

БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 628.356+574.64

А. В. Игнатенко

Белорусский государственный технологический университет

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД МЕТОДОМ РЕДУКТАЗНОЙ ПРОБЫ

В работе рассмотрена возможность использования редуктазной пробы (РП) для биотестирования токсичности водных сред. В качестве тест-объектов служила естественная микрофлора сточных вод, микроорганизмы активного ила (АИ), а также тест-культуры бактерий *E. coli* и *B. subtilis*.

Редуктазную активность клеток оценивали путем визуального контроля времени обесцвечивания красителя метиленового синего (МС), а также определяя скорость обесцвечивания красителя на длине волны 660 нм в оптическом варианте РП (ОРП).

Сравнение результатов РП для разных тест-объектов показало, что использование тест-культур бактерий дает более воспроизводимые показания и высокую чувствительность к токсичным веществам, чем естественная микрофлора сточных вод.

Отмечена связь между временем обесцвечивания МС в РП и скоростью данного процесса, позволяющая устранить недостатки визуальной РП и сократить длительность анализа токсичности среды до 10 мин в ОРП.

Показано, что зависимость индекса токсичности водной среды от концентрации антибиотика тилозина и ионов Cd^{2+} описывается уравнением Хилла. Результаты оценки токсичности ионов Cd^{2+} для клеток *B. subtilis* по данным ОРП хорошо коррелируют с методом биокалориметрии.

Ключевые слова: антибиотик тилозин, ионы кадмия, токсичность, биотестирование, тест-культуры бактерий, редуктазная проба, метиленовый синий, время и скорость обесцвечивания, индекс токсичности, сточные воды.

A. V. Ignatenko

Belarusian State Technological University

BIOTESTING OF WATER MEDIA TOXICITY BY METHOD OF REDUCTASE PROBE

It was described the opportunity to use a reductase probe (RP) for biotesting toxicity of water media. As test-objects it was served natural microorganisms of waste water, microorganisms of active sludge and bacterial test-cultures *E. coli* and *B. subtilis*.

Reductase activity of cells estimated by visual testing of time discolouring of methylene blue dye (MB), and velocity of dye discolouring at length wave 660 nm in optic variant of RP (ORP).

Comparison of different test-objects in RP showed that usage of bacterial test-cultures gives more reliable results and more sensitive to toxic substances.

It was established a connection between velocity and time of MB discolouring that let it possible to eliminate disadvantages of RP and decrease a time of analyses of toxicity till 10 min in ORP.

It was shown that dependence of toxicity index of water media from concentration of antibiotic tylosin and Cd^{2+} ions is described by Hill equation. Results of Cd^{2+} toxicity testing received on ORP data for cells of *B. subtilis* well correlate with biocalorimetric method.

Key words: tylosin antibiotic, cadmium ions, toxicity, biotesting, bacterial test-cultures, reductase probe, methylene blue, time and velocity of discolouring, toxicity index, motility, waste waters.

Введение. Быстрое и эффективное обнаружение ингибирующих и токсичных веществ в водных и биологических средах, сельскохозяйственном сырье и пищевых продуктах является одной из актуальных задач для медицины, пищевых и

перерабатывающих предприятий, работы очистных сооружений и охраны окружающей среды.

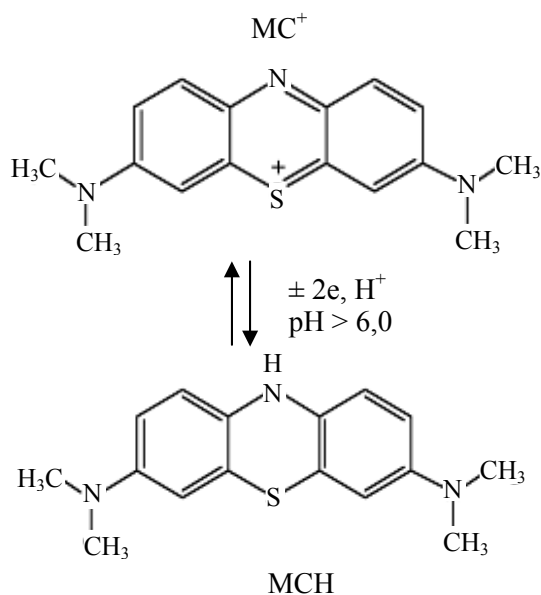
Биотестирование рассматривается как простой и эффективный способ обнаружения опасных веществ в водных средах. Одной из разно-

