

УДК 612.014.3

ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ УСТРОЙСТВА И МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ IN VITRO В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

© 2020 П.В. Ильясов¹, Д.Ф. Гайсина², П.Н. Золотарев³, А.С. Сустретов¹

¹Институт экспериментальной медицины и биотехнологий,
Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

²Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева,
Самара, Россия

³Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

Статья поступила в редакцию 03.12.2020

Разработан метод оценки физиолого-биохимических характеристик интактных клеток *in vitro* в режиме реального времени, использованный для экспресс-определения таксономической принадлежности клеток микроорганизмов. Метод обеспечивает различение аэробных бактерий на уровне близкородственных таксонов и обладает значительным потенциалом в области клеточной биологии. Предложена концепция многоканального датчика, который позволит существенно ускорить исследование свойств клеток.

Ключевые слова: физиология и биохимия клеток, метаболические профили, респираторная активность, определение таксономической принадлежности бактерий.

DOI: 10.37313/1990-5378-2020-22-6-64-71

Работа выполнена в рамках проекта на выполнение научных исследований и технических разработок и иных работ (оказание услуг), направленных на развитие научно-технического потенциала Самарской области «Разработка метода оценки физиолого-биохимических характеристик клеток in vitro в режиме реального времени».

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее перспективных направлений развития биохимии и клеточной биологии является метаболомика, подразумевающая исследования всей совокупности метаболитов и биохимических путей, присутствующих в клетке. В чистом виде метаболомические исследования сводятся к высвобождению клеточного содержимого, хроматографическому разделению компонентов и их идентификации посредством масс-спектрометрии, ИК-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В различных модификациях хроматографическое разделение может заменяться капиллярным электрофорезом, экстракцией интересующих исследователя компонентов, или простым центрифугировани-

ем с дальнейшей обработкой супернатанта. Хотя этот подход является трудоемким и дорогостоящим, он позволяет получить исчерпывающую информацию о биохимических особенностях исследуемых клеток.

В области микробиологии методы и приемы метаболомики успешно используются, в числе прочего, для анализа метаболизма конкретных соединений, поиска новых и уточнения существующих метаболических путей, анализа изменений биохимии и физиологии клеток в ответ на воздействие различных факторов, изучения механизмов, вовлеченных в различные аспекты жизнедеятельности клеток, исследования микробиологических сообществ, разработке новых лекарственных препаратов [1; 2] и пробиотиков [3], а также диагностике инфекционных заболеваний, в ряде случаев дополняя и заменяя традиционные и молекулярно-генетические методы [4; 5; 6; 7].

Несмотря на то, что определение метаболомики в классическом виде предусматривает использование масс-спектрометрии, ЯМР и других аналогичных методов, несложно заметить, что ряд подходов в классической клеточной биологии также использует методологию, по сути относящиеся к метаболомическому профилированию, методу метаболомических «отпечатков

Ильясов Павел Владимирович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник.

E-mail p.v.ilyasov@samsmu.ru

Гайсина Дарья Фуатовна, учебный мастер кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии.

E-mail gdf1995@mail.ru

Золотарев Павел Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент, проректор по лечебной работе.

E-mail zolotareff@list.ru

Сустретов Алексей Сергеевич, младший научный сотрудник. E-mail a.s.sustretov@samsmu.ru

пальцев» или исследованию метаболических мишеней.

Одной из ключевых особенностей аэробного метаболизма клеток является то, что практически любой катаболический процесс, связанный с получением энергии из химических соединений, в конечном итоге замыкается на компонентах электрон-транспортной дыхательной цепи (ЭТЦ), что приводит к поглощению кислорода клетками из окружающей среды. При интенсивных метаболических процессах это поглощение может приводить к существенному снижению концентрации кислорода в среде, которое может влиять на рост клеток. При этом уровень поглощения кислорода пропорционален метаболической активности клеток и зависит, с одной стороны, от природы субстрата, а с другой стороны - от ферментативного аппарата клетки и его состояния. Следовательно, поглощение кислорода при разложении и трансформации субстратов также можно использовать для метаболического профилирования и исследования характеристик клеток. Сходный подход используется при конструировании так называемых клеточных биосенсоров — датчиков, включающих электрохимический или электронно-оптический детектор и живые клетки микроорганизмов или тканевых культур и используемых для оценки содержания специфического субстрата в анализируемой среде. Подходы, используемые при конструировании и эксплуатации этих приборов, могут обеспечить эффективное, быстрое и дешевое определение интегральных физиолого-биохимических характеристик клеток *in vitro* в реальном времени на основе их респираторной активности.

