



УДК 576.8.095+628.163

ЗАСТОСУВАННЯ РЕДОКС-ІНДИКАТОРІВ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ ОКИСНО-ВІДНОВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ПІД ЧАС РОСТУ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ

I. Р. Притула, О. Б. Таширеє

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03680, Україна
e-mail: ivanprytula@ukr.net*

Розроблено кількісний метод колориметричного вимірювання окисно-відновного потенціалу (ОВП) в рідких і агаризованих середовищах. Створена шкала з 12 барвників (редокс-індикаторів) для вимірювання ОВП під час росту культур мікроорганізмів у діапазоні від -30 до -420 мВ. Метод дає змогу вимірювати швидкість зниження ОВП без розгерметизації культиватора в рідкому середовищі, а також охарактеризувати стереометричне розподілення редокс-зон у рідкому або агаризованому середовищах. Показана можливість використання двох барвників для визначення швидкості зміни ОВП на прикладі росту культури воденьутворюючих бактерій, двох штамів роду *Bacillus* і штаму *Escherichia coli* 926 (ATCC 8789). Стереометрична конфігурація редокс-зон у товщі рідкого середовища визначається тим, що бактерії сорбуються на субстраті й локально знижують ОВП. Вік культури впливає на швидкість зниження ОВП. Під час росту одностодової культури швидкість зниження ОВП у рідкому середовищі у 2–3 рази вища, ніж у разі використання тридодової. Під час росту аеробних і факультативно-анаеробних бактерій зниження ОВП на поверхні агаризованих середовищ до $E_h \leq -100$ мВ відбувається під штрихом або окремою колонією, а до $E_h \leq -50 \dots -90$ мВ – у зоні 4–9 мм від її краю.

Ключові слова: окисно-відновний потенціал, барвники-індикатори, шкала вимірювання ОВП, ріст культур мікроорганізмів.

ВСТУП

У хімії та біології широко використовуються два методи вимірювання окисно-відновного потенціалу (ОВП, E_h , редокс-потенціал): 1) електрохімічний (потенціометричний) і 2) колориметричний.

Перший метод ґрунтується на вимірюванні ОВП за допомогою пари електродів (вимірювального і електрода порівняння). У разі занурення електродів у середовище, в якому змінюється ОВП, він визначається як напруга між електродами, котру виражають у вольтах (або мілівольтах) у перерахунку на показник водневого електрода (E_h). Колориметричний метод заснований на використанні

барвників – редокс-індикаторів. У таких барвників хромоформні (хромогенні) групи, що визначають колір барвника, оборотно відновлюються до безбарвної форми барвника (лейкоформи). У мікробіології для вимірювання ОВП широко застосовується резазурин, феносафранін, нейтральний червоний, метиленовий синій. Кожен із барвників має певний потенціал утворення лейкоформи [11].

В електрохімії прийнято виражати потенціал утворення лейкоформи барвника при рівності концентрацій (або активностей) його окисленої та відновленої форм (E_0') і $pH=7,0$ [11]. У такому випадку барвник знебарвлений частково. Тому для практичного використання редокс-барвників необхідно емпірично визначити потенціал їх повного знебарвлення.

Очевидно, що потенціометричний і колориметричний методи вимірювання ОВП мають як позитивні, так і негативні аспекти застосування. До позитивних аспектів потенціометричного методу належить: 1) визначення величини ОВП з високою точністю (± 10 мВ) і в широкому діапазоні – від +800 до -800 мВ; 2) одночасне визначення ОВП і pH парою вимірювальних електродів. Негативними аспектами потенціометричного методу є: 1) інерційність вимірювання: для достовірного вимірювання величини ОВП необхідна експозиція не менше 10 хв; 2) неможливість вимірювання ОВП у великій кількості культиваторів (повторностей); 3) складність хімічної стерилізації електродів і необхідність застосування складних процедур для уникнення дифузії електроліту з проточного електрода* в живильне середовище; 4) значна похибка вимірювання потенціалу через утворення на поверхні платини вимірювального електрода щільного шару біообростання за тривалого вимірювання ОВП в культиваторі (5–10 год).

До основних позитивних аспектів вимірювання ОВП за допомогою редокс-індикаторів варто віднести: 1) візуальний контроль ступеня відновлення живильних середовищ за анаеробних умов; 2) ОВП можна вимірювати одночасно в кількох десятках культиваторів; 3) можливість диференціювання за допомогою барвників факультативно і облігатно анаеробні мікроорганізми [2]; 4) визначення стереометричної (об'ємної) конфігурації редокс-зон у товщі середовища; 5) використання барвників дає змогу уникнути операцій, які супроводжуються розгерметизацією культиваторів (наприклад, заміна електродів) і які можуть призвести до дифузії повітря або контамінації досліджуваних культур. Негативними аспектами колориметричного методу вимірювання ОВП є: 1) бактеріостатична або навіть бактерицидна дія деяких барвників [12]; 2) залежність потенціалу утворення лейкоформи барвника від значення pH [6, 9]; 3) барвники є редокс-буферами і тому можуть змінювати ОВП середовища [5].

