

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2688328

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ

Патентообладатель: *федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики" (Университет ИТМО) (RU)*

Авторы: *Сибирцев Владимир Станиславович (RU),
Успенская Майя Валерьевна (RU)*

Заявка № 2018123454

Приоритет изобретения 27 июня 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 мая 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 27 июня 2038 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/18 (2019.02); C12N 1/20 (2019.02); C12R 1/225 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2018123454, 27.06.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.06.2018

Дата регистрации:
21.05.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.06.2018

(45) Опубликовано: 21.05.2019 Бюл. № 15

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр.,
49, Университет ИТМО, ОИС и НТИ

(72) Автор(ы):

Сибирцев Владимир Станиславович (RU),
Успенская Майя Валерьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Санкт-Петербургский
национальный исследовательский
университет информационных технологий,
механики и оптики" (Университет ИТМО)
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: СИБИРЦЕВ В.С. и др.
"Кондуктометрическое биотестирование в
применении к оценке про- и
антибактериальных свойств католитов и
анолитов"// Научно-технический вестник
информационных технологий, механики и
оптики, 2016, том 16, N 3, с.573-576. RU
2450022 C2, 10.05.2012. RU 2239184 C2,
27.10.2004.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии. Предложен способ определения бактерицидных свойств веществ. Способ включает инкубирование тестовых микроорганизмов *Escherichia coli* в количестве от 5×10^5 до 5×10^6 жизнеспособных клеток на мл в жидкой питательной среде в течение 4-8 ч при 36-38°C в присутствии тестируемых веществ и в их отсутствии. Измеряют интенсивность упругого светорассеяния (Iod), редокс потенциал (E) и электропроводность (X). Общую степень активирования или ингибирования (+/-)

жизнедеятельности тестовых микроорганизмов тестируемыми веществами определяют по формуле: $\epsilon_s = (\epsilon_{Iod} + 0,5\epsilon_E + 0,5\epsilon_X)/2$, где ϵ_{Iod} , ϵ_E и ϵ_X определяют по формулам $\epsilon_Y = 100 \times (\Delta Y_t - \Delta Y_c) / \Delta Y_c$, где $\Delta Y = Y_e - Y_b$ - разности значений Iod, E или X, регистрируемых в начале (Y_b) и в конце (Y_e) инкубации тестовых образцов в присутствии тестируемых веществ (ΔY_t) и в их отсутствии (ΔY_c). Способ обеспечивает объективность оценки определения бактерицидных свойств веществ. 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12Q 1/18 (2019.02); C12N 1/20 (2019.02); C12R 1/225 (2019.02)

(21)(22) Application: 2018123454, 27.06.2018

(24) Effective date for property rights:
27.06.2018Registration date:
21.05.2019

Priority:

(22) Date of filing: 27.06.2018

(45) Date of publication: 21.05.2019 Bull. № 15

Mail address:

197101, Sankt-Peterburg, Kronverkskij pr., 49,
Universitet ITMO, OIS i NTI

(72) Inventor(s):

Sibirtsev Vladimir Stanislavovich (RU),
Uspenskaya Majya Valerevna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Sankt-Peterburgskij natsionalnyj
issledovatel'skij universitet informatsionnykh
tekhnologij, mekhaniki i optiki" (Universitet
ITMO) (RU)

(54) METHOD OF DETERMINING BACTERICIDAL PROPERTIES OF SUBSTANCES

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and microbiology. Disclosed is a method of determining bactericidal properties of substances. Method comprises incubation of test microorganisms *Escherichia coli* in amount of 5×10^5 to 5×10^6 of viable cells per ml in a liquid nutrient medium for 4–8 hours at 36–38 °C in the presence of test substances and in their absence. Intensity of elastic light scattering (Iod), redox potential (E) and electric conductivity (X) are measured. Total degree of activating or inhibiting (+/-) vital activity of

test microorganisms by test substances is determined by formula: $\varepsilon_s = (\varepsilon_{Iod} + 0,5\varepsilon_E + 0,5\varepsilon_X)/2$, where ε_{Iod} , ε_E and ε_X is determined by formulas $\varepsilon_Y = 100 \times (\Delta Y_t - \Delta Y_c) / \Delta Y_c$, where $\Delta Y = Y_e - Y_b$ – differences of values Iod, E or X, recorded in beginning (Yb) and at end (Ye) incubation of test samples in presence of test substances (ΔY_t) and in their absence (ΔY_c).