видностей метода биотестирования является редуцтазная проба (РП). Она основана на способности дегидрогеназ живых клеток быстро восстанавливать окисленную форму редокс-красителя, а также на визуальном наблюдении за его обесцвечиванием или изменением цвета. Дегидрогеназы высокочувствительны к действию ингибирующих и токсичных веществ, и их повреждение приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов и гибели клеток.

Благодаря простоте, а также отсутствию необходимости в средствах измерений РП нашла широкое применение в биологии и медицине для анализа жизнеспособности и активности клеток, а также используется для оценки санитарно-гигиенических условий производства, ускоренного определения общей бактериальной загрязненности молока и обнаружения в нем ингибирующих веществ [1, 2].

В качестве редокс-веществ в РП используются метиленовый синий (МС), резазурин, тетразолиевый синий и другие красители. МС является одним из наиболее распространенных и часто используемых редокс-веществ. Он относится к классу фенотиазиновых красителей и применяется в медицине как антимикробное средство и для лечения целого ряда заболеваний [3].

Молекулы МС способны принимать и отдавать электроны и протоны, переходя в различные промежуточные формы, каждая из которых отличается своими спектральными свойствами. Под действием O_2 воздуха, растворенного в водных средах, МС окисляется и находится преимущественно в форме катион-радикала MC^+ , имеющего максимум полосы поглощения при 660 нм [4].



В восстановительной среде MC^+ превращается в бесцветную лейкоформу (MCH).

В присутствии клеток, обладающих дегидрогеназной активностью, восстановление MC^+ тем быстрее, чем больше живых микроорганизмов и выше их активность. Механизм данного процесса остается до конца не изученным. Предполагается, что из-за наличия заряда и относительно большого размера молекулы окисленная форма MC^+ не попадает в живые клетки бактерий, и восстановление красителя протекает на поверхности бактоплазматической мембраны или в периплазматическом пространстве клеток.

Для неживых микроорганизмов МС проникает в клетки и окрашивает их в синий цвет, что используется для быстрой оценки жизнеспособности и гибели клеток.

В условиях отсутствия ингибирующих и токсичных веществ скорость обесцвечивания МС коррелирует с общим содержанием живых микроорганизмов в среде. Это легло в основу контроля санитарно-гигиенических условий производства молока и определения его сортности по времени визуальной оценки обесцвечивания редокс-красителя.

РП позволяет определять высококачественное молоко, содержащее 10^5 кл/мл, с помощью МС за 5 ч, а несортное молоко с содержанием $4 \cdot 10^6$ кл/мл и более в течение 0,5 ч.

Для сокращения длительности РП вместо МС было предложено использовать резазурин, имеющий более высокий окислительно-восстановительный потенциал и позволяющий определять высокое качество молока в течение 1,5 ч [2].

Среди недостатков РП наряду с субъективностью контроля конечного времени обесцвечивания красителя установлена ее сильная зависимость от условий внешней среды, видового состава микроорганизмов, а также присутствия ингибирующих и биоцидных веществ, что снижает корреляцию между общим содержанием клеток и временем обесцвечивания редокс-красителя.

Сравнение показаний численности микроорганизмов, найденных методами посева, РП и биокалориметрии, в условиях загрязнения молока ксенобиотиками показало, что коэффициент корреляции между ними изменяется от 0,93 до 0,50. Метод РП с резазурином уступал биокалориметрии по длительности анализа и чувствительности к пенициллину, окситетрациклину, перекиси водорода [5, 6].

Для расширения возможности использования РП был предложен вариант ОРП, основанный на двух длинах волн наблюдений при 660 нм и 730 нм для одновременной оценки редуцтазной и ростовой активности микроорганизмов [7]. Данный метод был использован для наблюдения развития микроорганизмов как в свободном, так и иммобилизованном состоянии, а также для изучения влияния биоцидных веществ на микроорганизмы в составе биопленок [8].