Таким чином, вибираючи метод вимірювання ОВП, варто оцінити доцільність застосування кожного з методів, виходячи з цілей і завдань експерименту. Очевидно, що бажано застосовувати обидва методи паралельно. Ці методи взаємно доповнюють один одного і дають змогу максимально охарактеризувати редокс-стан культур у процесі росту, тому що колориметричний метод дає інформацію про стереометричний розподіл редокс-зон у середовищі, а електродний – забезпечує безперервність вимірювання ОВП.

Метою нашої роботи була розробка способу кількісного вимірювання ОВП за допомогою редокс-індикаторів для характеристики зміни ОВП під час росту культур аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів. Для досягнення мети були вирішені такі завдання: 1) визначення потенціалу утворення лейкоформи

* Наприклад, проточного хлорсрібного електрода порівняння, що містить насичений розчин KCl.

барвників і створення шкали барвників у діапазоні -30...-420 мВ з кроком у 20 мВ; 2) встановлення закономірностей утворення редокс-зон під час росту культур анаеробних і факультивно-анаеробних бактерій: а) в об'ємі рідкого середовища і б) на поверхні агаризованих середовищ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для створення шкали барвників використовували розроблений нами анаеробний культиватор (вимірювальну скляну комірку). Цей культиватор забезпечує стерильність, герметичність і дає змогу в безперервному режимі вимірювати рН і Eh середовища, об'єм і склад газової фази, а також оптичну густину культуральної рідини [10].

Для визначення потенціалу утворення лейкоформи барвників їх відновлювали в культиваторі в атмосфері аргону цитратом титану (III) [9]. У культиватор у плинні аргону шприцом вносили 50 мл 0,0005% розчину барвника у фосфатному буфері (рН = 6,86) і по краплях додавали відновник до знебарвлення розчину. Потенціал утворення лейкоформ визначали за допомогою рН-метра-мілівольтметра "рН-121" (або "ЕВ-74") з електродами: платиновий ЕПВ-1 (для вимірювання ОВП), скляний ЕСЛ-63-07 (для вимірювання рН) і хлорсрібний електрод порівняння ЕВЛ-1МЗ. Розроблений колориметричний спосіб ми застосували для встановлення закономірності розподілу ОВП під час росту анаеробних і факультивно-анаеробних бактерій.

Закономірності стереометричного розподілу ОВП у рідкому середовищі вивчали під час росту культури воденьутворюючої асоціації (ВУА) *Bacillus* і *Clostridium* [4]. Асоціацію виділяли в картопляному заторі, використовуючи як інокулят суміш ґрунту, активний мул аеротенка і зброджений осад метантенка [4]. Затор готували так: інокулят і нарізану неочищену картоплю вносили в пробірку об'ємом 50 мл і заливали водопровідною водою на половину висоти. Пробірку витримували 10 хв на водяній бані при 100°C та інкубували в термостаті під гумовою пробкою при 30°C. Після початку активного бродіння (на 2–3 добу) нагромаджувальну культуру (1 мл) пересівали на рідке селективне середовище з крохмалем. Використовували середовище № 1 такого складу (г/л): картопляний крохмаль харчовий – 10,0; K_2HPO_4 – 2,5; KH_2PO_4 – 0,5; NH_4Cl – 2,0; Na_2SO_4 – 0,5; пептон – 0,5; дріжджовий екстракт – 0,5; дистильована вода – 1000 мл; рН = 7,2–7,4.

Закономірності розподілу редокс-зон на поверхні агаризованих середовищ досліджували під час росту культур *Bacillus* sp. BS-1, *Bacillus* sp. BS-4 і *Escherichia coli* 926 (ATCC 8789). Бактерії роду *Bacillus* виділені з ВУА методом десятикратних розведень при посіві їх на селективне агаризоване середовище з крохмалем (середовище № 2). Склад середовища № 2 (г/л): картопляний крохмаль харчовий – 20,0; агар – 20,0; K_2HPO_4 – 2,0; NH_4Cl – 2,0; Na_2SO_4 – 0,2; дріжджовий екстракт – 0,2; дистильована вода – 1000 мл; рН = 7,1–7,3. Штам *E. coli* 926 був отриманий із Депозитарію мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Вибір бактерій роду *Bacillus* обумовлений їх фізіологічною роллю в асоціації, а саме тим, що вони створюють оптимальні умови для росту клостридій. По-перше, *Bacillus* відновлюють O_2 і виділяють редокс-метаболіти. Ефект поглинання O_2 і синтез відновлених екзометаболітів призводить до створення строго анаеробних умов, тобто повної відсутності O_2 і негативного значення ОВП. По-друге, амілазна активність у бактерій роду *Bacillus* значно вища, ніж у клостридій [13]. Завдяки цьому до моменту створення анаеробних умов у середовищі клостридії отримують моно-

і дисахариди, з яких вони швидше, ніж із полісахаридів, синтезують H_2 . Бактерія *E. coli* є типовим факультативно-анаеробним видом, має потужну низькопотенціальну редокс-систему [8] і під час росту в анаеробних умовах створює $Eh \approx -400 \dots -420$ мВ. Закономірності зміни ОВП є типовими під час росту культур факультативно-анаеробних хемоорганотрофних бактерій. Тому колекційний штам *E. coli* 926 був обраний нами як репрезентативний для визначення швидкості зміни ОВП під час росту культури за допомогою використаної пари редокс-індикаторів.