EFFECT: method provides objectivity of evaluating bactericidal properties of substances.

1 cl, 1 tbl

Изобретение относится к области биоизмерительных технологий, а именно к способам оценки с помощью тестовых микроорганизмов бактерицидных свойств различных веществ.

Известен «Способ определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным веществам» (патент RU №2505813, МПК G01N 33/48, дата приоритета 06.11.2012, опубликовано 27.01.2014), в котором антимикробную активность тестируемых веществ по отношению к тому или иному биоматериалу предлагается определять, исходя из количества колоний микроорганизмов, исходно содержащихся в означенном биоматериале и выросших на плотной накопительной питательной среде в присутствии тестируемого препарата, а также времени проявления видимого роста этих колоний. Недостатками этого способа являются его длительность (до 3-х суток), большая трудоемкость, большая материалоемкость по компонентам питательных сред, а также то, что антимикробная активность тестируемых веществ определяется визуально, и, следовательно, достаточно субъективно.

Известен «Способ оценки эффективности антимикробного воздействия антисептиков на бактерии, существующие в форме биопленки» (патент RU №2603100, МПК C12Q, дата приоритета 29.10.2015, опубликовано 20.11.2016), в котором эффективность действия антисептиков на бактерии, выделенные из клинического материала пациента и существующие в жидкой питательной среде (ЖПС) в форме биопленки, предлагается определять как отношение рабочей концентрации антисептика к его минимальной подавляющей концентрации. При этом регистрацию эффективности действия той или иной концентрации тестируемого антисептика на биопленку предлагается проводить с помощью фотометра - по изменению цвета и помутнению ЖПС с тестовыми микроорганизмами, инкубируемой при заданной температуре в течение заданного времени (от 5-и суток и более) в присутствии тестируемого антисептика, взятого в упомянутой концентрации. Основными недостатками этого способа, как и в предыдущих случаях, являются его большая длительность и трудоемкость, а также невысокая объективность, поскольку рассматриваемый способ позволяет оценивать влияние тестируемых веществ лишь на скорость роста тестовых микроорганизмов, но не на интенсивность их метаболизма.

Наиболее близким к предлагаемому техническому решению является «Способ определения бактерицидных свойств сыворотки крови» (патент RU №2489489, МПК C12Q 1/18, дата приоритета 26.12.2011, опубликовано 10.08.2013), в котором бактерицидные свойства проб сыворотки крови определяют по уменьшению интенсивности люминесценции инкубируемого в LB-бульоне в присутствии тестируемых проб тестового трансгенного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10548, эффективно экспрессирующего luxAB-гены грамотрицательного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* (в результате чего синтезируется фермент люцифераза, обеспечивающий активное свечение, интенсивность которого зависит от общего количества жизнеспособных тестовых микроорганизмов и активности их метаболизма). При этом анализ осуществляют следующим образом:

на первом (подготовительном) этапе выращивают штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10548 на LB-агаре в присутствии канамицина в конечной концентрации 40 мкг/мл (что позволяет исключить рост не люминесцирующих штаммов) при 37°C в течение 24 часов. Полученную биомассу смывают стерильным LB-бульоном, после чего полученную суспензию стандартизуют до оптической плотности 1,2 отн. ед. при 540 нм (измеряемой в кюветах с длиной оптического пути 1 см);

на втором (основном) этапе смешивают суспензию бактериальных клеток и

исследуемого образца сыворотки крови в соотношении 1:1 и инкубируют полученную смесь при 37°C в течение 30 минут. При этом до и после инкубации из тестовой смеси производят отбор аликвот по 250 мкл в кюветы для биолюцинометра. И дополнительно вносят в них по 2 мкл деканала в конечной концентрации 7×10^{-6} М (окисляемого в присутствии молекулярного кислорода ферментом люциферазой - что и обеспечивает активное свечение тестового штамма).