Метод ОРП позволил выявлять живые клетки, потерявшие способность размножаться, подбирать биоцидные вещества и оценивать эффективность их действия на микроорганизмы в водной среде и в составе биопленок.

Р. Варат с сотрудниками [9] был разработан оптико-редуктазный тест с МС (МСРТ) для оценки общего содержания активных бактерий. Дальнейшим развитием метода МСРТ было его использование для определения антибиотиков и витаминов в жидких средах [10].

В работах [11, 12] предложены метод и устройство для контроля скорости обесцвечивания МС микроорганизмами активного ила (АИ) и проведены исследования, показавшие перспективность использования оптического варианта РП для анализа состояния АИ и оценки качества очистки сточных вод (СВ).

Вместе с тем остается нерешенным вопрос о влиянии токсичных веществ на показания РП. Особенностью СВ, как объекта исследования, является их высокая загрязненность естественной микрофлорой, взвешенными веществами, которые способны адсорбировать редокс-красители и влиять на показания РП, а также присутствие в СВ широкого спектра ингибирующих и токсичных веществ.

В случае действия токсичных веществ клетки тест-культуры погибают и на процесс обесцвечивания красителя накладывается процесс гибели клеток, что влияет на показания РП.

Основная часть. Целью данной работы было обоснование возможности использования редуктазной пробы с МС для биотестирования токсичности водных сред.

В качестве объектов для биотестирования методом РП служили сточные воды Минской очистной станции, взятые после первичного отстаивания; микроорганизмы АИ, отобранного в первой секции аэротенка, а также суточные тест-культуры клеток *E. coli* F52, *B. subtilis* 162 из коллекции кафедр биотехнологии и биоэкологии, обладающие высокой редуктазной активностью.

В работе использовали редокс-краситель МС (реахим, РБ) в концентрации 0,01%. В качестве токсичных веществ для тест-культур микроорганизмов служили растворы антибиотика тилозина тартрата (УП «Минский завод ветеринарных препаратов», РБ) и соль $CdCl_2$ (х. ч.), которые добавляли в концентрациях 0,001–10 мкг/мл.

Взвешенные частицы сточных вод удаляли фильтрованием через бумажный фильтр. Фильтрат использовали для оценки редуктазной активности естественной микрофлоры СВ. Далее его пропускали через микропористые капроновые мембраны (Хику Калур, Эстония) с диаметром пор 0,2 мкм для устранения влияния естественной микрофлоры.

Затем к образцам СВ с удаленной микрофлорой добавляли микроорганизмы АИ или суточные тест-культуры бактерий и анализировали показания редуктазной пробы. Все измерения проводили при $pH 7,0 \pm 0,1$ и $(30 \pm 1)^\circ C$.

Для устранения влияния численности микроорганизмов на результаты биотестирования в различных вариантах предварительно выравнивали тепловыделение клеток разведением в фосфатном буфере. Мощностное тепловыделение микроорганизмов регистрировали на микрокалориметре МКМ-Ц [13].

В методе РП использовали естественную микрофлору СВ, АИ или чистые культуры бактерий в ПБ при соотношении СВ : МС : клетки, равном 8 : 1 : 1. Контрольную пробу готовили, используя вместо СВ фосфатный буфер. Пробирки закрывали пробками, ставили на водяную баню и регистрировали время, а также скорость обесцвечивания МС по изменению доли окисленной формы красителя (y):

$$y = (D_t / D_0)_{660}, \quad (1)$$

где D_0 , D_t оптическая плотность MC^+ в начальный и текущий момент времени в максимуме полосы поглощения красителя при 660 нм. Оптическую плотность растворов регистрировали в закрытых термостатированных кюветах на спектрофотометре СФ-26.

