

INNOVATIVE BIOSYSTEMS AND BIOENGINEERING

International scientific e-journal

Vol.2 · No.2

2018

Founded in November, 2017

Editor-in-chief –
Alexey Dugan

Deputy editor-in-chief –
Alexander Galkin

In the issue:

Applied Biology

Biomedicine

Biotechnology and
Bioengineering

Biophysics and
Bioinformatics

Editorial office:
building 4, Av. Peremogy, 37,
Kyiv, 03056,
National Technical University of Ukraine
“Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”

E-mail: ibb@kpi.ua
<http://ibb.kpi.ua>

Founder – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”

Advised by Academic Council of National Technical University of Ukraine
"Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Protocol No. 6, on June 04, 2018
Published on June 25, 2018

Editorial Board in Applied Biology

Larysa Bondarenko (Ukraine), Alexander Galkin (Ukraine), Yuri Gorgo (Ukraine), Elena Kashuba (Sweden), Irina Leneva (Russia), Olga Limanskaya (Ukraine), Ievgen Nastenکو (Ukraine), Rustem Omarov (Kazakhstan), Vladimir Shkumatov (Belarus), Victoria Tsygankova (Ukraine), Alexander Yermishin (Belarus)

Editorial Board in Biomedicine

Ivars Kalvinsh (Latvia), Elena Kashuba (Sweden), Vitaliy Maksymenko (Ukraine), Ievgen Nastenکو (Ukraine), Svetlana Rybalko (Ukraine), Vladimir Shirobokov (Ukraine), Vladimir Shkumatov (Belarus), Walery Zukow (Poland)

Editorial Board in Biotechnology and Bioengineering

Svitlana Gorobets (Ukraine), Elena Karpenko (Ukraine), Grzegorz Łagód (Poland), Belur Prasanna (India), Henryk Sobczuk (Poland), Oleksandr Tashyrev (Ukraine), Tetiana Todosiichuk (Ukraine)

Editorial Board in Physics of Biological Systems and Bioinformatics

Ol'ha Brovarets (Ukraine), Marcelli Koralewski (Poland), Oksana Gorobets (Ukraine), Svitlana Gorobets (Ukraine), Ievgen Nastenکو (Ukraine), Alexander Ogurtsov (Ukraine), Vincenzo Valenzi (Italy), Vitalii Zablotskii (Czech Republic)

Editorial Board in Chemistry of Biological Systems

Natalia Golub (Ukraine), Ivars Kalvinsh (Latvia), Elena Karpenko (Ukraine), Yevgeniy Kuzminskiy (Ukraine), Belur Prasanna (India), Victoria Tsygankova (Ukraine), Vladimir Shkumatov (Belarus)

Table of Contents

Nikolov N., Visone R., Nesteruk I., Rasponi M., Redaelli A. A New Algorithm to Analyze the Video Data of Cell Contractions in Microfluidic Platforms....	74
Umanets V.S., Voynik B.A., Pavlov V.A., Nastenko Ie.A. Estimation of Algorithms Efficiency in the Task of Biological Objects Clustering.....	84
Gorobets S.V., Kravchenko O.V., Bulaievska M.O., Panchenko O.S. Bionformation Detection of Magnetic Nanoparticles Producers Among Iron- and Manganese-Oxidizing Bacteria.....	90
Levchyk N.Y., Liubinska A.V., Herasymenko Y.O., Todosiichuk T.S. Specific Activity of <i>Streptomyces albus</i> Preparations for Bioregulation of Cucumber Plant	98
Shtapenko O.V., Hevkan I.I., Slyvchuk Yu.I., Syrvatka V.Y., Matvienko N.M. Formation and Properties Polymer Nanolayers to Enhance Cell Growth <i>in vitro</i>	105
Misyura A.G., Ushiy L.I., Mamilov S.A. Crystal Formation in the Facies of Oral Fluid Their Cycles of Hydration and Degradation	110
Semenyuk S.M., Shybetsky V.Yu., Povodzinsky V.M., Kostyk S.I. Assessment of Critical Parameters of the Cultivating Process in Biotechnology of Active Pharmaceutical Ingredients.....	118
Golub N.B., Potapova M.V. Modern Methods of Processing and Utilization of Grain Distillery Spent Wash.....	125
Petrusha Yu.Yu., Rylsky O.F., Gvozdyak P.I. Some of the Important Physical and Chemical Properties of a Number of Mineral Waters Widely used in Everyday Life.....	135