На завершающем этапе осуществляют регистрацию уровня свечения в пробах в видимой сине-зеленой области спектра (420-600 нм). При этом в качестве измерительного прибора могут использоваться биохемилюцинометр «Биоток-10М», а также прочие отечественные и зарубежные люцинометры, работающие в обозначенной области спектра и обеспечивающие соответствующую чувствительность измерений.

К основным недостаткам данного технического решения можно отнести:

- узкую область применения (анализ бактерицидных свойств только лишь сыворотки крови человека и животных);

- необходимость использования специально выведенного, трансгенного, узкоспециализированного штамма тестовых микроорганизмов - что дополнительно ограничивает область применения данного технического решения, поскольку для тестирования про- и антибиотических свойств разных веществ могут требоваться разные тестовые организмы (либо лучше даже совокупность из нескольких разных видов и штаммов тестовых организмов);

- кроме того, штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10548, применяемый при реализации данного технического решения, не является широко доступным, и потому достаточно трудно сначала получить данный штамм, а затем длительное время поддерживать его чистоту, жизнеспособность и специфические свойства (выражающиеся, в частности, в активном синтезе фермента люциферазы);

- а также то, что рассматриваемый метод обладает не очень высокой объективностью, поскольку влияние тестируемых объектов (в качестве которых в данном случае выступают образцы сыворотки крови животных и человека) на тестовые организмы определяется всего лишь по одному косвенному параметру (интенсивности хемилюминесценции этих объектов) и с использованием тест-культуры с метаболизмом, не типичным по ряду параметров для большинства живых организмов.

Решается задача расширения области применения, а также повышения объективности и обеспечения доступности для использования более широким кругом пользователей способа определения бактерицидных свойств различных веществ.

Сущность заключается в том, что в предлагаемом способе (который включает такие операции как: подготовка тестовых образцов, инкубирование этих образцов, как в присутствии тестируемых веществ, так и в их отсутствие, сопровождающееся измерением свойств этих образцов в начале и в конце их инкубации, и последующее определение бактерицидных свойств тестируемых веществ на основании упомянутых измерений) тестовые образцы перед началом их инкубирования представляют собой *Escherichia coli*

в количестве от 5×10^5 до 5×10^6 жизнеспособных клеток на мл, суспендированную в водном растворе, изначально содержащем 4-6 г/л глюкозы, 16-20 г/л белкового гидролизата и 1,8-2,2 г/л NaCl, и имеющем pH 6,8-7,4; инкубирование этих образцов в присутствии тестируемых веществ проводят в течение 4-8 часов при 36-38°C; свойства образцов определяют путем измерения значений интенсивности упругого светорассеяния (Iod), редокс потенциала (E) и электропроводности (X); после чего общую степень активирования или ин-гибирования (+/-) жизнедеятельности тестовых микроорганизмов

тестируемыми веществами определяют по формуле: $\varepsilon_s = (\varepsilon_{Iod} + 0,5\varepsilon_E + 0,5\varepsilon_X)/2$, где ε_{Iod} , ε_E и ε_X определяют по формулам $\varepsilon_Y = 100 \times (\Delta Y_t - \Delta Y_c) / \Delta Y_c$, где $\Delta Y = Y_e - Y_b$ - разности значений Iod, E или X, регистрируемых в начале (Y_b) и в конце (Y_e) инкубации тестовых образцов в присутствии тестируемых веществ (ΔY_t) и в их отсутствие (ΔY_c).

При этом выбор *Escherichia coli* в качестве тестовых микроорганизмов связан с тем, что *E. coli* является общепринятым санитарно-показательным микроорганизмом, официально рекомендуемым, в частности, для оценки качества воды, пищевой продукции, фармакологических и иных препаратов и т.п. (ГОСТ 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа. + ГОСТ 30726-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli* + Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под. ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.); способна к активной жизнедеятельности как в аэробных, так и в анаэробных условиях, в широком диапазоне температур и на самых разнообразных субстратах (включая полное отсутствие органических веществ); является типичным представителем микрофлоры большинства природных водоемов и территорий, производственных и бытовых помещений, кишечника человека и большинства млекопитающих; легко доступна в получении, выделении (при необходимости) и культивировании; а также обладает весьма развитой ферментной системой, позволяющей *E. coli* осуществлять широкий спектр метаболических процессов, типичных для других живых организмов, и соответственно, типично для большинства живых организмов реагировать на присутствие широкого круга тестируемых объектов.