Влияние токсичных веществ на показания РП оценивали по скорости обесцвечивания красителя МС в контрольной пробе и в присутствии токсичных веществ.

$$V = dy / dt. \quad (2)$$

Индекс токсичности водных сред определяли с помощью РП по формуле

$$T_1 = (t - t_k) / t \cdot 100\%, \quad (3)$$

где t , t_k – время обесцвечивания МС в присутствии токсичных веществ и в контрольной пробе.

В оптическом варианте РП (ОРП) индекс токсичности находили по формуле

$$T_2 = (V_k - V) / V_k \cdot 100\%, \quad (4)$$

где V_k , V – показатели скорости обесцвечивания красителя MC^+ в контрольной пробе и в пробе с токсичными веществами.

Для контроля результатов ОРП их сравнивали с показателем T_3 :

$$T_3 = (P_k - P) / P_k \cdot 100\%, \quad (5)$$

где P_k , P – тепловыделение клеток в образцах без токсичных веществ и с ними, определенное методом биокалориметрии [13].

Полученные данные обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Результаты РП зависят от содержания микроорганизмов в водной среде (рис. 1). Как показано на рис. 1, время обесцвечивания красителя МС увеличивается с уменьшением численности живых клеток.

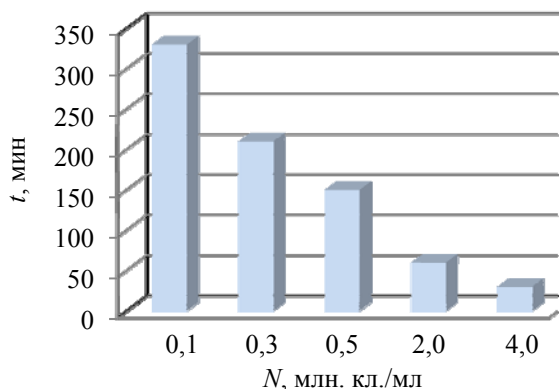


Рис. 1. Время обесцвечивания красителя МС в зависимости от концентрации клеток *E. coli*

Это следует учитывать при работе с ксенобиотиками, вызывающими гибель микроорганизмов.

Кроме того, в условиях увеличения длительности измерений возможно влияние размножения клеток на показания РП. В этой связи для сокращения времени анализа содержание бактерий подбирали в диапазоне 10^6 – 10^8 кл/мл и поддерживали на постоянном уровне за счет использования минимальной питательной среды, полученной разведением ПБ (1 : 10). Контроль за изменением численности микроорганизмов проводили по показателю светорассеивания клеток D_{730} .

Для обнаружения токсичных веществ в СВ с помощью РП можно использовать как естественную микрофлору СВ, АИ, так и тест-культуры отобранных микроорганизмов. На рис. 2 приведены результаты анализа времени обесцвечивания МС⁺ в изученных вариантах.

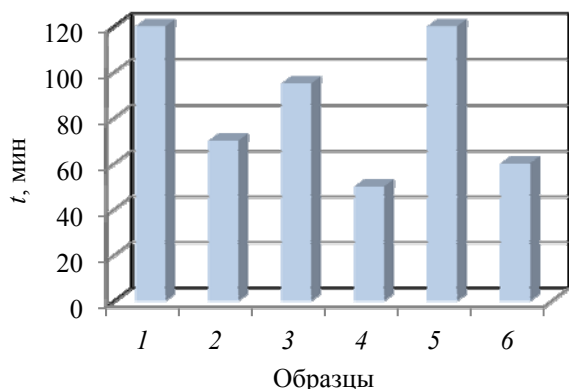


Рис. 2. Время обесцвечивания красителя МС в образцах СВ с добавкой Cd^{2+} (0,1 мкг/мл): 1, 2 – естественная микрофлора в СВ и ПБ; 3, 4 – АИ в СВ и ПБ; 5, 6 – *B. subtilis* в СВ и ПБ

При сравнении контрольных образцов в ПБ (рис. 2, 2, 4, 6) видно, что редуцтанная активность АИ выше, чем микрофлоры СВ и тест-культуры. Это может быть связано с разным видовым составом клеток и адсорбцией МС на флоккулах АИ.

