

УДК 57:536.62.088.6

НОВОЕ В РЕГИСТРАЦИИ ОНЛАЙН АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Козеев Е.В.

*ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий
Российской академии наук, Новосибирск;
ООО Научно-производственная фирма «ЭЛАНТА», Краснообск,
e-mail: lanta41@mail.ru*

С использованием специально разработанных сенсорных преобразователей высокого разрешения с чувствительностью более 50 мВ/градус изготовлены для измерения слабых тепловыделений с исследуемых биообъектов измерительные ячейки и аппаратура, способные регистрировать малые приращения температуры – менее 0,001 °С. Разработан алгоритм и новая методика оценки силы взаимодействия биообъектов в процессе их развития с выявлением угнетающего или стимулирующего влияния одного биообъекта на другой. Представлены результаты экспериментальных исследований по выявлению взаимовлияния биообъектов в процессе развития на примере семян пшеницы с плесневым грибом типа *Mucor*. Получено математическое выражение для анализа экспериментальных результатов для оценки силы взаимодействия биообъектов, включая микробно-растительное взаимодействие. Показана принципиальная возможность отслеживать в режиме онлайн влияние плесневого гриба типа *Mucor* на развитие (прорастание) зерновок пшеницы при переходе его из пассивной лаг-фазы в активную лог-фазу. Регистрация тепловыделения с биообъектов в режиме онлайн позволяет определять жизнеспособность семян овощных культур в течение 6–8 ч, зерновых культур за 10–12 ч. Возможность изучения влияния различных факторов и препаратов на процесс прорастания тестового образца позволит более углубленно и на качественно новом уровне изучать особенности микробно-растительного взаимодействия и выявлять эффективные факторы воздействия на вредоносные микроорганизмы.

Ключевые слова: тепловыделение, биообъекты, плесневый гриб, активное состояние, микробно-растительное взаимодействие, мониторинг в режиме онлайн

NEW IN REGISTRATION ONLINE OF BIO-OBJECTS ACTIVITY AND THEIR MUTUAL INTERACTION IN THE DEVELOPMENT PROCESS

Kozeev E.V.

*Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;
Research and Production Company ELANTA, Krasnoobsk, e-mail: lanta41@mail.ru*

With the use of specially designed high-resolution sensor transducers with a sensitivity of more than 50 mV/degree, measuring cells and equipment capable of registering small temperature increments - less than 0.001°C were made to measure weak heat release from the studied biological objects. An algorithm and a new method for assessing the strength of the interaction of biological objects in the process of their development with the identification of an inhibitory or stimulating effect of one biological object on another has been developed. The results of experimental studies on the identification of the mutual influence of biological objects in the process of development are presented on the example of wheat seeds with a mold fungus of the *Mucor* type. A mathematical expression has been obtained for the analysis of experimental results to assess the strength of the interaction of biological objects, including microbial-plant interaction. It is shown that it is possible in principle to monitor the influence of a mold fungus of the *Mucor* type on the development (germination) of wheat grains in the online mode during its transition from the passive lag phase to the active log phase. Registration of heat release from bioobjects online allows you to determine the viability of vegetable seeds for 6–8 hours, grain crops for 10–12 hours. The possibility of studying the influence of various factors and preparations on the process of germination of a test sample will make it possible to study the features of microbial-plant interaction in more depth and at a qualitatively new level and to identify effective factors influencing harmful microorganisms.

Keywords: heat release, biological objects, to monitor the influence, active state, microbial-plant interaction, online monitoring

Для разработки современных средств и методов лечения и профилактики болезней животных и человека большое значение приобретают исследования активности микроорганизмов, в частности микроскопических плесневых грибов [1]. Споры проникают в организм человека или животного через вдыхаемый воздух, поверхность кожи или проглатываются вместе с пищей и в условиях иммунодефицита могут проявлять агрессивные свойства. Многие виды грибов

выделяют токсичные вещества, способные нанести вред здоровью людей и животных. Споры и фрагменты грибов, встречающиеся повсеместно, могут вызывать круглогодичные аллергические заболевания у человека и животных.