Выбор количества жизнеспособных тестовых микроорганизмов, которое должно присутствовать в тестовых образцах перед началом их инкубации в присутствии и в отсутствие тестируемых веществ (от 5×10^5 до 5×10^6 кл/мл), определяется тем, что при меньшем количестве таковых микроорганизмов увеличивается длительность инкубации, необходимая для достижения максимальной чувствительности заявляемого способа анализа; а при большем количестве тестовых микроорганизмов снижается интенсивность их роста и метаболизма, что приводит к уменьшению чувствительности анализа.

Выбор исходного состава жидкой питательной среды, входящей в состав тестируемых образцов (водный раствор с pH 6,8-7,4, содержащий 4-6 г/л глюкозы, 16-20 г/л белкового гидролизата и 1,8-2,2 г/л NaCl), связан с необходимостью обеспечения оптимальных условий для развития в этой среде тестовых микроорганизмов - что, как и в предыдущем случае, нужно для увеличения чувствительности и снижения продолжительности анализа.

Выбор режима инкубирования тестовых образцов (4-8 часов при 36-38°C) связан с тем, что при более длительном инкубировании снижается интенсивность роста и метаболизма тестовых микроорганизмов (что приводит к соответствующему снижению чувствительности анализа); при других температурах инкубирования интенсивность роста и метаболизма тестовых микроорганизмов также снижается (что приводит к уменьшению чувствительности анализа и необходимости увеличения его длительности); а при меньшем времени инкубирования тестовые микроорганизмы не успевают в достаточной степени среагировать на изменения в окружающей их среде, вызванные присутствием там тестируемых объектов (что приводит к снижению, как чувствительности, так и объективности анализа).

Увеличение (по сравнению с прототипом) объективности и спектра применимости заявляемого способа анализа обеспечивается тем, что в ходе него осуществляется точная, инструментальная, количественная оценка изменения как интенсивности роста

(оцениваемой нефелометрическим методом по изменению у тестовых образцов значений Iod), так и метаболической активности (оцениваемой по изменению у тестовых образцов значений E и X) общепринятых санитарно-показательных тестовых микроорганизмов (*E. coli*) вследствие воздействия на них широкого круга тестируемых объектов (которые могут включать в себя как различные отдельные химические частицы, вещества и материалы, так и их разнообразные смеси). В то время как в прототипе влияние тестируемых веществ на тестовые микроорганизмы определялось всего лишь по одному параметру тестового образца (а именно, интенсивности его хемилюминесценции); причем данным способом предлагалось оценивать бактерицидные свойства весьма узкого круга тестируемых объектов (а именно, сыворотки крови человека и животных), и к тому же, с помощью трансгенного, узкоспециализированного штамма тестовых микроорганизмов *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10548 с метаболизмом, не типичным по ряду параметров для большинства живых организмов.

А доступность заявляемого способа анализа более широкому кругу пользователей обеспечивается, во-первых, возможностью применения для регистрации параметров тестовых образцов таких простых в эксплуатации, доступных и дешевых, переносных приборов, как например нефелометр «WGZ-2», иономер «Эксперт-001» и кондуктометр «Эксперт-002». Во-вторых, применением при анализе минимального числа дополнительных реагентов и ручных операций по засеву и оценке роста и метаболической активности тестовых микроорганизмов в присутствии тестируемых объектов (в то время как в прототипе предлагалось использовать такие специфические химические реагенты, как канамицин, деканаль и т.п., а также осуществлять множество дополнительных ручных операций по выращиванию тестовых микроорганизмов на LB-агаре и последующему приготовлению суспензии бактериальных клеток в LB-бульоне). И, в-третьих, возможностью применения для анализа такого хорошо доступного и легко культивируемого вида тестовых микроорганизмов, как *E. coli* (в то время как в прототипе в качестве тестовых микроорганизмов предлагалось использовать штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10548, малодоступный и трудно культивируемый в условиях необходимости поддержания требуемой степени чистоты и жизнеспособности данной микробиологической культуры, нужных для осуществления *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10548 таких специфических свойств, как, в частности, активный синтез фермента люциферазы).