Для культивування *Bacillus* sp. BS-1 і *Bacillus* sp. BS-4 використовували два агаризованих середовища – № 3 та № 4. Середовище № 3 (г/л): картопляний крохмаль харчовий – 10,0; агар – 15,0; K_2HPO_4 – 2,5; KH_2PO_4 – 0,5; NH_4Cl – 2,0; Na_2SO_4 – 0,5; пептон – 0,5; дріжджовий екстракт – 0,5; дистильована вода – 1000 мл; рН = 7,1–7,3. У середовищі № 4 джерелом карбону була глюкоза в концентрації 20,0 г/л; інші компоненти – як у середовищі № 3. Штам *E. coli* 926 культивували на м'ясопептонному агарі з додаванням 20 г/л глюкози і 2 г/л дріжджового екстракту; рН = 7,1–7,3.

Мінеральні солі стерилізували при 1,5 атм (20 хв); термолабільні компоненти – крохмаль, пептон, дріжджовий екстракт, глюкозу і барвники стерилізували при 0,5 атм (20 хв). Для культивування ВУА використовували скляні флакони об'ємом 120 мл із різьбою на горловині; об'єм середовища 70 мл. Культури *Bacillus* sp. BS-1, *Bacillus* sp. BS-4 і *E. coli* вирощували на агаризованих середовищах у чашках Петрі ($d = 120$ мм, $h = 20$ мм); об'єм середовища 25 мл. Культуру *E. coli* 926 вирощували при 37°C, а інші культури – при 30°C.

Склад газу, що синтезувався при рості ВУА, визначали за стандартною методикою по теплопровідності катарометра на газовому хроматографі ЛХМ-8-МД [1]. Використовували дві сталеві колонки – одна (1) для аналізу H_2 , O_2 , N_2 і CH_4 , друга (2) – для аналізу CO_2 . Параметри колонок: 1 – $l = 3$ м, $d = 3$ мм, сорбент 13X (NaX); 2 – $l = 2$ м, $d = 3$ мм, сорбент Porapak-Q. Температура колонок – 60°C, випарювача – 75°C, детектора – 60°C, струм детектора – 50 мА. Газ-носієй – аргон; швидкість подачі газу – 30 мл/хв. Вміст газів H_2 , CO_2 , N_2 і O_2 (у %) розраховували за площиною їхніх піків, що реєструвалися самописцем полярографа.

Для вимірювання швидкості зниження ОВП під час росту досліджуваних культур використовували 0,1% водні розчини барвників – метиленового синього і резазурину. За допомогою цієї пари редокс-індикаторів можливе вимірювання ОВП у діапазоні -30...-100 мВ. Метиленовий синій при $Eh \geq -30$ мВ має синьо-блакитне забарвлення, при $Eh \leq -30$ мВ він оборотно відновлюється до лейкоформи. Резазурин має дві фази зміни кольору: у першій фазі, при $Eh \leq -50$ мВ, фіолетовий резазурин необоротно відновлюється в резорурфін яскраво-червоного кольору. У другій фазі, при $Eh \leq -100$ мВ, резорурфін оборотно відновлюється до лейкорезазуруфіну [3]. Барвники вносили в середовище у кількості, достатній для чіткого розрізнення зміни забарвлення в товщі рідкого або агаризованого середовища. Воденьутворюючу асоціацію культивували у трьох флаконах, у які вносили такі кількості індикаторів: 1) 0,2 мл метиленового синього (МС-флакон), 2) 0,1 мл резазурину (Р-флакон), 3) 0,2 мл метиленового синього і 0,1 мл резазурину (МС+Р-флакон). Штами *Bacillus* sp. BS-1 і *Bacillus* sp. BS-4 культивували на середовищах № 3 та № 4 з трьома варіантами барвників. У середовище в першу чашку вносили 0,4 мл метиленового синього (МС-чашка), у другу – 0,4 мл резазурину (Р-чашка), в третю – 0,4 мл метиленового синього і 0,4 мл резазурину (МС+Р-чашка). У кожній чашці, розділеній навпіл, штрихом, лінією від центру висівали два штами бацил (18–24 год культури на середовищі № 3 без барвників). Штам *E. coli* 926 вирощували на середовищі

з резазурином (0,4 мл). Для вимірювання зон** зміни кольору індикатора навколо окремих колоній 18–24 год культуру розсівали петлею методом збіднюючого штриха.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Відновлення барвників у фосфатному буфері стабілізує рН і усуває його вплив [6, 9] на величину потенціалу утворення лейкоформ (табл. 1).

Таблиця 1. Значення потенціалів утворення лейкоформ барвників у фосфатному буфері (рН = 6,86)

Table 1. Potentials of dyes' leucoform in phosphate buffer (pH = 6.86)

№	Барвник (редокс-індикатор)	Потенціал переходу в лейкоформу, $\pm 10 \dots 20$ мВ	
		Початок	Кінець
1	Метиленовий синій	-30	-40
2	Азур II	-70	-90
3	Резазуринат натрію	-90	-100
4	Мурексид	-110	-120
5	Індигокармін	–	-120
6	Янус зелений	-200	-220
7	Кристалічний фіолетовий	-220	-240
8	Феносафранін	-240	-250
9	Бромфеноловий синій	–	-300
10	Нейтральний червоний	–	-320
11	Генціановий фіолетовий	-340	-350*
12	Фуксин основний	–	-420

Примітка: * – при -350 мВ спостерігається блідо-блакитний колір, який при подальшому зниженні ОВП (до -480 мВ) не змінюється.