A NEW ALGORITHM TO ANALYZE THE VIDEO DATA OF CELL CONTRACTIONS IN MICROFLUIDIC PLATFORMS

N. Nikolov^{1*}, R. Visone², I. Nesteruk^{1,3}, M. Rasponi², A. Redaelli²

¹Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

²Politecnico di Milano, Milan, Italy

³Institute of Hydromechanics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

*Corresponding author: nikolka_@ukr.net

Received 11 April 2018; Accepted 11 May 2018

Background. One of the rapidly developing trends in science is tissue engineering with use of microfluidic platform (MP) technology. To evaluate mechanical contraction of cells, optical microscopy recordings can be used. Known methods as a matter of fact substantially distort the shape and amplitude of the signal. Therefore, a modified approach is mandatory.

Objective. The development of an algorithm for the analysis of the video data of mechanical oscillations of cardiomyocytes on a microfluidic platform in order to determine their functional and structural properties at the tissue level.

Methods. The developed algorithm for the analysis of video images was implemented by the original program code in Matlab 2016. We analyzed the data of the cardiomyocyte contraction in cells cultured in MPs. Three groups of cells were analyzed: without stimulation and stimulated with electric fields of 5 and 25 V/cm. The form of the stimulating impulses is rectangular, the frequency is 1 Hz.

Results. An algorithm for the video data analysis is proposed, which allows for estimating the rate of contraction in $\mu\text{m/s}$. Moreover, it allows for decomposing the mechanical oscillations of cells into components. The algorithm has been used to evaluate the change in the contraction rate of cardiomyocytes cultured in a lab-on-chip, as a function of voltage intensity and excitation frequency under different experimental conditions.

Conclusions. The proposed method does not require any auxiliary biomarkers or media. Analysis of video images allows us to estimate the amplitude and rate of oscillations, the shape of the signal, the spatial heterogeneity distribution of the mechanical activity of cells. Our results show that the pulsed electric field in the range 5–25 V/cm at frequencies of 1 Hz during cell cultivation affects negatively the mechanical functional abilities of cardiomyocytes.

Keywords: cardiomyocyte; cell; organ-on-chip; oscillations; algorithm; video data; optical microscopy; tissue engineering.

Introduction

One of the rapidly developing trends in science is tissue engineering. Its goal is the creation of biological tissue with prescribed properties. One possible approach consists in culturing cells in microfluidic platforms (MPs) [1–4]. Such technologies allow for studying a proto-tissue or organ at the microscale resembling the principal features of the organ of. In general, MP can be successfully used to:

- improve the technology of tissue cultivation;
- determine the optimal conditions for creating tissues with given properties;
- study the biophysical properties of inter-related groups of cells;
- model pathological processes at the tissue level;

– study the effect of external physical factors and therapeutic drugs on tissue;

– develop and optimize clinical diagnostic tests by determining the individual susceptibility of the patient's tissues to physical factors and therapeutic drugs.

Various chemical biomarkers and mediums have been widely used to study the morphological and functional properties of tissues. For example, in [5, 6] medias and preparations for determining the proliferate activity of cells and phases of the cell's life cycle, the number of dead and living cells, wave processes of spread of the front to stimulation with use and action potentials are given. The fundamental importance of using biomarkers is their specificity. However, we can identify a number of shortcomings of this approach. In most cases, biomarkers are quite expensive; their use requires special knowledge, skills, and appropriate equipment.