Реализация предлагаемого способа определения бактерицидных свойств веществ осуществляется следующим образом:

Этап 1. В две или несколько стерильных емкостей заливается необходимое количество жидкой питательной среды (ЖПС), представляющей собой водный раствор с pH 6,8-7,4, содержащий 4-6 г/л глюкозы, 16-20 г/л белкового гидролизата и 1,8-2,2 г/л NaCl. Далее, все емкости с ЖПС закрываются и стерилизуются. После чего все емкости со стерильной ЖПС (СЖПС) хранятся в закрытом виде, в отсутствие света при 2-4°C.

Этап 2. Отбирается определенное количество тестируемого объекта (вещества или смеси различных веществ). После чего отобранные пробы доставляются в лабораторию и хранятся там до начала анализа в темном месте, в закрытом виде, при 2-4°C.

Этап 3. Приготавливается ЖПС с тестовыми микроорганизмами (МЖПС). Для чего в одну или несколько емкостей с СЖПС стерильно вносится 1 об. % закваски, содержащей жизнеспособные клетки *Escherichia coli*, суспендированные в ЖПС; после чего все эти емкости закрываются и инкубируются при 36-38°C в течение 12 ч. Далее, в каждой из них нефелометрическим методом измеряется интенсивность упругого светорассеяния (Iod) МЖПС. И по предварительно построенному калибровочному

графику (представляющему собой зависимость Iod МЖПС от концентрации содержащихся в ней клеток E. coli) удостоверяется, что полученное значение Iod соответствует концентрации E. coli в МЖПС от 5×10^5 до 5×10^6 клеток на мл. При этом, если Iod, измеренная в какой-либо из емкостей, соответствует концентрации E. coli в МЖПС меньше 5×10^5 кл/мл, то эта емкость инкубируется при 36-38°C в течение еще 3 ч; после чего для нее проводится повторное определение Iod. А если Iod, измеренная в какой-либо из емкостей, соответствует концентрации E. coli в МЖПС больше 5×10^6 кл/мл, то МЖПС в этой емкости разбавляется необходимым количеством СЖПС.

Этап 4. Если нас интересует концентрационная зависимость про- или антимикробного действия тестируемого объекта, содержащегося в пробах, отобранных на 2-м этапе анализа, либо эти пробы имеют слишком высокую исходную токсичность (так что ожидается, что в неразведенном виде они будут слишком сильно ингибировать развитие тестовых микроорганизмов), то делается необходимое количество разведений исходных проб. После чего каждая проба или каждое ее разведение делится на 3-5 равных частей, каждая из которых помещается в отдельную емкость (например, пробирку), куда также добавляется заданное количество смеси, содержащей СЖПС и МЖПС в соотношении от 9/1 до 3/2 по объему.

Этап 5. Все емкости с тестируемыми объектами, плюс некоторое количество контрольных емкостей, содержащих МЖПС без добавок (а также, в случае необходимости, МЖПС с заданным количеством вещества или смеси веществ, про- или антимикробная активность которых известны заранее) закрываются, перемешиваются и помещаются в термостат, где инкубируются в течение 4-8 часов при температуре 36-38°C. При этом непосредственно перед началом и после окончания инкубации регистрируются значения таких параметров МЖПС (изменяющихся вследствие роста и размножения тестовых микроорганизмов, а также преобразования ими в ходе метаболической активности одних веществ, входящих в состав МЖПС, в другие) как интенсивность упругого светорассеяния в видимой или ближней инфракрасной областях спектра (Iod), редокс потенциал (E) и электропроводность (X).