Целью данной работы являлась разработка и применение метода оценки характеристик клеток, основанного на регистрации респираторной активности микроорганизмов, отражающей интегральную активность их ферментных систем в различных условиях. Такой подход, комбинирующий исследование респираторной активности клеток и применение электрохимических преобразователей, практически не описан в литературе, существует лишь небольшое количество статей, посвященных его дальним аналогам [8; 9; 10; 11]. В данной работе продемонстрирована возможность использования разработанного подхода для экспресс-оценки видовой принадлежности микроорганизмов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве модельных микроорганизмов использовали культуры ряда микроорганизмов, полученные из рабочей коллекции культур микроорганизмов кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России), поддерживаемые на скошенном ГРМ-агаре (гидролизат рыбной муки), а также культуры из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФИЦВиМ, г. Покров, Россия). Поскольку используемые штаммы, за исключением *E. coli* и культур из Государственной коллекции микроорганизмов, не являются типовыми, в ходе работы выполняли тщательное исследование с целью их однозначной идентификации до вида. Видовую принадлежность используемых культур определяли путем оценки в течение 24 ч с использованием пестрого ряда, включавшего селективные среды Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом и мальтозой, цитратный агар Симмонса, среду Олькеницкого (железо-глюкозо-лактозный двуслойный агар), фенилаланин-агар, среду Хоттингера (культуральные среды производства ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, РФ). Для оценки способности *Staphylococcus* spp вызывать гемолиз и плазмокоагуляцию использовали посев на кровяной агар и цитратную кроличью плазму, соответственно. Кроме того, для подтверждения видовой принадлежности микроорганизмов также использовали тест-систему идентификации энтеробактерий API 10S (bioMérieux, Франция) или тест-систему идентификации стафилококков STAPHYTest 24 (Erba Lachema, Чехия).

Для получения биомассы для экспериментов клетки выращивали на ГРМ-агаре в течение 12-26 ч при 37 °С. Биомассу собирали петлей в стерильный физиологический раствор с образованием суспензии. Собранные клетки центрифугировали при 6000 g, удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в физиологическом растворе (0,9% NaCl). Эту процедуру повторяли дважды с целью промывки клеток от компонентов среды.

После вышеописанной двукратной промывки осажденные клетки взвешивали и разбавляли физиологическим раствором в заданном массовом соотношении (в большинстве экспериментов составлявшем 1:20). После этого клетки иммобилизовали путем адсорбции на хроматографических фильтрах из прессованного стекловолокна Whatman™ GF/A (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания). Для этого 10 мкл суспензии интактных клеток наносили на фрагмент носителя размером 3×3 мм и высушивали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Иммобилизованные клетки использовали в экспериментах по определению активности при различных условиях и оценке метаболических профилей. В качестве преобразователя исполь-

зовали анализатор жидкости «Эксперт-001» в комплекте с амперометрическим датчиком растворенного кислорода ДКТП-02 (Эконикс-Эксперт, РФ), работающий в режиме термооксиметра. Фрагмент носителя с иммобилизованными клетками (по аналогии с устройством микробных биосенсоров называемый в данной работе рецептором) помещали на рабочую поверхность датчика кислорода и фиксировали с помощью капроновой сетки и прижимного кольца. Регистрацию сигналов осуществляли на ПК, подключенном к анализатору через интерфейс RS-232, с использованием программного обеспечения Exр2рг, доступного для скачивания на сайте научно-производственной фирмы «Эконикс-Эксперт» (<http://ionomer.ru>). В качестве модельных субстратов использовали 1 М растворы глюкозы, маннита, арабинозы, рамнозы, мочевины, цитрата и тиосульфата натрия и 0,25 М растворы лактозы, сахарозы и раффинозы, в качестве рабочего раствора - физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), содержащий 8 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,48 г/л NaH_2PO_4 и 0,20 г/л KH_2PO_4 (pH 7,1). Все используемые в экспериментах реактивы были производства РФ и характеризовались степенью чистоты не ниже «ч.д.а».

Датчик кислорода с закрепленными на нем иммобилизованными клетками помещали в кювету, содержащую 10 мл рабочего раствора и установленную на магнитной мешалке. После установления равновесной концентрации кислорода в кювету вносили раствор субстрата из расчета 10 мМ концентрации субстрата в кювете и регистрировали сигнал датчика. После завершения регистрации сигнала (~5-10 мин)

электрод вместе с клетками промывали путем прокачивания через нее рабочего раствора до восстановления исходного равновесного уровня кислорода в кювете (~5-15 мин). Используемый подход обеспечивал многократное использование иммобилизованных клеток без их замены. В качестве измеряемого параметра сигнала и условного показателя активности биомассы в данной системе использовали максимальную скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата ($\text{mg O}_2/\text{мл/с}$). Все измерения проводили в трех повторностях. Обработку сигналов и математико-статистические расчеты осуществляли с помощью приложения Microsoft Office Excel 2010. Для сравнения полученных профилей респираторной активности с целью определения степени их сходства или различия использовали попарное сравнение сигналов на одинаковые субстраты для разных культур посредством расчета коэффициента корреляции Пирсона и сопутствующего ему уровня значимости p .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования были получены метаболические профили 17 штаммов микроорганизмов. С целью сравнения полученных профилей мы объединили их в сводные графики. Данные графики представлены на рисунках 1 и 2. Для устранения возможных ошибок, связанных с различающимся уровнем сигнала на глюкозу ввиду различного использованного количества клеток, для всех профилей величина сигнала на глюкозу была принята за 100%, а сигнал на