При сопоставлении показаний биотестирования СВ (рис. 2, 1, 3, 5) индекс токсичности (T_1), по данным РП, составил для естественной микрофлоры – 44,0%, для АИ – 47,3%, для тест-культуры *B. subtilis* – 53,8%. В условиях одинакового тепловыделения образцов наблюдаемая разбежка показаний РП может быть связана с разными сорбционными свойствами и чувствительностью клеток к загрязняющим веществам.

Непостоянство видового состава микроорганизмов СВ, АИ, а также возможность их адаптации к токсичным веществам указывают на целесообразность использования тест-культур бактерий.

Оценка времени обесцвечивания красителя в РП имеет ряд недостатков, связанных с увеличением длительности анализа с ростом содержания токсичных веществ (рис. 3), субъективностью контроля конечной точки обесцвечивания.

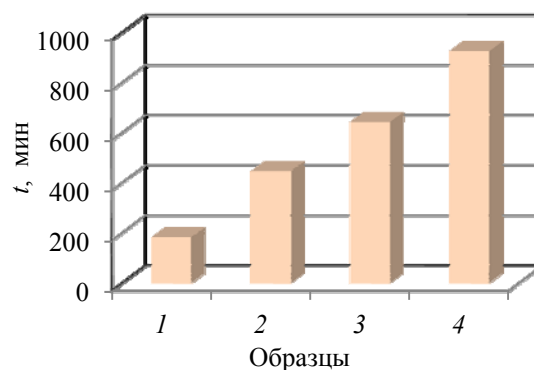


Рис. 3. Время обесцвечивания образцов сточных вод с Cd^{2+} : 1 – контроль; 2 – 10^{-7} М; 3 – 10^{-6} М; 4 – 10^{-5} М

Вместе с тем величина, обратная времени обесцвечивания МС ($1/t$), зависит от N линейно (рис. 4) в диапазоне 10^5 – 10^7 кл/мл.

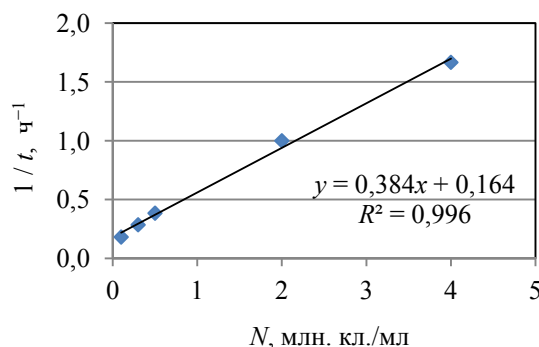


Рис. 4. Зависимость показателя скорости обесцвечивания МС от концентрации клеток *E. coli* при обесцвечивании редокс-красителя МС

Тангенс угла наклона данной зависимости характеризует эффективную константу скорости (k) обесцвечивания MC^+ :

$$k = k_0 \cdot N, \quad (6)$$

где k_0 – удельная константа скорости обесцвечивания MC^+ ; N – концентрация микроорганизмов.

Достоинством использования скорости вместо времени обесцвечивания красителя является сокращение длительности РП, особенно в условиях действия токсикантов, вызывающих гибель клеток и увеличивающих время анализа (рис. 3).

На рис. 5 приведена кинетика обесцвечивания MC^+ в методе ОРП в присутствии ионов Cd^{2+} .

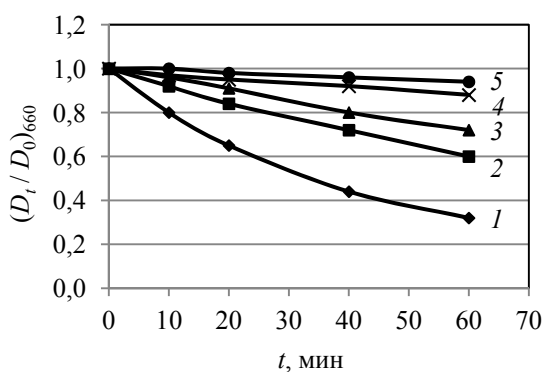


Рис. 5. Кинетика обесцвечивания MC^+ в присутствии Cd^{2+} :
1 – контроль; 2 – 0,1 мкг/мл; 3 – 1,0 мкг/мл;
4 – 5,0 мкг/мл; 5 – 10,0 мкг/мл

Кинетика обесцвечивания красителя в отсутствие токсичных веществ (рис. 5, 1) показывает, что изменение концентрации MC^+ описывается уравнением первого порядка:

$$C = C_0 \cdot \exp(-k \cdot t), \quad (7)$$

где C_0 , C – начальная и текущая концентрации MC^+ ; k – эффективная константа скорости обесцвечивания MC^+ .