When culturing cardiomyocytes on an MP, the most important functional test consists in the evaluation of their contractility. One of the methods for evaluating mechanical contractions of cells is optical microscopy [7, 2]. The method does not require the use of additional biochemical preparations and the use of confocal microscopy. Cell contractions are evaluated on the basis of video data, which are obtained with conventional light microscopes. The technique allows for visualizing both spontaneous beats and evaluating cell oscillations under the influence of an external electric field, e.g., "pseudo-ECG" [2]. To obtain quantitative characteristics of mechanical cell contractions without the use of auxiliary reagents, the task of computer processing and analysis of video images is posed.

In similar studies [2, 8, 9, 10], where the amplitude of cardiomyocyte oscillations is estimated from the analysis of video images, the average change in brightness in the region of interest is measured. The size of this region usually is substantially smaller than the "useful area" of the microchip with cells and the method of estimating the oscillations is simple enough but has two significant drawbacks. First, the amplitude units of measurement is not calibrated, i.e., they are measured by levels of brightness. It means that it is impossible to estimate correctly cell oscillations in different areas of the microchip since the images are not always ideally illuminated by a uniform external light source, but also because of the variation in cell density in space. Analyzing the signal by luminance gradations (gray levels) when comparing the data of different experiments would require careful calibration. Another disadvantage is the distortion of the waveform characterizing the mechanical contraction of cells. This leads to a change in the balance of brightness (similar to the balance of mass or energy in physical tasks). In addition, the brightness of the optical image changes not only because of cells mechanical oscillations but also due to the polarization of the cell elements under the action of the external field. The overall brightness of the optical image of the cells varies nonlinearly with the change in the strength of the external field and the frequency of the effect. Thus, the known methods, for example, [2, 8, 9, 10], register the very fact of cell contraction but substantially distort the shape and amplitude of the useful signal.

The aim of this study is the development of an algorithm for the analysis of the video data of mechanical contraction of cardiomyocytes on an MP to determine their functional and structural properties at the tissue level.

Materials and Methods

The developed algorithm for the analysis of video images was implemented in Matlab 2016. We analyzed the data of the contraction of cardiomyocytes cultured in an MP. The video data of cardiomyocyte contraction was recorded in the file format "mp4", where the color information in a pixel was recorded in the "RGB24" format. The recording rate was 23.83 frame/s. Subsequently, the images were transferred from the RGB format to grayscale images.

The geometric and functional features of the microchip described in [8]. Cells are embedded in fibrin hydrogel and then injected into the microchips, cultured in DMEM high glucose [11] and stimulated according to the following 3 conditions:

- Condition A: without any stimulation for 5 days.

- Condition B: without any stimulation for 3 days and subsequently electrically stimulated for the resting 2 days (day 4 and day 5). The electric pulse is 0,6 V amplitude (electric field 5 V/cm, current density 14.8 mA/cm²), 2 ms positive, 2 ms negative and 0 V for the resting 996 ms; frequency – 1 Hz.

- Condition C: without any stimulation for 3 days and subsequently stimulated for the resting 2 days (day 4 and day 5). The electric pulse is 3 V amplitude (electric field 25 V/cm, current density 74 mA/cm²), 2 ms positive, 2 ms negative and 0 V for the resting 996 ms; frequency 1 Hz.

Video image were obtained after 5 days of culture. To stimulate the contraction, the chips were stimulated by a unipolar rectangular signal with a duty ratio of 2. The amplitude of the pulses was varied in the range 0–7 V, the frequency was 0–5.5 Hz.