Этап 6. После этого общая степень активирования или ингибирования (+/-) жизнедеятельности тестовых микроорганизмов тестируемыми объектами рассчитывается по формуле

$$\varepsilon_s = (\varepsilon_{\text{Iod}} + 0,5\varepsilon_E + 0,5\varepsilon_X) / 2,$$

где $\varepsilon_Y = 100 \times (\Delta Y_t - \Delta Y_c) / \Delta Y_c$ - частные степени активирования или ингибирования жизнедеятельности тестовых микроорганизмов тестируемыми объектами, рассчитываемые по изменениям Iod, E или X;

а $\Delta Y = Y_e - Y_b$ - разности значений Iod, E или X, регистрируемых в начале (Y_b) и в конце (Y_e) инкубации тестовых образцов в присутствии тестируемых объектов (ΔY_t) и в их отсутствие (ΔY_c).

Заявляемый способ может быть реализован с применением таких основных измерительных приборов, как нефелометр («WGZ-2» или иной, позволяющий с достаточной степенью чувствительности измерять для жидких, водных образцов интенсивность упруго рассеиваемого света в видимой области спектра), иономер («Эксперт-001» или иной, позволяющий с достаточной степенью чувствительности измерять редокс потенциал жидких, водных образцов) и кондуктометр («Эксперт-002» или иной, позволяющий с достаточной степенью чувствительности измерять изменение электропроводности жидких, водных образцов).

Более детально настоящее изобретение описывается следующим конкретным

примером.

Для анализа было взято три образца, содержащих х.ч. н-гексан, толуол и уайт-спирит (представляющий собой смесь различных жидких алифатических и ароматических углеводов). Каждый из этих образцов помещался в 6 пробирок (в 3-й в концентрации

2×10^{-3} об. %, плюс в 3-й в концентрации 2×10^{-5} об.%), в которые затем дополнительно было налито по 7 мл СЖПС (в качестве которой использовался стерилизуемый автоклавированием в течение 20 мин при 121°C водный раствор с $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$, содержащий 5 г/л глюкозы, 18 г/л панкреатического гидролизата рыбной муки и 2 г/л NaCl) и 3 мл МЖПС (той же СЖПС, но содержащей дополнительно в 1 мл около 10 жизнеспособных клеток *Escherichia coli* ATCC 25922, что удостоверялось по бактериальному стандарту мутности).

Затем все эти пробирки (включая 3-й контрольные, также содержавшие смесь СЖПС и МЖПС в соотношении 7 к 3, но без добавления какого-либо из анализируемых образцов) закрывались пробками, перемешивались, помещались в жидкостной термостат «LOIP LT-117b» и инкубировались в нем при температуре $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (оптимальной для роста и развития тестовых микроорганизмов) в течение 5-и часов. При этом через 10 минут после начала инкубации и за 10 минут до ее окончания последовательно в каждой из пробирок регистрировались интенсивность упругого светорассеяния (Iod), редокс потенциал (E, мВ) и удельная, линейная, низкочастотная электропроводность (X, мкСм/см). Причем значения Iod регистрировались с помощью нефелометра «WGZ-2». Значения E регистрировались с помощью иономера «Эксперт-001» с комбинированным электродом «ЭРП-105». А значения X регистрировались с помощью кондуктометра «Эксперт-002», работающего на частоте 1,6 кГц, с погружным датчиком «УЭП-П-С».

Далее, изменения каждого из измеренных параметров инкубируемой среды рассчитывались по формуле: $\Delta Y = Y_e - Y_b$ (где Y_b и Y_e - значения Iod, E или X, зарегистрированные в каждой из контрольных и тестовых пробирок в начале и в конце их инкубирования). Затем все полученные значения ΔY / усреднялись (по пробиркам, содержащим одни и те же концентрации одних и тех же образцов), и для каждого из усредненных значений рассчитывался 95% доверительный интервал. После чего общая степень активирования или ингибирования (+/-) жизнедеятельности тестовых микроорганизмов тестируемыми образцами рассчитывалась по формуле

$$\varepsilon_s = (\varepsilon_{\text{Iod}} + 0,5\varepsilon_E + 0,5\varepsilon_X) / 2,$$

где $\varepsilon_Y = 100 \times (\Delta Y_t - \Delta Y_c) / \Delta Y_c$ - частные степени активирования или ингибирования

жизнедеятельности тестовых микроорганизмов тестируемыми объектами, рассчитываемые по изменениям Iod, E или X;

а ΔY_t и ΔY_c - разности значений Iod, E или X, регистрируемых в начале (Y_b) и в конце (Y_e) инкубации тестовых образцов в присутствии тестируемых объектов (ΔY_t) и в их отсутствие (ΔY_c).