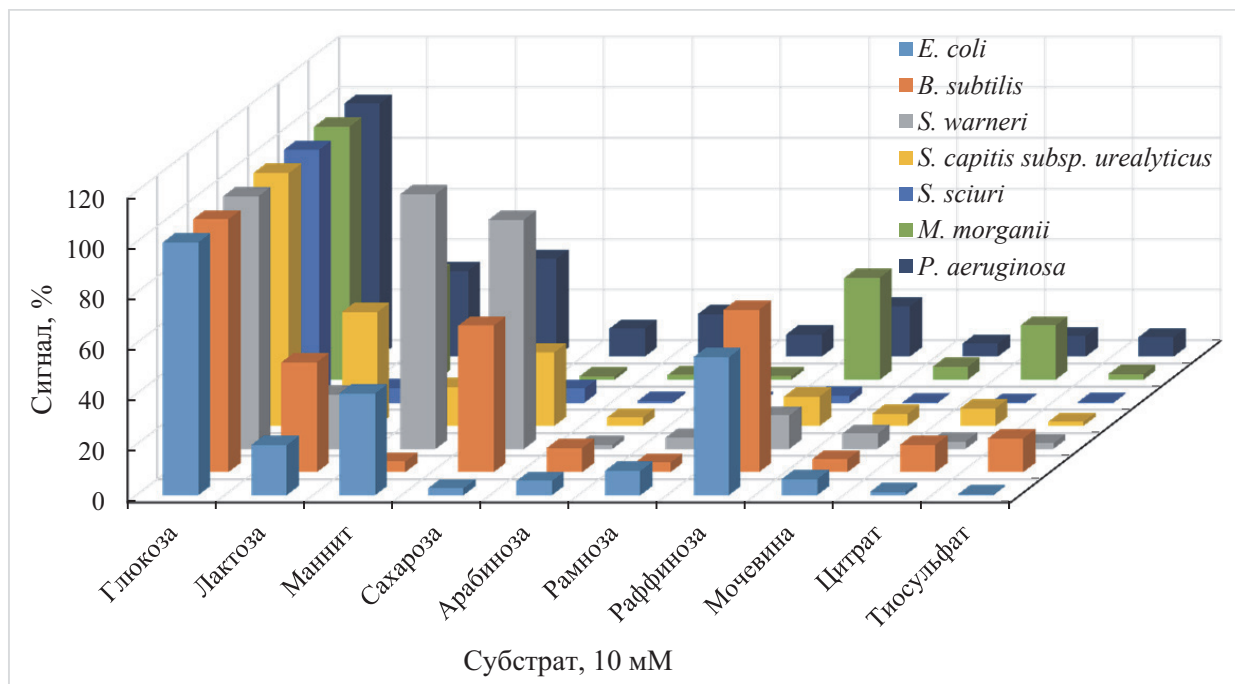


Рис. 1. Сводный график профилей респираторной активности штаммов, выделенных в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