Из множества представителей грибов углубленных исследований заслуживает плесневый гриб типа *Mucor*, вызывающий мукормикозы у животных и человека [2, 3]. Он широко распространен в верхнем слое

почвы, развивается на продуктах питания и органических остатках. В связи с широкой сферой использования его выращивают в лабораториях. Из него делают множество антибиотиков, получают закваску для продуктов брожения соевого сыра, картофельного спирта. Плесневые грибы, являясь членами определенных сообществ, могут вести как мутуалистическое партнерство, так и биотические взаимодействия не только с другими микроорганизмами за нишу обитания, но и со своими «сородичами». Все это направлено у плесневых грибов, как и у других организмов, в первую очередь на сохранение популяции в данном местообитании и в конкретный период времени [4].

Микробно-растительное взаимодействие играет важную роль в предотвращении экологических рисков, все чаще используется в научных исследованиях, направленных на выведение новых сортов растений с рекордными характеристиками, а также в агротехнологиях при производстве зерновых и овощных культур.

Появляются работы, направленные на разработку новых инструментальных методов для оценки функционального состояния микроорганизмов [5]. Нам неизвестны, однако, такие методы для выявления микробно-растительного взаимодействия и для мониторинга активности микроорганизмов типа плесневых грибов *Mucor* в процессе их развития.

Цель настоящего исследования – разработка нового инструментального метода и оборудования для оценки активности биологических объектов и их взаимодействия в процессе развития на основе дифференциального термического анализа (ДТА) путем мониторинга функционального состояния биообъектов на ПК в режиме онлайн на примере плесневого гриба типа *Mucor* и тестового образца в виде семян (зерновок) пшеницы. В задачи работы входило создание оборудования, проведение теоретических и экспериментальных исследований по выбору взаимодействующих биообъектов, разработка алгоритма для выявления микробно-растительного взаимодействия в процессе развития и оценка активности плесневого гриба типа *Mucor*.

Материалы и методы исследования

Рабочие характеристики установки для изучения слабых тепловыделений с биообъектов во многом определяются микрокалориметрической камерой, которая для обеспечения прецизионных измерений должна хорошо защищать исследуемые образцы от влияния внешних тепловых воздействий.

На рис. 1 показана разработанная нами микрокалориметрическая камера с измерительной и сравнительной ячейками (позиция 1). Исследуемые образцы размещаются в измерительной ячейке диаметром 25 мм, высотой 40 мм. На дне измерительной и сравнительной ячеек на нижней стороне сапфировой подложки размером 10*10*0,2 мм закреплены термочувствительные элементы (позиция 1).

Измерительная и сравнительная ячейки размещаются в тщательно теплоизолированном блоке, включающем несколько цилиндрических каркасов, внешних алюминиевых и внутренних медных. Каркасные блоки размещаются в термостате, обеспечивающем поддержание температуры с точностью 0,1 °С. Между алюминиевыми и медными цилиндрами расположена термостатирующая оболочка с нагревателем (позиция 3) и электронным блоком для устойчивого поддержания заданной температуры. Для увлажнения и введения растворов в измерительную ячейку в процессе измерения выведена тонкостенная трубка (позиция 5).

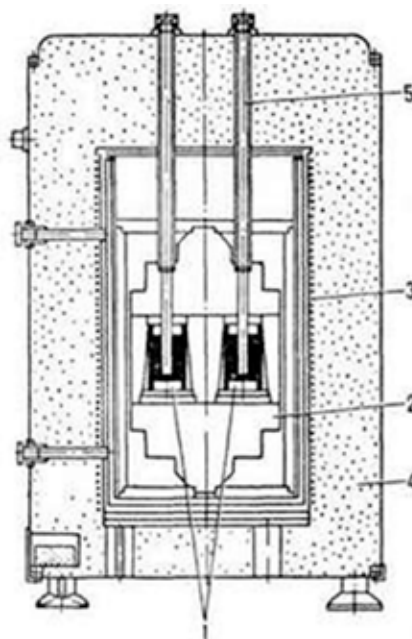


Рис. 1. Микрокалориметрическая камера с измерительной и сравнительной ячейками

Измерительная и сравнительная ячейки идентичны, защищены от внешних влияний теплоизолирующими блоками (позиция 2), активной тепловой изоляцией (позиция 3) и термостатирующими оболочками (позиция 4). Термочувствительные элементы в измерительной и сравнительной ячейках также идентичны и включены в мо-

стовую схему. Входные каскады электронных блоков позволяют измерять сигналы от 1 микровольта с регистрацией их на ПК со значительным превышением полезного сигнала относительно шумов.