Comment: * – at -350 mV pale-blue which upon further reduction of ORP (to -480 mV) is observed and does not further change.

У літературі [11] наведені, як правило, значення E_0' барвників, які встановлені при рівності концентрацій окисленої і відновленої форм барвника (рН=7,0). Інакше кажучи, при E_0' в лейкоформу переходить лише половина індикатора, а друга половина залишається забарвленою. Очевидно, що необхідно знати величину потенціалу, при якому індикатор повністю знебарвлюється.

Використання барвників у концентрації 0,0005% дає змогу, з одного боку, звести до мінімуму здатність самих барвників міняти ОВП індикаторної системи [5] і, з іншого боку, візуально виявляти утворення лейкоформи.

Необхідно зазначити також такі особливості створеної шкали барвників: 1) шкала охоплює діапазон значень ОВП, у якому росте більшість аеробів і анаеробів, 2) колориметричний спосіб вимірювання ОВП за допомогою шкали є і якісним (візуальне визначення зміни ОВП), і кількісним (точність вимірювання у 20–30 мВ), 3) використовувані індикатори малочутливі до зміни рН.

Для вимірювання швидкості зниження ОВП під час росту ВУА в рідкому середовищі було проведено два експерименти з використанням для інокуляції одної тридобової культур. Вихідне значення ОВП середовища вимірювали потенціометричним методом. У першому експерименті початковий ОВП становив +425 мВ, у другому – +415 мВ. Під час росту ВУА у флаконах ОВП знижувався, і редокс-зони

** Зони утворення лейкоформ барвників і резорурфіну вимірювали як відстань від краю штриха або колонії до межі забарвлене (частково забарвлене)-незабарвлене середовище.

мали виражений стереометричний розподіл. Так, зміна кольору барвників починалася в нижній половині флаконів (2–2,5 см від дна). Такий розподіл редокс-зон обумовлений двома факторами: 1) крохмаль переважно у формі рихлої маси був сконцентрований у нижній половині середовища, 2) бактерії, що у великій кількості були сорбовані на крохмалі, локально знижували ОВП.

На рис. 1 представлена зміна ОВП у рідкому середовищі під час росту ВУА *Bacillus* і *Clostridium*.

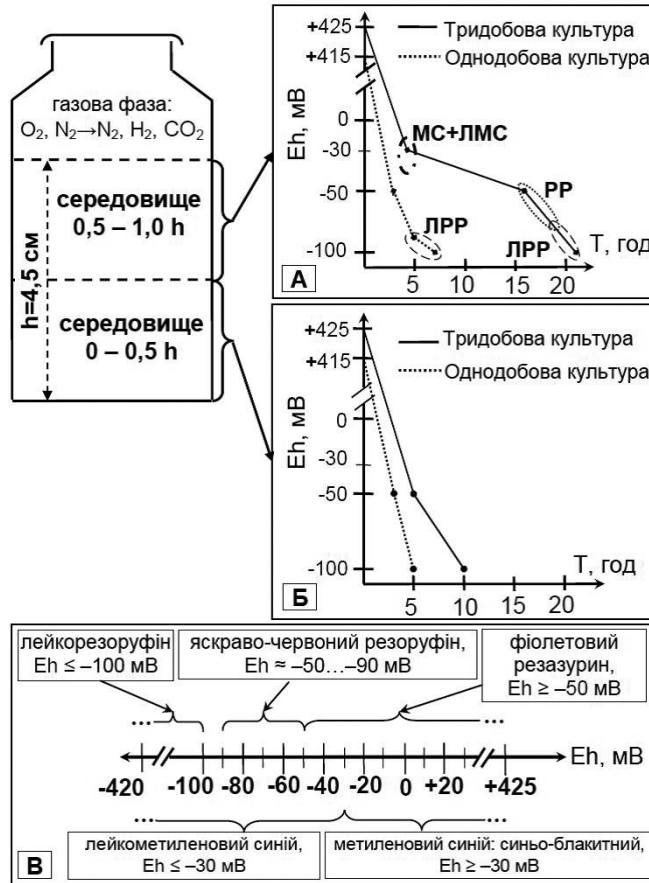


Рис. 1. Зміна ОВП в рідкому середовищі під час росту воденьутворюючої асоціації *Bacillus* і *Clostridium*. А – зниження ОВП у шарі середовища 0,5–1,0 h. Зміна кольору індикатора протягом 1–2 год відбувалася з утворенням перехідних горизонтальних смуг висотою 0,2–0,5 см: МС+ЛМС – від світло-блакитного метиленового синього до лейкометиленового синього ($Eh \approx -30 \dots -40$ мВ, МС-флакон); РР – від яскраво-рожевого резорурфін ($Eh \approx -50$ мВ), через проміжний світло-рожевий колір ($Eh \approx -50 \dots -90$ мВ, Р- і МС+Р-флакони) до лейкорезорурфін (ЛРР); Б – значення потенціалів утворення лейкоформ метиленового синього і резазурину на шкалі барвників-індикаторів