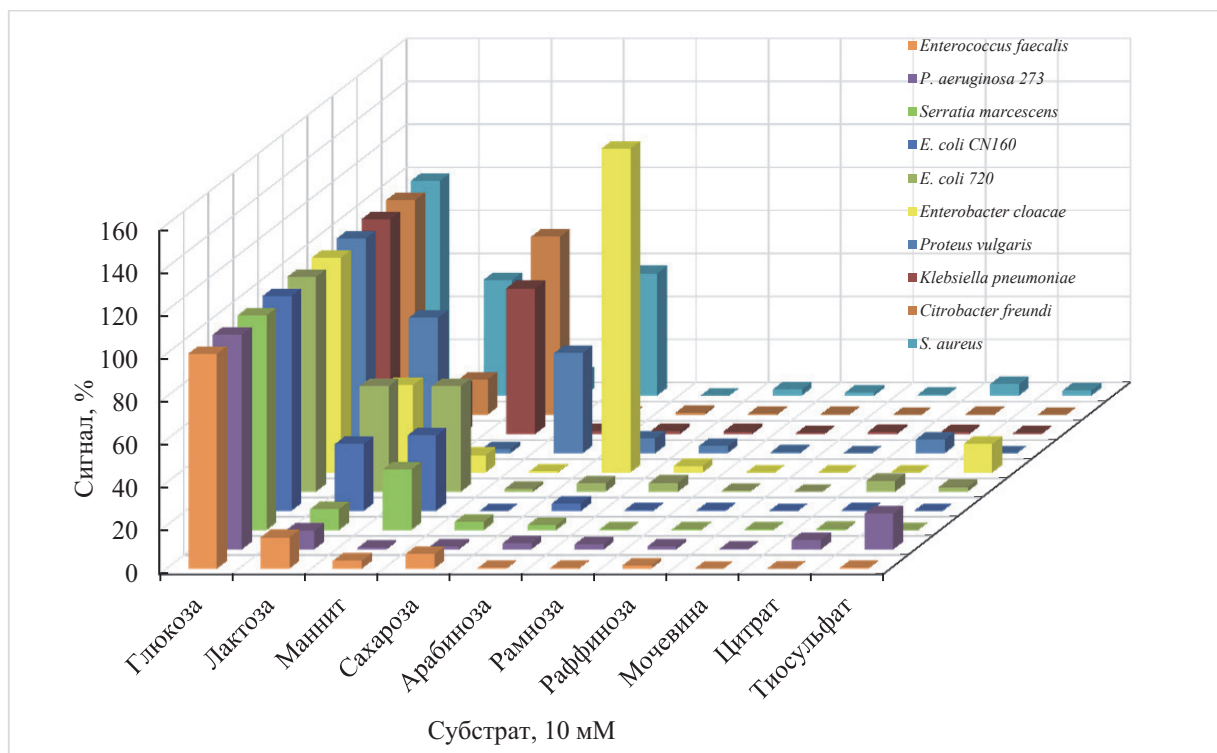


Рис. 2. Сводный график профилей респираторной активности штаммов Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ

остальные субстраты выражены в процентах от сигнала на глюкозу.

Корреляционный анализ полученных профилей позволил разделить все протестированные культуры на 2 группы (условно названные группой №1 и группой №2), внутри которых профили протестированных штаммов характеризовались высокими значениями коэффициентов корреляции при сравнении друг с другом. Поскольку при сравнении профилей использовали величину сигнала на субстраты, нормированную по сигналу на глюкозу, сигнал на глюкозу исключали из сравнения профилей (при данном формате данных он всегда составлял 100% и способствовал бы завышению коэффициентов корреляции).

В первую группу вошли оба штамма *E. coli* из коллекции ФИЦВиМ, *S. marcescens*, *C. freundii* и *K. pneumoniae*, причем коэффициенты корреляции профилей обоих штаммов *E. coli*, а также профилей *K. pneumoniae* - *C. freundii* превышали 0,99, а для *S. marcescens* - *K. pneumoniae* и *S. marcescens* - *C. freundii* - 0,95. Сводный график для этих культур приведен на рисунке 3. Общим для них является наличие выраженных сигналов на глюкозу, лактозу и маннит при незначительной или отсутствующей реакции на остальные субстраты.

Такие высокие коэффициенты корреляции вполне ожидаемы, так как все эти культуры относятся к одному семейству *Enterobacteriaceae* и являются достаточно близкородственными, к тому же в работе использованы штаммы с типо-

выми для этих видов характеристиками. В эту же группу можно включить штамм *P. aeruginosa*, выделенный в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России – коэффициенты корреляции при сравнении его профиля с культурами этой группы находятся в диапазоне от 0,79 до 0,94 при уровне значимости $p < 0.01$. При этом полевой штамм *E. coli*, использованный на первом этапе работ, и культуры *M. morgani* и *E. cloacae*, также относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae*, не входят в данную группу из-за индивидуальных особенностей их профилей.

Вторую группу составили грамположительные кокки - *S. aureus*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. sciuri*, *E. faecalis*. Сводный график приведен на рисунке 4. Как ни странно, кроме кокков, в эту же группу вошел *P. vulgaris*, причем коэффициент корреляции профилей *S. aureus* и *P. vulgaris* составил 0,965 – больше, чем у *S. aureus* с другими представителями рода *Staphylococcus*.

Общей особенностью этих профилей является наличие выраженной реакции на глюкозу, лактозу, сахарозу и слабовыраженной реакции на маннит при незначительных сигналах на остальные субстраты. При этом отличия профиля *P. vulgaris* от других энтеробактерий (слабая реакция на маннит и выраженный сигнал на сахарозу) не позволили включить его в первую группу, описанную в предыдущем абзаце. Такое сходство профиля *P. vulgaris* с профилями грамположительных кокков, видимо, связано с неоптимальностью используемой субстратной