Результаты исследования и их обсуждение

В качестве объектов исследования использовали семена амаранта, овощных и зерновых культур. Определялась интенсивность прорастания в различных условиях при различных внешних воздействиях. На рис. 2 представлена термограмма семян пшеницы на начальном этапе прорастания при выходе из состояния покоя. Графики представлены без дополнительной обработки в виде, в котором они зарегистрированы на ПК.

Исследовались образцы семян пшеницы с навеской 1 г, увлажненные одним миллилитром дистиллированной воды при температуре 22 °С. Одно деление по оси X составляет 1000 с, одно деление по оси Y – 100 мкВ или для данного режима – 0,002 °С.

На левом участке термограммы по оси X (около 3 500 с от начала) отображен про-

цесс выравнивания температуры образца с температурой увлажняющего раствора (здесь – дистиллированной воды), а также с изменением температуры в результате впитывания влаги испытуемым образцом. На этом этапе еще не регистрируется тепловыделение, вызванное прорастанием тестового образца.

Тепловыделение с исследуемого образца наблюдается на последующем периоде до 9 000 с, что соответствует активизации процесса прорастания и позволяет сделать положительное заключение о жизнеспособности испытуемых зерен пшеницы уже за несколько часов.

На рис. 3 представлена термограмма с более протяженным временным интервалом прорастания зерновок пшеницы, составляющем более 27 ч (одна клетка на оси X – 5,55 ч).

Представленные экспериментальные результаты на рис. 2 и 3 показывают, что анализ получаемых нами термограмм достаточно прост и не требует специальной математической обработки для выделения полезного сигнала среди шумов и помех, как это вынуждены делать, например, авторы работы [5].