Результаты этих расчетов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Степень активирования или ингибирования (+/-) жизнедеятельности *E.coli* в присутствии тестируемых объектов.

	УС _{р3}	Тл _{р3}	нГ _{р3}	УС _{р5}	Тл _{р5}	нГ _{р5}
$\varepsilon_{\text{Iod}}, \%$	-4,1±0,1	-21±0,6	+6,2±0,2	+17±0,5	+30±1	+39±1
$\varepsilon_E, \%$	-17±0,4	-29±0,7	+7,4±0,3	+15±0,4	+32±1	+43±1
$\varepsilon_X, \%$	-18±0,4	-33±0,8	+6,9±0,2	+17±0,5	+33±1	+45±1
$\varepsilon_S, \%$	-11±8	-26±6	+6,7±1	+17±2	+31±2	+41±3

Примечания. Здесь индексами «р3» и «р5» обозначены концентрации тестируемых объектов, равные 2×10^{-3} и 2×10^{-5} об.% соответственно. УС - уайт-спирит, Тл - толуол, нГ - н-гексан.

Из представленных данных можно сделать следующие выводы. В присутствии любого из тестируемых объектов в концентрации 2×10^{-5} об.% наблюдалась активация жизнедеятельности тестовых микроорганизмов - наибольшая для гексана, в меньшей степени для толуола и в еще меньшей степени для уайт-спирита. В то же время, в концентрации 2×10^{-3} об.% толуол и уайт-спирит ингибировали жизнедеятельность *E.coli*. Причем толуол осуществлял такое ингибирование в существенно большей степени, чем уайт-спирит. А в присутствии последнего в гораздо большей степени происходило ингибирование активности метаболизма *E.coli* (выражаемой значениями Е и Х) нежели интенсивности роста и размножения таковых микроорганизмов (выражаемой значениями Iod).

Таким образом, заявляемый способ может обеспечить расширение области применения определения бактерицидных свойств веществ, а также повышение объективности такого определения и доступности его для использования более широким кругом пользователей.

(57) Формула изобретения

Способ определения бактерицидных свойств веществ, включающий подготовку тестовых образцов, содержащих достаточное количество жизнедеятельных тестовых микроорганизмов, суспендированных в изначально стерильной жидкой питательной среде, инкубирование этих образцов при температуре 36-38°C как в присутствии тестируемых веществ, так и в их отсутствие, сопровождающееся измерением свойств тестовых образцов в начале и в конце их инкубирования, и последующее определение бактерицидных свойств тестируемых веществ, отличающийся тем, что тестовые микроорганизмы представляют собой *Escherichia coli*, количество которой в тестовых образцах перед началом инкубации последних должно составлять от 5×10^5 до 5×10^6 жизнеспособных клеток на мл, жидкая питательная среда, используемая для приготовления тестовых образцов, представляет собой стерильный водный раствор с рН 6,8-7,4, содержащий 4-6 г/л глюкозы, 16-20 г/л белкового гидролизата и 1,8-2,2 г/л NaCl, инкубирование тестовых образцов проводят в течение 4-8 часов, свойства образцов определяют путем измерения интенсивности упругого светорассеяния (Iod), редокс потенциала (Е) и электропроводности (Х), после чего общую степень активирования или ингибирования (+/-) жизнедеятельности тестовых микроорганизмов тестируемыми веществами определяют по формуле:

$$\varepsilon_S = (\varepsilon_{Iod} + 0,5\varepsilon_E + 0,5\varepsilon_X) / 2,$$

где ε_{Iod} , ε_E и ε_X определяют по формулам:

$$\varepsilon_Y = 100 \times (\Delta Y_t - \Delta Y_c) / \Delta Y_c,$$

5 где $\Delta Y = Y_e - Y_b$ - разности значений Iod, E или X, регистрируемых в начале (Y_b) и в конце (Y_e) инкубации тестовых образцов в присутствии тестируемых веществ (ΔY_t) и в их отсутствие (ΔY_c).

10

15

20

25

30

35

40

45