Величина k может быть найдена из кинетической зависимости (7) при ее преобразовании в полупологарифмических координатах $\ln C$ от t .

Данная величина связана с временем обесцвечивания красителя – t_0 , при котором $C = A$ (визуальный порог обнаружения синего цвета)

$$k = \ln A / t_0. \quad (8)$$

На рис. 6 приведена зависимость относительной скорости обесцвечивания MC^+ от логарифма концентрации ионов Cd^{2+} для клеток *B. subtilis*.

Зависимость носит сигмоидный характер и может быть описана уравнением Хилла [14]:

$$V = V_m \cdot \frac{(C / C_{0,5})^h}{(1 + (C / C_{0,5})^h)}, \quad (9)$$

где V , V_m – скорости обесцвечивания MC в образце и контроле; C_t – концентрация токсичных веществ; $C_{0,5}$ – концентрация токсиканта, при которой $V = V_m / 2$; h – коэффициент Хилла.

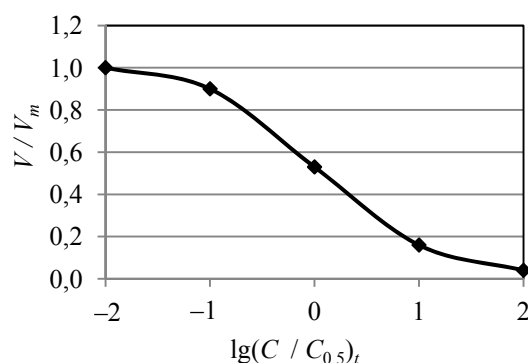


Рис. 6. Изменение относительной величины скорости обесцвечивания MC клетками *B. subtilis* от логарифма концентрации Cd^{2+}

На рис. 7 приведены зависимости изменения индексов токсичности T_1 , T_2 , T_3 от $\lg C_t$ тилозина и ионов Cd^{2+} для клеток *B. subtilis*, полученные методом ОРП и биокалориметрии.

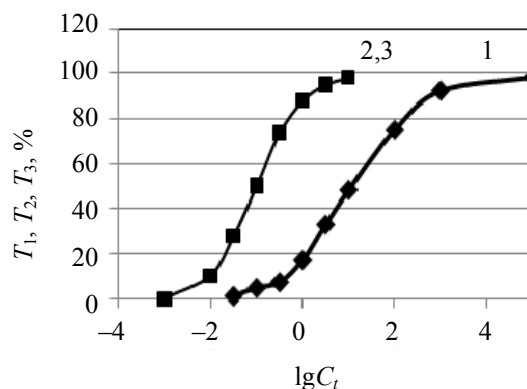


Рис. 7. Изменение индексов токсичности T_1 , T_2 , T_3 от $\lg C_t$ веществ (мкг/мл) для клеток *B. subtilis*:
1 – тилозин; 2, 3 – Cd^{2+} , $t = 10$ мин

Обработка полученных результатов с использованием уравнения Хилла дала следующие показатели токсичности, приведенные в таблице.

Показатели токсичности веществ для *B. subtilis*, полученные методами ОРП и биокалориметрии

Вещество	Методы контроля	Показатели токсичности веществ			
		h	$C_{0,5}$, мкг/мл	$C_{0,1}$, мкг/мл	ПДК, мкг/мл
Тилозин	ОРП	0,67	14,0	0,31	1,0
Cd^{2+}	ОРП	0,95	0,12	0,01	5,0
Cd^{2+}	Биокалориметрия	0,93	0,11	0,01	

Из таблицы следует, что чем больше величина h и меньше показатели $C_{0,5}$, $C_{0,1}$, тем токсичнее вещество.