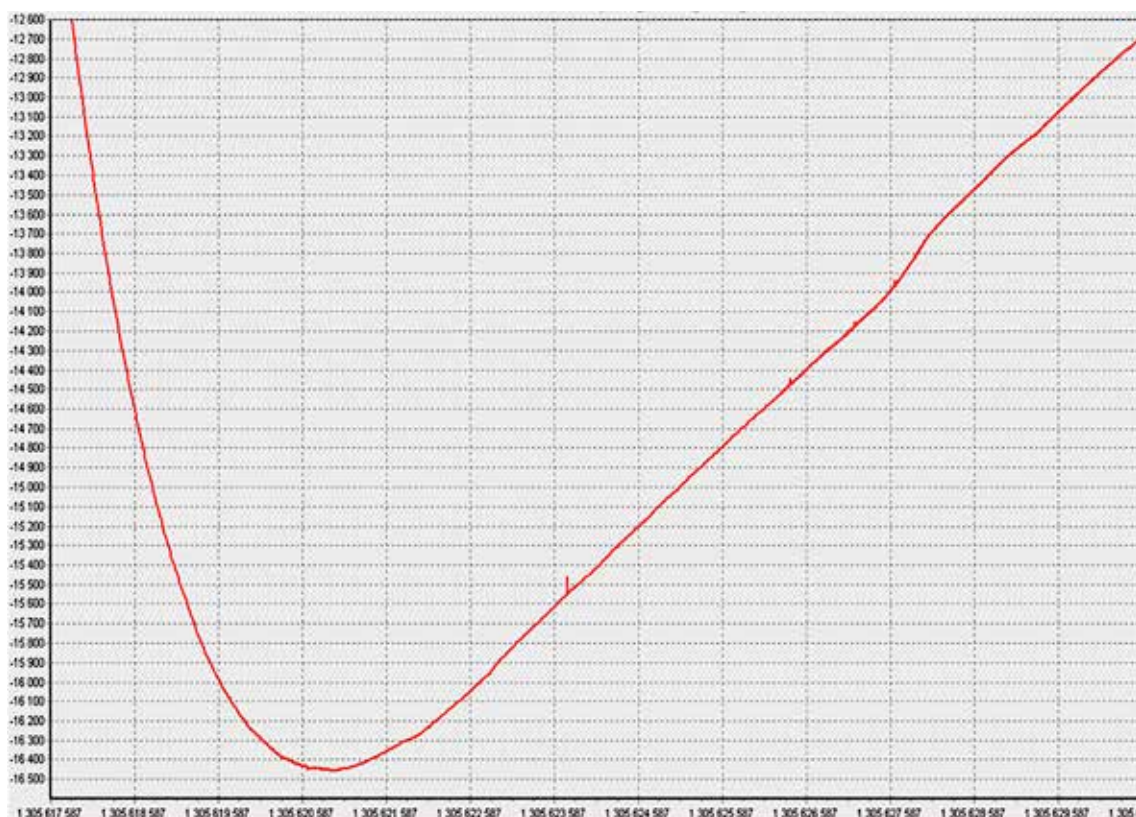


Рис. 2. Термограмма семян пшеницы на этапе выхода из состояния покоя



Рис. 3. Термограмма семян пшеницы в процессе прорастания

Значительного превышения полезного сигнала над шумами мы добивались путем использования термочувствительных элементов высокого разрешения с коэффициентом преобразования 50 мВ/градус, изготовленных из монокристаллических полупроводниковых материалов, а при изготовлении сенсорные преобразователи проходили специальную технологическую обработку. Кроме того, входные каскады электронных блоков согласовывались с чувствительными элементами для обеспечения кратного превышения полезного сигнала над шумами.

Алгоритм определения активности микроорганизмов на основе микробно-растительного взаимодействия

В качестве параметра характеризующего физиологическое состояние исследуемого биообъекта в процессе его развития нами выбрана активность, определяемая из анализа термограмм. Активность биообъекта при создании условий для развития фактически характеризует его жизнеспособность. Определение активности плесневого гриба в процессе его развития основано на мониторинге интенсивности прорастания тестового образца при взаимодействии его с исследуемым образцом. Этот прием оказался

особенно эффективным при изучении активности плесневых грибов по тепловыделению, поскольку очень рыхлая структура и низкая плотность не позволяют в достаточной мере воспринимать генерируемое тепло от исследуемых плесневых грибов термочувствительными элементами.

Предложенный нами алгоритм определения активности микроорганизмов в процессе их развития и взаимодействия с тестовым образцом включает следующие операции:

1. Тестовый образец, например зерна пшеницы, размещают в измерительной ячейке вблизи с термочувствительными элементами.

2. Исследуемый биообъект, например плесневый гриб типа *Mucor*, размещают в измерительной ячейке на тестовом образце или рядом на расстоянии, на котором он может оказывать свое влияние на тестовый образец.

3. Создают условия для развития (роста) как для тестового, так и для исследуемого образца.

4. Проводят мониторинг тепловыделения с тестового образца на различных этапах, начиная с первого, на котором тестовый образец находится в активном состоянии, а исследуемый биообъект на этом этапе не оказывает еще влияния на тестовый образец, находясь в пассивном состоянии.