Fig. 1. The ORP change in liquid medium during growth of hydrogen-producing association *Bacillus* and *Clostridium*. А – ORP decrease in 0.5–1.0 h layer of medium. Discoloration of dye for 1–2 hours took place with the formation of transient horizontal bands of 0.2–0.5 cm height: МС+ЛМС – from light blue methylene blue to leucomethylene blue ($Eh \approx -30 \dots -40$ mV, MC-bottle), РР – from bright pink resorufin ($Eh \approx -50$ mV), through an intermediate light pink color ($Eh \approx -50 \dots -90$ mV, P- and MC+P-bottles) to leucoresorufin (ЛРР); Б – ORP decrease in the 0–0.5 h layer of medium; Б – potentials of leucoform formation of methylene blue and resazurin on the dye-indicators scale

Загальноприйнято, що величина ОВП середовища однакова по всьому об'єму. Як видно з представлених даних, у середовищі одночасно можуть бути зони з від'ємними (нижче нуля) і позитивними (вище нуля) значеннями ОВП.

Швидкість зниження ОВП (показник v) в рідкому середовищі розраховували за формулою: $v = dEh:dt$, де v – швидкість зміни ОВП, мВ/год; dEh – зміна величини ОВП; dt – час зміни кольору індикаторів. Під час росту тридобової культури розраховані такі значення v . У нижній половині середовища потенціал знижувався від +425 до -100 мВ за 10 год, тобто $v = 52$ мВ/год; у верхній половині – від +425 до -100 мВ за 21 год, тобто $v = 25$ мВ/год.

Під час росту одностодової культури ВУА спостерігали аналогічну зміну ОВП і кольору барвників. У нижній половині середовища потенціал знизився від +415 до -100 мВ за 5 год, тобто $v = 103$ мВ/год; у верхній половині – від +415 до -100 мВ за 7 год, тобто $v = 74$ мВ/год.

У другому експерименті під час дослідження одностодової культури у присутності всіх барвників склад газової фази у флаконах визначали на 28, 29 і 49 год культивування (табл. 2).

На 28 год культивування концентрація O_2 становила 5,7–8%, з чого випливає, що знебарвлення індикатора в рідкому середовищі не означає відсутності O_2 в газовій фазі. На величину ОВП у культуральній рідині суттєво впливає наявність O_2 у газовій і рідкій фазах, так і швидкість дифузії O_2 в рідке середовище. Завдяки високій концентрації низькопотенціальних екзометаболітів, та як наслідок – високої редокс-буферної ємності середовища, індикатори не змінюють колір за наявності O_2 в газовій фазі. Отримані дані пояснюють уявне протиріччя між наявністю O_2 в екосистемах і одночасним відтворенням анаеробних процесів.

Для оцінки величини редокс-буферної ємності середовища на 28 год культивування в кожен флакон шприцом двічі (з інтервалом 15 хв) вносили по 1 мл повітря. Після цього через 1 год визначали склад газу (табл. 2). У флаконах із резазурином і двома барвниками концентрація O_2 зросла на 4,1 і 0,8%, відповідно, але це не призвело до зміни кольору індикаторів. У флаконі з метиленовим синім збільшення концентрації O_2 на 2% призвело до забарвлення шару культуральної рідини 0,5–2 см від поверхні. Відновлення бацілами кисню сприяло зниженню його концентрації на другу добу від 7,7–10,2% до 1,1–2,5% (табл. 2), при цьому індикатори в усіх флаконах були безбарвними.

Ефективність синтезу водню залежить від величини редокс-потенціалу. Тому ми досліджували залежність ефективності синтезу H_2 від величини Eh . На першу добу культивування при $Eh \leq -100$ мВ, спостерігався синтез H_2 , хоча його концентрація була лише 0,2–0,6% (табл. 2, флакон із резазурином). На другу добу ОВП досяг діапазону -100...-330 мВ, в якому активно ростуть облигатні анаероби [7]. Цим пояснюється висока концентрація H_2 – 26–29%.

Таким чином, із результатів двох експериментів випливає, що під час росту одностодової культури ВУА швидкість зниження ОВП середовища була вища, ніж під час росту тридобової культури. Так, у нижньому та верхньому шарі середовища показник v був вищим у 2 і 3 рази, відповідно.

Під час росту на агаризованому середовищі в аеробних умовах культури *Bacillus* sp. BS-1, *Bacillus* sp. BS-4 і *E.coli* 926 знижують Eh до -100 мВ і нижче (рис. 2). Знебарвлення індикаторів у середовищі відбувається в зоні росту штриха або окремої колонії. На поверхні агаризованого середовища межа переходу забарвленої (окисленої) форми барвника в безбарвну була розмитою. Обумовлено це тим, що

одночасно зі зниженням ОВП за росту культури відбувається окислення середовища киснем повітря. Це створює неточність у метричному вимірі меж між зонами агару із забарвленою і незабарвленою формами барвників. Перехідні зони (світло-рожеві, світло-фіолетові та рожеві) при цьому досягали 1–3 мм. Тому за росту штамів *Bacillus* sp. і *E. coli* тривалість зміни кольору і знебарвлення індикаторів становила доби, а не години, як у випадку з ВУА.