Тест-культура *B. subtilis* проявляет большую чувствительность к ионам Cd^{2+} , чем к антибиоту тилозину.

Метод ОРП позволяет регистрировать присутствие тилозина и ионов кадмия в водных средах в концентрациях ниже уровня их ПДК.

Показатели токсичности для Cd^{2+} , найденные методами ОРП и биокалориметрии, практически совпадают.

Заключение. В результате проведенной работы показано, что присутствие токсичных веществ в водных средах существенно влияет на показания РП и необратимо снижает редуктазную активность клеток.

Метод РП может быть использован для обнаружения токсичных веществ в водных средах как с помощью естественной микрофлоры, так и с помощью тест-культур бактерий. Однако АИ и естественная микрофлора СВ адаптированы к загрязнителям, а также имеют непостоянный состав микроорганизмов, влияющий на стабильность показаний РП, поэтому целесообразнее использовать тест-культуры клеток.

Для определения ингибирующих и токсичных веществ в СВ могут применяться визуальный и оптический варианты редуктазной пробы.

Время обесцвечивания МС – недостаточно удобный показатель для обнаружения присут-

ствия токсичных веществ из-за увеличивающейся длительности анализа с ростом содержания ксенобиотиков в водных средах.

В работе рассмотрен способ оценки токсичности водных сред с помощью оптического варианта РП. Он основан на регистрации скорости обесцвечивания красителя МС, наблюдаемой при 660 нм и контроле за изменением численности жизнеспособных клеток при 730 нм.

Показано, что уровень токсичности СВ может быть определен по формулам (3)–(5).

Скорость обесцвечивания МС в присутствии токсичных веществ в водных средах хорошо описывается уравнением Хилла.

Метод ОРП позволяет регистрировать в течение 10 мин присутствие антибиотика тилозина и ионов кадмия в водных средах в концентрациях ниже уровня их ПДК.

Результаты ОРП с тест-культурой *B. subtilis* хорошо коррелируют с данными оценки токсичности ионов Cd^{2+} , полученными методом биокалориметрии.

Использование метода ОРП для оценки токсичности водных сред имеет ряд преимуществ перед другими методами анализа. К их числу относятся: экспрессность, низкая трудоемкость измерений, достаточно высокая чувствительность и производительность анализа, что позволяет использовать данный метод для контроля токсичности и детоксикации сточных вод на очистных сооружениях.

Литература

1. Молоко. Методы определения ингибирующих веществ: ГОСТ 23454-2016. Введ. 01.09.2017. М.: Стандартинформ, 2016. 15 с.
2. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа: ГОСТ 9225-84. Введ. 01.01.86. М.: Стандартинформ, 2009. 16 с.
3. Oz M., Lorke D. E., Hasan M., Petrolanu G. A. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system // *Medical Research Review*. 2011. Vol. 31, no 1. P. 93–117.
4. Теренин А. Н. Фотоника молекул красителей. Л.: Наука, 1967. 616 с.
5. Игнатенко А. В. Микрокалориметрическое исследование влияния ингибирующих веществ на молочнокислые бактерии // *Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология органических веществ*. 2000. Вып. VIII. С. 238–243.
6. Игнатенко А. В. Экспресс-определение общего количества микроорганизмов в молоке и молочных продуктах // *Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология органических веществ*, 2002. Вып. X. С. 15–17.
7. Михайчик Н. И., Игнатенко А. В. Анализ влияния ксенобиотиков на ростовую и биохимическую активность клеток бактерий // *Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология органических веществ*, 2007. Вып. XV. С. 216–220.
8. Игнатенко А. В. Изучение образования биопленок бактерий и оценка их устойчивости к биоцидам // *Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология органических веществ*. 2008. Вып. XVI. С. 173–176.
9. Bapat P., Nandy S. K., Wangikar P. Venkatesh K. V. Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): Measurement of CFU in about 200 s. // *J. Microbiol. Methods*. 2006. Vol. 65, no 1. P. 107–116.
10. Nandy S. K., Venkatesh K. V. Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms // *African j. of Microbiol. Research*. 2010. Vol. 4, no 1. P. 61–70.
11. Разработка нового метода оценки ферментативной окислительной способности активного ила / П. А. Тупин [и др.] // *Известия вузов. Лесной журнал*. 2010. № 3. С. 119–124.