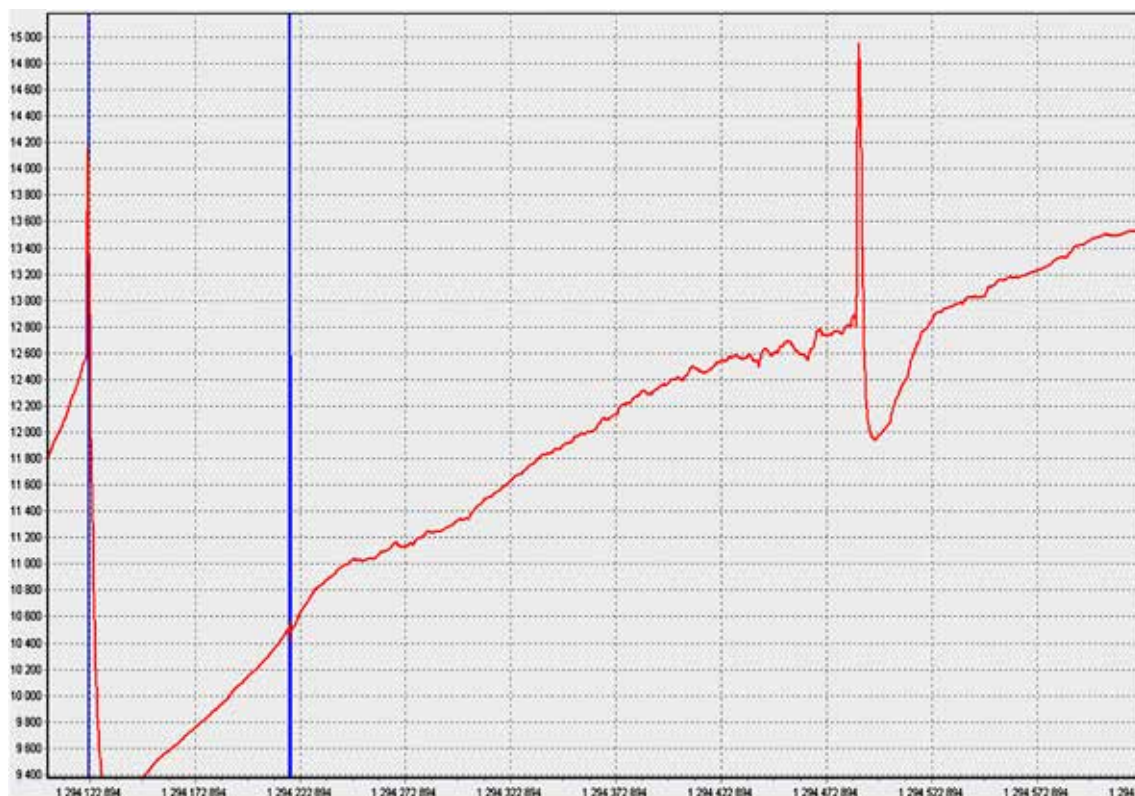


Рис. 4. Термограмма тестового образца с грибом *Mucor*

5. Определяют интенсивность роста тестового образца

$$I_i = \left(\frac{dQ}{dt} \right)_i \text{ (мК/час)}$$

и коэффициент активности для исследуемого образца на выбранных временных интервалах i по формуле

$$G_i = \frac{\left(\frac{dQ}{dt} \right)_i}{\left(\frac{dQ}{dt} \right)_1} - 1$$

и судят о динамике физиологического состояния исследуемого образца.

6. Результаты исследований сводят в таблицу.

На рис. 4 представлена термограмма тестового образца с грибом типа *Mucor*.

Одно деление по оси X составляет 13,8 ч, одно деление по оси Y – 200 мкВ (или для выбранного режима 0,004°C). На представленной термограмме наблюдается уменьшение интенсивности тепловыделения с тестового образца, начиная с 19,1 ч, что объясняется активизацией гриба на этом периоде и, соответственно, началом подавляющего влияния прорастающего гриба на прорастание семян пшеницы.

На первом начальном участке протяженностью от начала прорастания до отметки времени 19,1 ч наблюдается практически постоянный наклон, равный 34,7 мК/час (1 мК равен 0,001°C). Значение интенсивности роста тестового образца на начальном участке соответствует прорастанию тестового образца в выбранных условиях при отсутствии влияния исследуемого плесневого гриба, поскольку он находился на этом интервале еще в пассивной лаг-фазе. Это значение соответствует значению, измеренному при отсутствии второго биообъекта.

На последующих участках 2 и 3 (таблица) интенсивность роста тестового образца I_2 уменьшается, поскольку на этом этапе на него плесневый гриб при своем развитии оказывает все большее угнетающее влияние. На втором этапе развития гриба *Mucor* в промежутке от 19,1 до 68,7 ч интенсивность роста тестового образца I_2 принимает значение 22,3 мК/час.

Далее на участке 3 на промежутке от 68,7 до 93,6 ч интенсивность роста I_3 тестового образца снижается до значения 8,7 мК/час (таблица), что объясняется более сильной активизацией роста гриба *Mucor* на этом этапе и, соответственно, более сильным подавляющим влиянием на тестовый образец – на прорастание семян пшеницы.

Показатели активности плесневого гриба *Mucor* в процессе его развития

Показатель	Интенсивность роста тестового образца I , мК/час Активность гриба <i>Mucor</i> G		
	Участок 1 пассивная фаза	Участок 2 переход в активную фазу	Участок 3 активная фаза
Часы	19,1	68,75	93,6
Интенсивность роста тестового образца на участке i $I_i = \left(\frac{dQ}{dt}\right)_i$	34,7 I_1	22,3 I_2	8,7 I_3
Активность гриба на участке i $G_i = \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_i}{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_1} - 1$	0 $G_1 = \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_1}{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_1} - 1 = 0$	-0,36 $G_2 = \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_2}{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_1} - 1$	-0,75 $G_3 = \frac{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_3}{\left(\frac{dQ}{dt}\right)_1} - 1$

Значение активности G_3 исследуемого образца на этом временном участке равно (-) 0,75, что при максимальном значении, равном минус единице, указывает на значительное подавляющее влияние гриба *Mucor* на развитие тестового образца.

В проводимых экспериментах проявление активности микроорганизмов гриба *Mucor* мы выявляли по влиянию исследуемого образца на процесс прорастания тестового образца в результате микробно-растительного взаимодействия, а не по прямому измерению тепловыделения с них, как это делали, например, в работе [5] при изучении однотипных биообъектов – бактериальной популяции *E. Coli*.