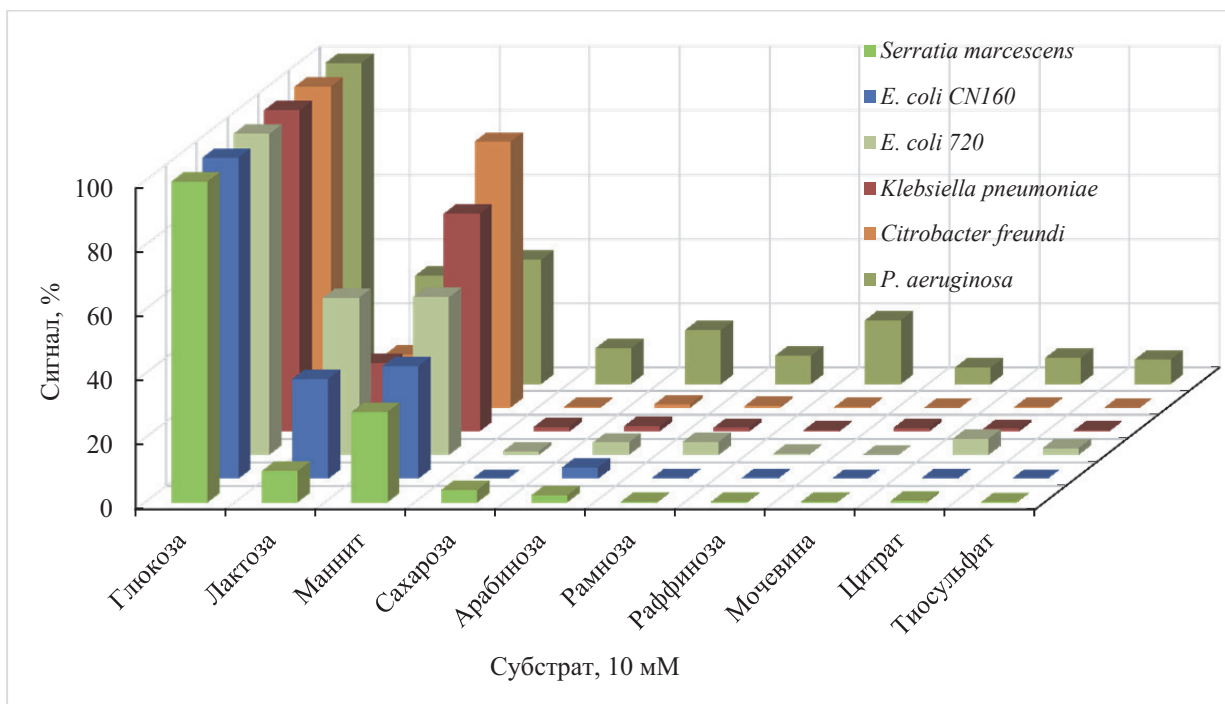


Рис. 3. Сводный график профилей респираторной активности микроорганизмов группы №1

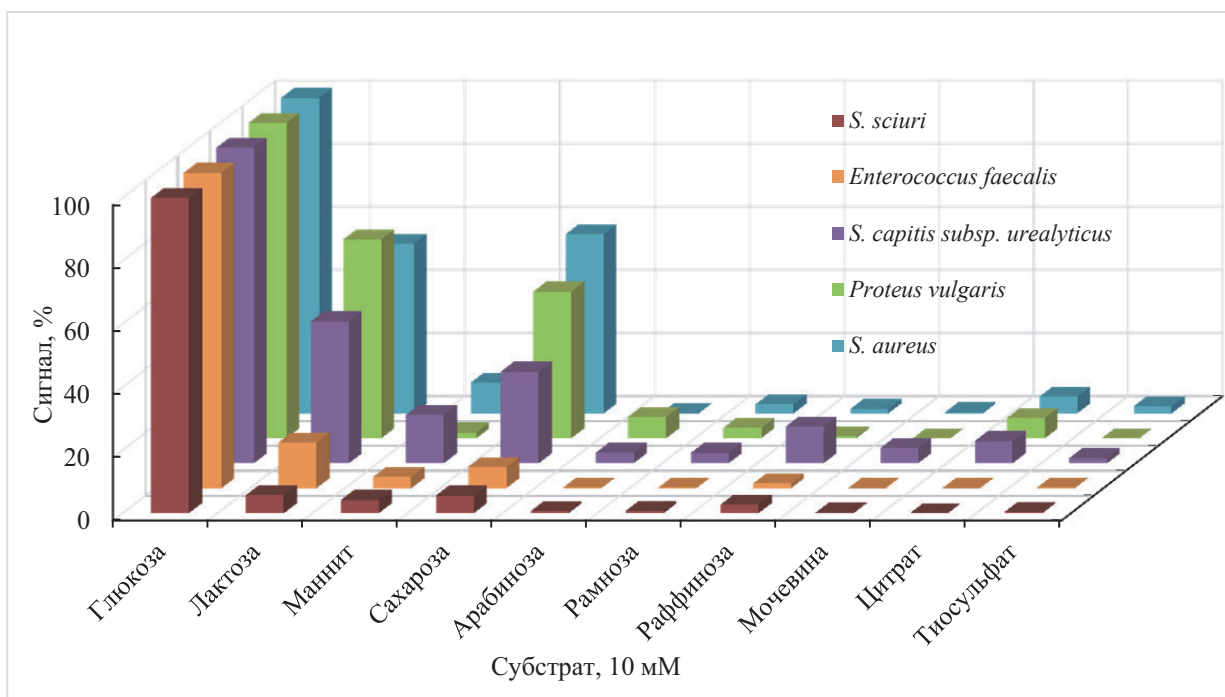


Рис. 4. Сводный график профилей респираторной активности микроорганизмов группы №2

панели, в частности, с тем, что количество субстратов недостаточно для однозначной идентификации. Значения коэффициентов корреляции для всех пар во всех группах являлись статистически значимыми ($p < 0.01$).