12. Определение окислительной способности микроорганизмов биоплёнки активного ила очистных сооружений / Д. Г. Чухчин [и др.] // Биотехнологии в химико-лесном комплексе. 2014. С. 329–333.
13. Игнатенко А. В., Гриц Н. В. Микробиологические, органолептические и визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия. Лабораторный практикум. Минск: БГТУ, 2003. 114 с.
14. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. 277 с.

References

1. GOST 23454. Milk. Methods for determination of the inhibitors. Moscow, Standartinform Publ., 2016. 15 p. (In Russian).
2. GOST 9225. Milk and milk products. Methods of microbiological analysis. Moscow, Standartinform Publ., 2009. 16 p. (In Russian).
3. Oz M., Lorke D. E., Hasan M., Petrolanu G. A. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Medical Research Review*, 2011, vol. 31, no 1, pp. 93–117.
4. Terenin A. N. *Fotonika molekul krasiteley* [Photonics of dyes molecules]. Leningrad, Nauka Publ., 1967. 616 p.
5. Ignatenko A. V. Microcalorimetric study of the effect of inhibiting substances on lactic acid bacteria // *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series IV, Chemistry and Technology of Organic Substances, 2000, issue VIII, pp. 238–243 (In Russian).
6. Ignatenko A. V. Express determination of the total number of microorganisms in milk and dairy products // *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series IV, Chemistry and Technology of Organic Substances, 2002, issue X, pp. 15–17 (In Russian).
7. Michaychik N. I., Ignatenko A. V. Analysis of the effect of xenobiotics on the growth and biochemical activity of bacterial cells // *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series IV, Chemistry and Technology of Organic Substances, 2007, issue XV, pp. 216–220 (In Russian).
8. Ignatenko A. V. Study of bacterial biofilms formation and assessing of their resistance to biocides // *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series IV, Chemistry and Technology of Organic Substances, 2008, issue XVI, pp. 173–176 (In Russian).
9. Bapat P., Nandy S. K., Wangikar P., Venkatesh K. V. Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): Measurement of CFU in about 200 s. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, vol. 65, no 1, pp. 107–116.
10. Nandy S. K., Venkatesh K. V. Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms. *African journal of Microbiological Research*, 2010, vol. 4, no 1, pp. 61–70.
11. Tupin P. A., Chukhnin D. G., Novozhilov Ye. V., Sokolov O. M. Development of a new method for assessing the enzymatic oxidative ability of activated sludge. *Izvestiya vyzov. Lesnoy zhurnal* [News universities. Forest journal], 2010, no 3, pp. 119–124 (In Russian).
12. Chukhchin D. G., Churkina Yu. V., Rudakova V. A., Varakin Ye. A., Khalina Ye. V. Determination of the oxidizing ability of microorganisms in the biofilm of activated sludge of treatment facilities. *Biotehnologii v khimiko-lesnom komplekse* [Biotechnology in the chemical-forest complex], 2014, pp. 329–333 (In Russian).
13. Ignatenko A. V., Grits N. V. *Mikrobiologicheskiye, organolepticheskiye i vizual'nyye metody kontrolya kachestva pishchevych tovarov. Mikrokalorimetriya. Laboratornyy praktikum* [Microbiological, organoleptic and visual methods of foodstuffs quality control. Microcalorimetry. Laboratory manual]. Minsk, BGTU Publ., 2003. 114 p.
14. Kornish-Bouden E. *Osnovy fermentativnoy kinetiki* [Bases of enzymatic kinetics]. Moscow, Mir Publ., 1979. 277 p.

Информация об авторе

Игнатенко Аркадий Васильевич – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatenko_av @tut.by

Information about the author

Ignatenko Arkadiy Vasil'yevich – PhD (Biology), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatenko_av@tut.by

Поступила 26.03.2018