Таблиця 2. Склад газової фази під час культивування однодобової культури водень-утворюючої асоціації

Table 2. Composition of gas phase during growth of 1-day culture of hydrogen-producing association

Флакони з барвником	Склад газової фази	Тривалість культивування, год			
		0	28	29	49
		Концентрація, %			
Метиленовий синій	O ₂	21	5,7	7,7	1,1
	N ₂	78	41,5	76,6	46,7
	H ₂	0	0	0	28,9
	CO ₂	0,03	52,8	15,7	23,3
	Колір індикатора	синьо-блакитний	лейкоформа	блакитний 0,5–2 см шар від поверхні середовища	лейкоформа
	Eh, мВ	+415	≤ -30	≥ -30	≤ -30
Резаурин	O ₂	21	6,1	10,2	2,5
	N ₂	78	55,2	79,6	58,1
	H ₂	0	0,2	0,6	27
	CO ₂	0,03	38,5	9,6	12,4
	Колір індикатора	фіолетовий	лейкоформа	лейкоформа	лейкоформа
	Eh, мВ	+415	≤ -100	≤ -100	≤ -100
Метиленовий синій і резазурин	O ₂	21	8	8,8	1,9
	N ₂	78	58,5	69,8	58,1
	H ₂	0	0	0	26,3
	CO ₂	0,03	33,5	21,4	13,7
	Колір індикатора	синьо-фіолетовий	лейкоформа	лейкоформа	лейкоформа
	Eh, мВ	+415	≤ -100	≤ -100	≤ -100

Для вимірювання швидкості зміни ОВП при рості штамів *Bacillus* sp. їх висівали спочатку на середовище № 3. Друга, четверта і сьома доби росту були найбільш показовими для опису динаміки зниження ОВП (рис. 2). На четверту добу редуцерна активність обох штамів була найвищою.

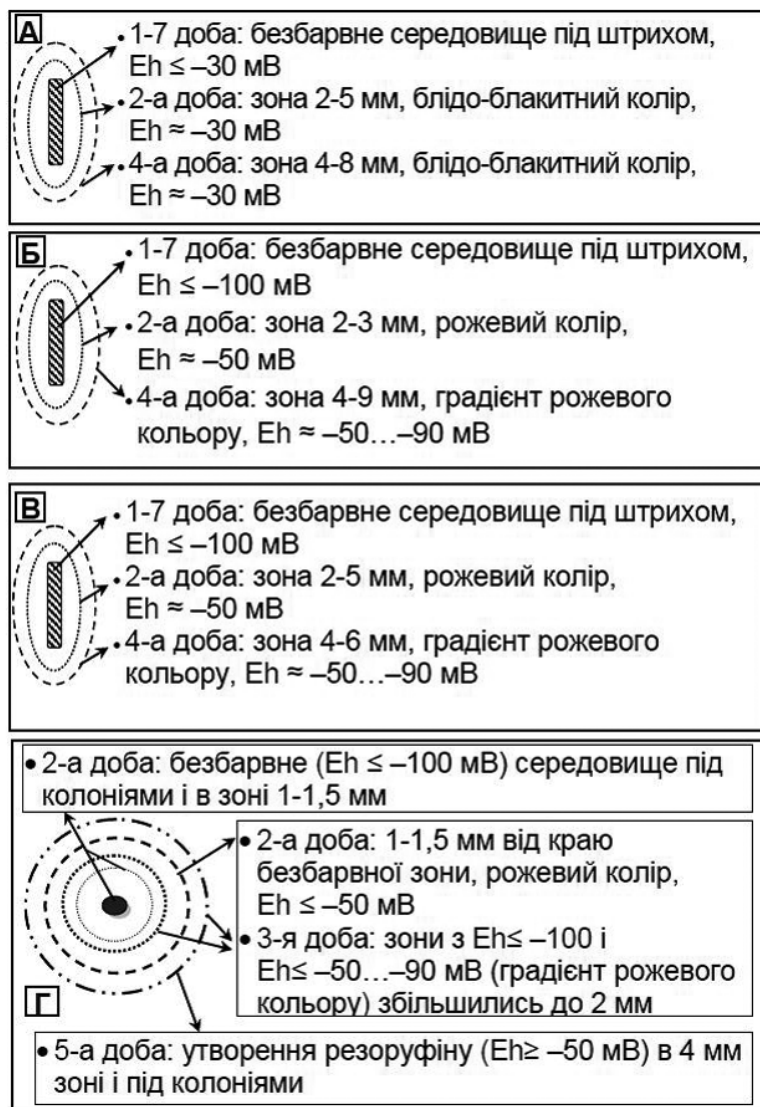


Рис. 2. Зміна ОБП під час росту штамів *Bacillus* sp. BS-1 і *Bacillus* sp. BS-4 на агаризованому середовищі № 4: А – чашка з метиленовим синім; Б – чашка з резазурином; В – чашка з метиленовим синім і резазурином; Г – зміна ОБП при рості *E. coli* 926 на м'ясопептонному агарі (з додаванням 20 г/л глюкози і 2 г/л дріжджового екстракту) з редокс-індикатором резазурином

Fig. 2. The ORP change during growth of *Bacillus* sp. BS-1 and *Bacillus* sp. BS-4 on solid medium No 4: А – plate with methylene blue; Б – plate with resazurin; В – plate with methylene blue and resazurin; Г – ORP change during growth of *E. coli* 926 on meat-peptone agar (with the addition of 20 g/l glucose and 2 g/l yeast extract) with a redox indicator resazurin

У чашці з метиленовим синім на другу добу зона з $Eh \approx -30$ мВ становила 2–5 мм від краю штриха. У цій зоні індикатор був блідо-блакитного кольору. На четверту добу блідо-блакитна зона збільшилася до 4–8 мм, але повністю ($Eh \leq -30$ мВ) індикатор знебарвився тільки під штрихом.