E. coli, *B. subtilis*, *M. organii* из рабочей коллекции ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также *E. cloacae* и *P. aeruginosa* 273 из коллекции

ФИЦВиМ не вошли ни в одну из указанных групп из-за индивидуальных особенностей их профилей, в частности, выраженных сигналов на раффинозу у *E. coli*, *B. subtilis* и *M. organii* (а также на цитрат у *B. subtilis* и *M. organii* и тиосульфат у *B. subtilis*), интенсивной реакции на арабинозу у *E. cloacae* и низких ответов на все субстраты, кроме глюкозы, у *P. aeruginosa*. Сводный график

представлен на рисунке 5. Эти особенности легко объяснимы, т.к. *E. coli* и *P. aeruginosa* являются видами с высокой степенью разнородности биохимических характеристик среди различных штаммов, *M. organii* достаточно сильно отличается от других энтеробактерий, а *B. subtilis* принадлежит к совершенно другой группе микроорганизмов по сравнению с остальными протестированными культурами. В то же время, аномальная реакция *E. cloacae* на арабинозу является несколько неожиданной. Данный вид, как и многие другие виды энтеробактерий, содержит оперон *araBAD* и симпортер арабинозы и H^+ *araE*, обеспечивающие катаболизм арабинозы, однако существенных межвидовых различий в активности продуктов этих генов не опубликовано, и прочие энтеробактерии в наших исследованиях характеризовались весьма скромной реакцией на арабинозу. У родственного вида *E. asburiae* известно о существовании глюкозодегидрогеназы с широкой субстратной специфичностью, активной, в том числе, по отношению к арабинозе [12], однако эта глюкозодегидрогеназа индуцируется в отсутствие фосфата, что не соответствует условиям наших экспериментов. Единственным упоминанием о предпочтениях *E. cloacae* по отношению к арабинозе является статья о высокопродуктивном получении мезо-2,3-бутандиола из арабинозы [13], но эта реакция относится к бродильному типу и не должна осуществляться при избытке кислорода. Правдоподобное объяснение может быть связано с возможным наличием у данного штамма плазмиды, несущей гены катаболизма арабинозы, но проверка наличия или отсут-

ствия такой плазмиды в рамках данной работы не выполнялась.

Представляется важным также отметить, что профили культур, полученные при традиционном культивировании на средах, и профили их респираторной активности достаточно резко различаются. Так, обращает на себя внимание несовпадение ожидаемой при культивировании и наблюдаемой при оценке респираторной активности реакций, например, на арабинозу и сахарозу у полевого штамма *E. coli* (при том, что при определении видовой принадлежности данная культура реагировала на сахарозу положительно), и отсутствие ответа на маннит у *B. subtilis* (при положительной реакции на маннит-содержащей среде). Сходные несовпадения есть практически у всех протестированных культур.

По-видимому, гены, вовлеченные в метаболизм соответствующих соединений, являются индуцибельными и не экспрессируются в отсутствие субстрата, а незначительное время анализа респираторной активности (5-10 мин) недостаточно для синтеза ферментов в количестве, способном обеспечить заметную реакцию. Этим же может объясняться, например, незначительная величина сигналов на все субстраты, кроме глюкозы, у *S. sciuri*. Кроме того, несомненно, большая часть различий между культуральными и респираторными профилями обусловлена различиями самих подходов – определение респираторного профиля позволяет полнее оценить катаболический потенциал микроорганизма и может выявить активность, которая не проявляется образованием рН-активного вторичного метаболита. Верно и обратное – например, ак-

