718    | 0,865   |

|                                                     |      |
|-----------------------------------------------------|------|
| Среднее по пробе                                    | 3,06 |
| Среднее по пробе с добавкой                         | 3,80 |
| Среднее по добавке                                  | 0,74 |
| СКО пробы без добавки, S1                           | 0,21 |
| СКО пробы с добавкой, S2                            | 0,17 |
| Математическое ожидание систематической погрешности | 0,26 |
| t-критерий                                          | 2,42 |
| t-критерий табличный                                | 2,26 |

Расчетное значение t-критерия оказалось больше табличного, в этом случае принимается решение о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение  $\Theta$ .

Рассчитываем показатель правильности методики анализа:

$$\Delta_{с.в} = \Delta_{с.в} = \Delta_c = 1,96\sigma_c = 0,21$$

$$\Delta_{с.в(н)} = \Theta \pm 1,96\sigma_c = 0,26 \pm 0,21$$

Рассчитываем показатель точности методики анализа:

$$\Delta_{в(н)} = \Theta \pm 1,96\sigma(\Delta), \text{ где } \sigma(\Delta) = 0,17$$

$$\Delta_{в(н)} = 0,26 \pm 0,33$$

## 2. Содержание бактерий в добавке $4 \cdot 10^6$ КОЕ

| Номер серии | Проба         |          | Проба с добавкой |          | Добавка |
|-------------|---------------|----------|------------------|----------|---------|
|             | Интенсивность | Пересчет | Интенсивность    | Пересчет |         |
| 1           | 0,050         | 1,441    | 0,180            | 5,187    | 3,746   |
| 2           | 0,041         | 1,182    | 0,148            | 4,265    | 3,084   |
| 3           | 0,042         | 1,210    | 0,168            | 4,841    | 3,631   |
| 4           | 0,044         | 1,268    | 0,162            | 4,669    | 3,401   |
| 5           | 0,047         | 1,354    | 0,164            | 4,726    | 3,372   |
| 6           | 0,052         | 1,499    | 0,181            | 5,216    | 3,718   |
| 7           | 0,050         | 1,447    | 0,161            | 4,640    | 3,193   |
| 8           | 0,053         | 1,527    | 0,189            | 5,447    | 3,919   |
| 9           | 0,061         | 1,758    | 0,190            | 5,476    | 3,718   |
| 10          | 0,062         | 1,787    | 0,179            | 5,159    | 3,372   |

|                                                     |      |
|-----------------------------------------------------|------|
| Среднее по пробе                                    | 1,44 |
| Среднее по пробе с добавкой                         | 4,96 |
| Среднее по добавке                                  | 3,51 |
| СКО пробы без добавки, S1                           | 0,20 |
| СКО пробы с добавкой, S2                            | 0,39 |
| Математическое ожидание систематической погрешности | 0,48 |
| t-критерий                                          | 3,15 |
| t-критерий табличный                                | 2,26 |

Расчетное значение t-критерия оказалось больше табличного, в этом случае принимается решение о введении в результаты анализа, получаемые при реализации данной методики, поправки на значение  $\Theta$ .

Рассчитываем показатель правильности методики анализа:

$$\Delta_{с.в} = \Delta_{с.в} = \Delta_c = 1,96\sigma_c = 0,29$$

$$\Delta_{с.в(н)} = \Theta \pm 1,96\sigma_c = 0,48 \pm 0,29$$

Рассчитываем показатель точности методики анализа:

$$\Delta_{в(н)} = \Theta \pm 1,96\sigma(\Delta), \text{ где } \sigma(\Delta) = 0,62$$

$$\Delta_{в(н)} = 0,48 \pm 1,25$$

### 3. Содержание бактерий в добавке $8 \cdot 10^6$ КОЕ

| Номер серии | Проба         |          | Проба с добавкой |          | Добавка |
|-------------|---------------|----------|------------------|----------|---------|
|             | Интенсивность | Пересчет | Интенсивность    | Пересчет |         |
| 1           | 0,112         | 3,228    | 0,372            | 10,720   | 7,493   |
| 2           | 0,109         | 3,141    | 0,362            | 10,432   | 7,291   |
| 3           | 0,110         | 3,170    | 0,358            | 10,317   | 7,147   |
| 4           | 0,112         | 3,228    | 0,349            | 10,058   | 6,830   |
| 5           | 0,123         | 3,545    | 0,348            | 10,029   | 6,484   |
| 6           | 0,124         | 3,573    | 0,440            | 12,680   | 9,107   |
| 7           | 0,127         | 3,660    | 0,405            | 11,671   | 8,012   |
| 8           | 0,129         | 3,718    | 0,384            | 11,066   | 7,349   |
| 9           | 0,140         | 4,035    | 0,431            | 12,421   | 8,386   |
| 10          | 0,142         | 4,092    | 0,434            | 12,507   | 8,415   |

|                                                     |       |
|-----------------------------------------------------|-------|
| Среднее по пробе                                    | 3,53  |
| Среднее по пробе с добавкой                         | 11,19 |
| Среднее по добавке                                  | 7,65  |
| СКО пробы без добавки, S1                           | 0,34  |
| СКО пробы с добавкой, S2                            | 1,04  |
| Математическое ожидание систематической погрешности | 0,35  |
| t-критерий                                          | 0,98  |
| t-критерий табличный                                | 2,26  |

Расчетное значение t-критерия оказалось меньше табличного, в этом случае оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ( $\Theta = 0$ ).

Рассчитываем показатель правильности методики анализа:

$$\Delta_{с.в} = \Delta_{с.в} = \Delta_c = 1,96\sigma_c = 0,69$$

$$\Delta_{с.в(н)} = 0,69$$

Рассчитываем показатель точности методики анализа:

$$\Delta_B = \Delta_H = \Delta = 1,96\sigma(\Delta), \text{ где } \sigma(\Delta) = 0,63$$

$$\Delta = 1,25$$

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Алгоритм расчета коэффициентов в уравнении регрессии:

Коэффициент **b** рассчитывается по формуле:

$$\frac{nS_{xy} - S_x S_y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (1)$$

Коэффициент **a** рассчитывается по формуле:

$$\frac{S_x^2 S_y - S_x S}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (2)$$

Где:

- $\sum x$  - сумма концентраций определяемого ингредиента во всех стандартных растворах, начиная с первого и заканчивая последним;
- $\sum x^2$  - сумма квадратов вышеуказанных концентраций;
- $\sum xy$  - сумма произведений концентрации определяемого ингредиента, умноженного на его интенсивность флуоресценции во всех стандартных растворах;
- $(\sum x)^2$  - сумма концентраций определяемого ингредиента в вышеуказанных стандартных, возведенная в квадрат;
- $\sum y$  - сумма интенсивностей флуоресценции всех стандартных растворов.

Для контроля аналитической работы получение более точных результатов параллельно определяют и вычисляют сходимость результатов (Р,%), т.е. качество измерений, отражающих близость друг к другу результатов, полученных в одинаковых условиях.

Расчет погрешности между параллельными исследованиями (y1,y2,y3) следует производить по следующей формуле:

$$p = 2 \frac{A_1 - A_2}{A_1 + A_2} \times 100\% \quad (3)$$

Где:

A1- больший результат из параллельных определений,

A2- меньший результат из параллельных определений.

Расчет воспроизводимости  $\Delta, \%$  (относительной погрешности между уср и урасч) производится по формуле:

$$\Delta = \frac{Y_{cp} - Y_{расч}}{Y_{расч}} \times 100\% \quad (4)$$

При этом воспроизводимость результатов не должна превышать +15%