У чашці з резазурином на другу добу зона з $E_h \approx -50$ мВ становила 2–3 мм. На четверту добу зона утворення резорурфіну (градієнт кольору від яскраво-рожевого до блідо-рожевого, $E_h \approx -50 \dots -90$ мВ) збільшилася до 4–9 мм, але повністю індикатор знебарвився тільки під штрихом ($E_h \leq -100$ мВ).

У чашці з двома барвниками на другу добу зона з $E_h \approx -50$ мВ становила 2–5 мм. На четверту добу зона утворення резорурфіну (градієнт кольору) збільшилася до 4–6 мм, але повністю індикатор знебарвився тільки під штрихом.

На сьому добу і далі редокс-активність штамів знижувалася: спостерігали появу яскравого забарвлення окислених форм індикаторів (метиленового синього і резорурфіну), в тих зонах середовища, де вони частково знебарвилися, а також під штрихом. Протягом експерименту редуктазна активність штаму *Bacillus* sp. BS-1 була вища, ніж у штаму *Bacillus* sp. BS-4 – різниця у зміні забарвлення зон становила 1–2 мм.

У другому експерименті зі штамми *Bacillus* sp. BS-1 і BS-4 на середовищі № 4 динаміка зміни ОВП була аналогічна. На четверту добу середовище у всіх варіантах з барвниками було безбарвне тільки під штрихами, а в зоні 1–3 мм від краю штриха був градієнт блакитного і рожевого кольору. На п'яту добу і далі редокс-активність обох штамів знижувалася, спостерігали появу яскравого забарвлення окислених форм індикаторів.

Під час росту *E. coli* 926 спостерігали аналогічну закономірність зниження ОВП, як і у випадку з бактеріями роду *Bacillus* (рис. 2, Г).

На другу добу зниження ОВП середовища до $E_h \leq -100$ мВ відбувалося під колоніями і в зоні 1–1,5 мм від їх краю, рожеві зони з $E_h \leq -50$ мВ становили 1–1,5 мм від краю безбарвної зони. Максимальну редуктазну активність спостерігали на третю добу – безбарвні і рожеві зони збільшилися до 2 мм. Зниження редуктазної активності ($E_h \geq -50$ мВ), спостерігали на п'яту добу за появою резорурфіну. Крім того, власне білі колонії також забарвлювалися в червоно-рожевий колір. Це можна пояснити такими факторами: 1) клітини поглинали резазурин і відновлювали його до лейкоформи, 2) у разі зниження метаболічної активності (стаціонарна фаза і фаза відмирання) E_h підвищувався, лейкорезорурфін зворотно переходив у резорурфін і клітини забарвлювалися. Аналогічні закономірності забарвлення клітин спостерігали в експериментах зі штамми *Bacillus* sp., починаючи з 7 доби росту (тривалість культивування становила 14 діб).

Загальною закономірністю зміни ОВП під час росту аеробних і анаеробних бактерій є те, що зміна ОВП корелює з їхньою метаболічною активністю. За допомогою індикаторів можна вимірювати редуктазну активність як аеробних, так і анаеробних бактерій. При візуально детектованих концентраціях індикатори метиленовий синій і резазурин не є токсичними для мікроорганізмів. На противагу, такий індикатор як бензилвіологен токсичний для мікроорганізмів у тих концентраціях, в яких його колір визначається візуально [11]. Метиленовий синій також використовують для мікроскопії як вітальний барвник у концентрації 1:1 000–1:10 000, тому що при більш високих концентраціях виявляється його бактерицидна дія. Тому необхідно враховувати чутливість досліджуваних штамів мікроорганізмів і до барвників, і до їх концентрацій.

ВИСНОВКИ

Створено шкалу з 12 барвників для кількісного вимірювання ОВП при рості культур мікроорганізмів у діапазоні від -30 до -420 мВ. Використання редокс-індикаторів дає змогу вимірювати швидкість зміни ОВП у культуральному середовищі, візуально визначати стереометричний (зональний) розподіл потенціалу в об'ємі рідкого

середовища і розподіл редокс-зон на поверхні агаризованого середовища. На прикладі росту воденьутворювальної асоціації *Bacillus* і *Clostridium* у рідкому середовищі показано стереометричне розподілення ОВП. Стереометрична конфігурація редокс-зон у товщі рідкого середовища визначається тим, що бактерії сорбуються на субстраті і локально знижують ОВП. Вік культури впливає на швидкість зниження ОВП. У разі використання одностодової культури швидкість зниження ОВП у рідкому середовищі вища у 2–3 рази, ніж під час використання тридодової. Під час росту аеробних і факультативно-анаеробних бактерій зниження ОВП на поверхні агаризованих середовищ до $E_h \leq -100$ мВ відбувається під штрихом або окремою колонією, а до $E_h \leq -50 \dots -90$ мВ – у зоні 4–9 мм від їх краю.