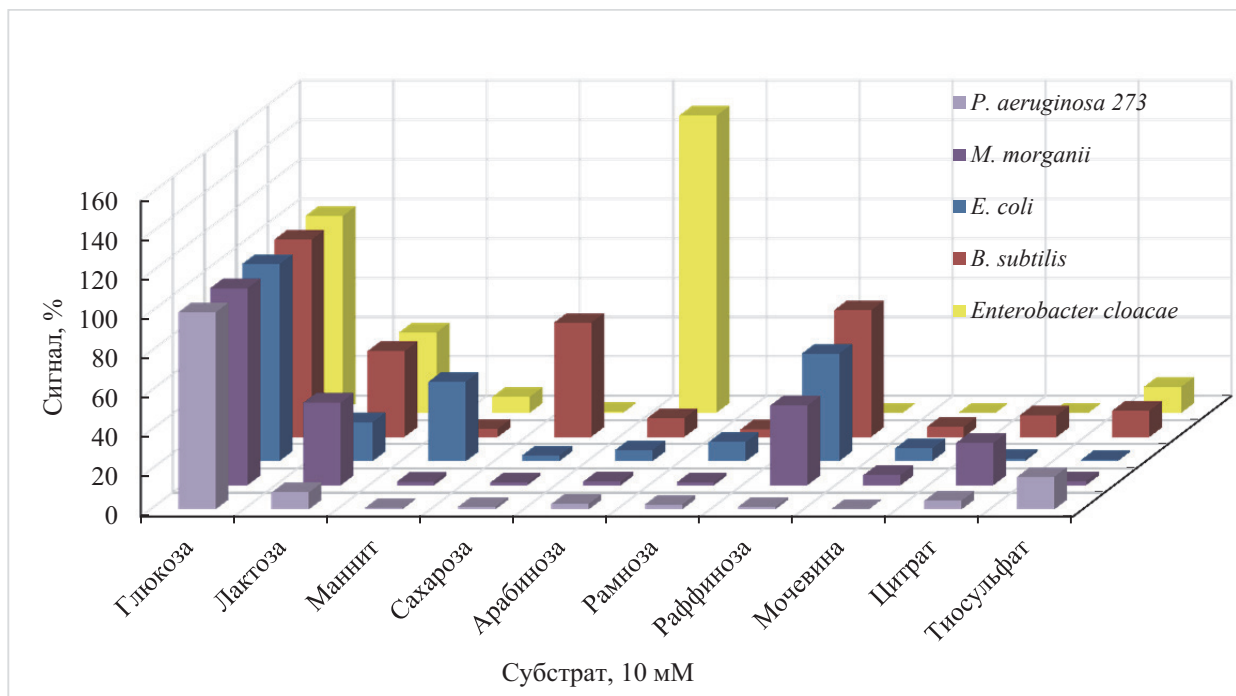


Рис. 5. Сводный график профилей респираторной активности микроорганизмов, не вошедших ни в одну из групп

тивность уреазы, лежащая в основе уреазного культурального теста и обеспечивающая гидролиз мочевины до NH_3 и CO_2 , может быть не связана с остальными катаболическими путями и дыхательной цепью клетки. По-видимому, этим объясняется незначительная величина сигналов на мочевины при получении респираторных профилей у большинства культур, в том числе *P. vulgaris*, *S. capitis* subsp. *urealyticus* и *M. morgani* – механизм, обеспечивающий слабое потребление кислорода в ответ на мочевины, не имеет отношения к уреазе и связан с другими ферментами и путями азотистого обмена. Аналогичным образом, применяемый метод не обеспечивает регистрацию сульфитредуктазной активности, ответственной за образование H_2S из тиосульфата и аналогичных соединений, например, у *P. vulgaris*. В то же время, регистрация небольших, но достоверных сигналов на тиосульфат, в частности, у *B. subtilis*, *P. aeruginosa* и *E. faecalis*, видимо, опосредована ферментами окислительного метаболизма серы у этих бактерий.

Таким образом, разработанный метод обеспечивал методически простую оценку состояния клеток микроорганизмов в реальном времени при минимальных затратах на оборудование и расходные материалы, и может представлять собой еще один инструмент экспресс-оценки биохимических характеристик клеток. Очевидно, что область его применения не ограничивается экспресс-определением видовой принадлежности бактерий, описанным в данной статье, и может включать, в числе прочего, оценку жизнеспособности клеток и их реакций на различные вещества и факторы окружающей среды. Дополнительное расширение функционала этого метода возможно при использовании многоканальных датчиков, аналогичных использованному. Концепция такого датчика основывается на стандартном 24-лучном планшете, в крышку которого встроены микроконтроллер с распайкой проводов на 24 кислородных датчика Кларка длиной 5 мм и наружным диаметром 5 мм, изготовленных по классической схеме и присоединяемых к крышке через коаксиальные самофиксирующиеся разъемы. Лунки при этом будут играть роль кувет датчиков, причем рабочая поверхность датчика будет непосредственно примыкать ко дну лунки, что позволит работать как с адгезивными, так и с суспензионными культурами. Микроконтроллер должен обеспечивать подачу постоянного напряжения -0,7 В на центральный электрод датчика относительно электрода сравнения, измерение силы тока в цепи каждого электрода с частотой 1 раз в 0,5 с и передачу данных на персональный компьютер через USB-порт. Для обеспечения возможности введения субстратов в лунки планшета и их промывки в

крышке также будут предусмотрены отверстия для наконечников стандартных автоматических дозаторов. Такое изделие позволит существенно ускорить исследование свойств клеток за счет возможности параллельных измерений при одинаковых или различных условиях при минимальной процедурной сложности и стоимости анализа. В ближайшее время авторами запланирована техническая реализация этого изделия и его применение в рамках работ в Институте экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета.

ВЫВОДЫ

Разработан метод оценки физиолого-биохимических характеристик интактных клеток *in vitro* в режиме реального времени, использованный для экспресс-определения таксономической принадлежности клеток микроорганизмов. Метод был использован для экспресс-оценки таксономической принадлежности микроорганизмов и позволил получить метаболические профили 17 культур микроорганизмов. Выполнено их статистическое сопоставление между собой и биохимическими профилями при культивировании на средах.