На отрезке 112 ч от начала прорастания наблюдается импульс от помехи и небольшое изменение наклона термограммы, что вызвано нарушением теплового баланса в измерительной ячейке, поскольку на этом этапе проводился ее осмотр и фотографирование. Присутствие плесневых грибов на проростках пшеницы на этом этапе подтверждается на рис. 5.

Представленные результаты исследований указывают на принципиальную возможность проводить мониторинг за изменением функционального состояния гриба типа *Mucor* при вступлении его в активную фазу и тем самым определять его присутствие, жизнеспособность и активность в создаваемых условиях.

В таблице приведены результаты исследований активности плесневого гриба *Mucor* в процессе его развития.



Рис. 5. Фотография тестового образца с плесневым грибом на промежуточном этапе прорастания зерновок пшеницы

Мониторинг интенсивности роста микроорганизмов при воздействии на них тем или иным препаратом позволит определять эффективность подавляющего влияния того или иного препарата на изучаемые микроорганизмы и, соответственно, оценивать эффективность этого препарата или иного воздействия на лечение и профилактику той или иной болезни животных путем снижения активности вредоносных микроорганизмов.

Выводы

1. Показана принципиальная возможность оценивать активность плесневого гриба в режиме онлайн по реакции тестового образца в виде зерен пшеницы на основе метода ДТА. Получено математическое выражение для безразмерного коэффициента, характеризующего активность микроорга-

низмов при их взаимодействии с тестовым образцом – семенами пшеницы. Разработан алгоритм и методика оценки активности микроорганизмов в процессе их развития путем регистрации термограмм с тестового образца на ПК в режиме онлайн.

2. Экспрессный метод определения жизнеспособности семян овощных культур за 6–8 ч и зерновых за 10–12 ч будет полезен для оценки качества посевного материала в предпосевной период. Предлагаемый метод и установка позволят значительно ускорить проведение селекционных работ по выведению семян овощных и зерновых культур с заданными характеристиками.

3. Открывается возможность изучения инструментальным методом влияния различных факторов и препаратов на процесс развития микроорганизмов, на более углубленном и на качественно новом уровне исследовать особенности микробно-растительного взаимодействия, выявлять эффективные факторы воздействия на вредоносные микроорганизмы.

Автор выражает глубокую благодарность А.С. Донченко и Н.А. Донченко за интерес к работе и поддержку проводимых исследований, членам Ученого совета ИЭВ-

СиДВ СФНЦА РАН за полезные обсуждения и критические замечания, а также сотрудникам ООО НПФ «ЭЛАНТА» А.Е. Козееву, Я.В. Плотникову, Е.Н. Золотареву за помощь в работе.

Список литературы

1. Варламов Е.Е., Пампура А.Н., Асманов А.И. Значение аллергенов плесневых грибов в развитии аллергических заболеваний полости носа: подходы к диагностике, терапии и профилактике // Педиатрия (прил. к журн. Consilium Medicum). 2018. № 4. С. 67–71.
2. Самсонова М.В., Черняев А.Л., Лебедин Ю.С., Михайличенко К.Ю., Поливанова А.Э. Мукоормикоз легких // Пульмонология. 2018. № 28 (2). С. 243–247. DOI: 10.18093/0869-0189, 2018-28-2-243-247.
3. Шейх Ж.В., Тюрин И.Е., Синопальников А.И., Араблинский А.В., Сафонова Т.Д., Федяева Э.В., Муравьев О.Б., Швайко С.Н. Инвазивный мукоормикоз с поражением легких у больной с апластической анемией // Вестник рентгенологии и радиологии. 2019. Т. 100. № 4. С. 215–221. DOI: 10.20862/0042-4676-2019-100-4-215-221.
4. Ткаченко Т.Е. Экологические и физиологические аспекты плесневых грибов // Современные проблемы науки и образования. 2009. № 1. URL: <https://science-education.ru/article/view?id=827> (дата обращения: 30.01.2023).
5. Драпеза А.И., Плешко Н.В., Лобан В.А., Скороход Г.А., Гудкова Е.И. Метод дифференциальных термограмм на основе микротерморезисторов для ускоренной оценки жизнеспособности бактериальной популяции *E. Coli* // Вестник БГУ. Сер. 1. Физика. 2015. № 1. С. 31–36.