1. Другов Ю.С., Березкин В.Г. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха. М.: Химия, 1981, 256 с.
2. Дуда В.И. Obligatno anaerobnye bakterii: mnogoobraziye, klassifikatsiya, metody vydeleniya i kultivirovaniya. **Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов.** Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СРСР, 1978. С. 7–45.
3. Лурье Ю.Ю. **Справочник по аналитической химии.** М.: Химия, 1979. 480 с.
4. Матвеева Н.А., Левишко А.С., Притула И.Р. и др. Образование молекулярного водорода ассоциацией спорообразующих микроорганизмов. **Мікробіол. журнал**, 2011; 73(1): 36–43.
5. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. **Экспериментальная микробиология** (Теория и практика). М.: Мир, 1967, 348 с.
6. Работнова И.Л. **Роль физико-химических условий (рН и gH_2) в жизнедеятельности микроорганизмов.** М.: Изд-во АН СССР, 1957, 275 с.
7. **Современная микробиология. Прокариоты:** в 2 т. / под. ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 1, 656 с.
8. Таширев А.Б., Радченко О.С., Галингер Э.В. Рост *Escherichia coli* в сильно восстановленной среде. **Химия и технология воды**, 1992; 14(6): 458–464.
9. Таширев А.Б. Способ стерилизации титана(III) автоклавированием в бескислородной атмосфере. **Мікробіологія**, 1988; 57(1): 159–161.
10. Чернышенко Д.В., Данько Я.Н., Таширев А.Б. и др. Культиватор для изучения ростовых процессов анаэробных микроорганизмов. **Мікробіол. журнал**, 1990; 52(6): 90–92.
11. Jacob H.-E. Redox Potential. **Methods in Microbiology**, 1970; 2: 91–123.
12. Hungate R. E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. **Methods in Microbiol.** 1969; 3B: 117–132.
13. Tran H. T. M., Cheirsilp B., Hodgson B., Umsakul K. Potential use of *Bacillus subtilis* in a co-culture with *Clostridium butylicum* for acetone-butanol-ethanol production from cassava starch. **Biochemical Engineering Journal**, 2010; 48(2): 260–267.

APPLICATION OF REDOX INDICATORS FOR MEASURING REDOX POTENTIAL IN GROWING CULTURES OF MICROORGANISMS

I. R. Prytula, O. B. Tashyrev

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv 03680, Ukraine
e-mail: ivanprytula@ukr.net

A colorimetric method for quantitative measurement of the oxidation/reduction potential (ORP) in liquid and agar media was developed. The range of 12 dyes (redox indicators) to measure the ORP in growing cultures in the range from -30 to -420 mV was

established. The method allows measuring the rate of ORP decrease without depressurizing the cultivator in a liquid medium, and stereometric characterize the distribution of redox zones in liquid or agar media. A possibility of using two dyes to determine the rate of ORP change in the growing culture of hydrogen-producing bacteria, two strains of genus *Bacillus* and *Escherichia coli* 926 (ATCC 8789) was shown. Stereometric configuration of redox zones in the layer of liquid medium is determined that bacteria sorbed on the substrate and locally decrease the ORP. Culture's age affects the speed of ORP decrease. At using of 1-day culture, the speed of ORP decrease in liquid medium was 2–3 times higher than at using 3-day culture. During growth of aerobic and facultative anaerobic bacteria, ORP decreased on the surface of agar media to $E_h \leq -100$ mV under the streak or colony, and to $E_h \leq -50...-90$ mV – in the area of 4–9 mm from the edge of streak or colony.

Keywords: redox potential, dyes-indicators, ORP scale, growing microbial cultures.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕДОКС-ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА В РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ МИКРООРГАНИЗМОВ

І. Р. Притула, А. Б. Таширев

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАНУ
ул. Академика Заболотного, 154, Киев 03680, Украина
e-mail: ivanprytula@ukr.net*

Разработан количественный метод колориметрического измерения окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) в жидких и агаризованных средах. Создана шкала из 12 красителей (редокс-индикаторов) для измерения ОВП в растущих культурах в диапазоне от -30 до -420 мВ. Метод позволяет измерять скорость снижения ОВП без разгерметизации культиватора в жидкой среде, а также охарактеризовать стереометрическое распределение редокс-зон в жидкой или агаризованной средах. Показана возможность использования двух красителей для определения скорости изменения ОВП на примере растущей культуры водородсинтезирующих бактерий, двух штаммов рода *Bacillus* и штамма *Escherichia coli* 926 (ATCC 8789). Стереометрическая конфигурация редокс-зон в толще жидкой среды определяется тем, что бактерии сорбируются на субстрате и локально снижают ОВП. Возраст культуры влияет на скорость снижения ОВП. При использовании односуточной растущей культуры скорость снижения ОВП в жидкой среде выше в 2–3 раза, чем при использовании трёхсуточной. При росте аэробных и факультативно-анаэробных бактерий снижение ОВП на поверхности агаризованных сред до $E_h \leq -100$ мВ происходит под штрихом или отдельной колонией, а до $E_h \leq -50...-90$ мВ – в зоне 4–9 мм от их края.

Ключевые слова: окислительно-восстановительный потенциал, красители-индикаторы, шкала измерения ОВП, растущие культуры микроорганизмов.

Одержано: 02.07.2013