Данное исследование в целом подтверждает возможность применения разработанного метода для выявления близкородственных таксонов микроорганизмов. Предложена концепция многоканального датчика, который позволит существенно ускорить исследование свойств клеток

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Design, synthesis and structure-activity relationship study of wollamide B; a new potential anti TB agent. / H. Asfaw, K. Laqua, A.M. Walkowska, F. Cunningham, M.S. Martinez-Martinez, J.C. Cuevas-Zurita, L. Ballell-Pages, P. Imming. // PLoS One. 2017. V. 12. Iss. 4. P. e0176088.
2. New approaches to antibiotic discovery. / C. Kealey, C.A. Creaven, C.D. Murphy, C.B. Brady. // Biotechnol Lett. 2017. V. 39. Iss. 6. P. 805-817.
3. Metabolic Engineering for Probiotics and their Genome-Wide Expression Profiling. / R. Yadav, P.K. Singh, P. Shukla. // Curr Protein Pept Sci. 2018. V. 19. Iss. 1. P. 68-74.
4. Diagnostic Bacteriology: Raman Spectroscopy. / R.L. Pavlicek, N.J. Crane, M. Ghebremedhin, K.E. Cilwa, E.A. Elster. // Methods Mol Biol. 2017. V. 1616. P. 249-261.
5. Next generation microbiological risk assessment-Potential of omics data for hazard characterisation. / N. Haddad, N. Johnson, S. Kathariou, A. Metris, T. Phister, A. Pielaat, C. Tassou, M.H.J. Wells-Bennik, M.H. Zwietering. // Int J Food Microbiol. 2018.
6. E. Watson, G. Reid. Metabolomics as a clinical testing method for the diagnosis of vaginal dysbiosis. // Am J Reprod Immunol. 2018. P. e12979.

7. Exhaled Volatile Organic Compounds of Infection: A Systematic Review. / *W.M. Ahmed, O. Lawal, T.M. Nijsen, R. Goodacre, S.J. Fowler.* // *ACS Infect Dis.* 2017. V. 3. Iss. 10. P. 695-710.
8. Rapid identification of viable *Escherichia coli* subspecies with an electrochemical screen-printed biosensor array. / *P. Ertl, M. Wagner, E. Corton, S.R. Mikkelsen.* // *Biosensors and Bioelectronics.* 2003. V. 18. Iss. 7. P. 907-916.
9. An electrochemical method for simultaneous detection and identification of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella choleraesuis* using a glucose oxidase-peroxidase composite biosensor. / *M.D. Morales, B. Serra, A. Guzmán-Vázquez De Prada, Á.J. Reviejo, J.M. Pingarrón.* // *Analyst.* 2007. V. 132. Iss. 6. P. 572-578.
10. A Cell Viability Assay Based on Monitoring Respiration by Optical Oxygen Sensing. / *T.C. O'Riordan, D. Buckley, V. Ogurtsov, R. O'Connor, D.B. Papkovsky.* // *Analytical Biochemistry.* 2000. V. 278. Iss. 2. P. 221-227.
11. Optimization of an oxygen-based approach for community-level physiological profiling of soils. / *M.C. Zabaloy, R.M. Lehman, S.D. Frey, J.L. Garland.* // *Soil Biology and Biochemistry.* 2008. V. 40. Iss. 12. P. 2960-2969.
12. Substrate specificity of glucose dehydrogenase (GDH) of *Enterobacter asburiae* PSI3 and rock phosphate solubilization with GDH substrates as C sources. / *V. Sharma, V. Kumar, G. Archana, G.N. Kumar.* // *Can J Microbiol.* 2005. V. 51. Iss. 6. P. 477-482.
13. Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. / *B.C. Saha, R.J. Bothast.* // *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999. V. 52. Iss. 3. P. 321-326.

IMPLEMENTATION OF A DEVICE AND METHOD FOR PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL REAL TIME CHARACTERIZATION OF MICROBIAL CELLS IN VITRO

© 2020 P.V. Iliasov¹, D.F. Gajsina², P.N. Zolotarev³, A.S. Sustretov¹

¹ Institute for Experimental Medicine and Biotechnologies, Samara State Medical University, Samara, Russia

² Samara National Research University named after Academician S.P. Korolyov, Samara, Russia

³ Reaviz Medical University, Samara, Russia

A method for physiological and biochemical real time characterization of intact cells in vitro was developed and used for express identification of microorganisms. The method provided differentiation of bacteria at the level of closely related groups and has a significant potential in cell biology. A concept of multi-channel transducer able to accelerate characterization of cells is discussed.

Keywords: cell physiology and biochemistry, metabolic profiles, respiratory activity, identification of bacteria.

DOI: 10.37313/1990-5378-2020-22-6-64-71

Pavel Iliasov, PhD in Biology, Leading Scientist.

E-mail ilpv73@gmail.com

Daria Gajsina, Educational Master, Department of Biochemistry, Biotechnology and Bioengineering.

E-mail gdf1995@mail.ru

Pavel Zolotarev, PhD in Medicine, A.P., Vice-Rector for Clinical Affairs. E-mail zolotareff@list.ru

Alexey Sustretov, Junior Research Fellow.

E-mail a.s.sustretov@samsmu.ru