The algorithm for the analysis of cardiomyocyte contraction on an MP consists of the following sequence of actions:

1. Video data are loaded.
2. Images (definition of the geometrical sizes of pixels) are calibrated.
3. A rectangular region of interest is defined.
4. Binary images of local maxima in each frame of the video sequence are created.
5. Binary images of local maxima and binarization of the resulting image at the α -level of 0.5 is performed.
6. In the neighborhood of the obtained points in the spatial window of 9 pixels on each frame, the radius (R) and angle (θ) formed by the vector between the center of mass of the pixel brightness are calculated.

7. The changing rate of R and θ in time are calculated : $\Delta R/\Delta t$ and $\Delta\theta/\Delta t$.

8. The Region of Interest (ROI) along X and Y axis are stratified.

9. The calculated data R and θ , $\Delta R/\Delta t$ and $\Delta\theta/\Delta t$ in the strata for each time frame of the video sequence are averaged in space.

10. The obtained data, i.e., the shape of the oscillations in time, spectral Fourier analysis, correlation of oscillations between strata are analyzed.

The determination of the geometric dimensions of the pixels was carried out with respect to the $300\ \mu\text{m}$ distance between the geometric centers of the columns shown in Fig. 1. In our case one pixel was equal $1.43\ \mu\text{m}$.

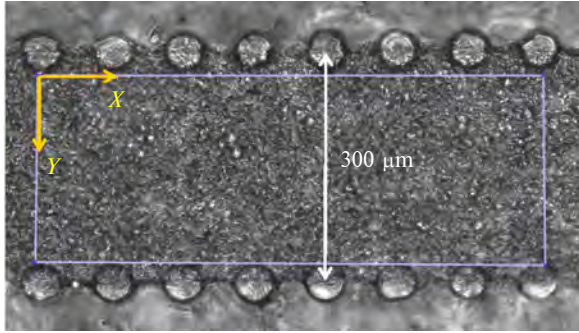


Figure 1: Building an ROI and calibrating the geometric size of pixels

After ROI building, local maxima ($BW_{\max}(t)$) are searched for each video frame. It is assumed that these points determine the coordinates of cardiomyocytes, since the elements of the cytoskeleton have the largest optical density, which is visualized as the brightest (almost white) areas on the images. It should be kept in mind that during contraction cells change their geometric dimensions and move for a certain distance in space. In addition, a noise exists in the images. Therefore, to find the average equilibrium coordinate of the cells, all values of $BW_{\max}(t)$ were summed up:

$$B_{\Sigma} = \sum_{i=1}^{n_t} BW(i)$$

where n_t is a number of frames.

The resulting B_{Σ} image was normalized to the maximum value and binarized at 0.5 ($B_{\Sigma 0.5}$). The obtained points with the value of 1 were identified with the geometric centers of the cells. This technique allows avoiding the use of the alignment procedure for the non-uniform illuminating images and significantly reduces the computer time for analyzing the video stream, i.e., there is no need to process every pixel of images. We note that each cell may have several non-zero pixels $B_{\Sigma 0.5}$. However, it should be emphasized that for the video images with

a higher degree of spatial resolution, the thresholding technique may be different, for example, a relatively narrow range of brightness can be used.

The oscillation analysis of an individual cardiomyocyte was performed in the neighborhood of non-zero pixels $B_{\Sigma 0.5}$, which we conditionally call "active image points" (AIP). The neighborhood of the AIP was defined by a rectangular area of ± 4 pixels, that is, the window size was 9 pixels ($6.3\ \mu\text{m}$). The size of the window was determined by two factors. First, given the resolution of video images, the distance between non-zero pixels $B_{\Sigma 0.5}$ was 5–20 pixels. The second factor was the requirement that if the window size in the microchip area was increased, where the cells were a priori absent, the measured signal (for example, the average brightness) would change minimally. The maximum window size should not exceed the maximum cell size of cardiomyocytes, which is about $24\ \mu\text{m}$. The relative error of the amplitudes of the oscillations (variable component) between the data obtained with the windows 9, 11, 13, 15 did not exceed 5–10 % in our studies. In this regard, to minimize the machine resources, a window of 9 pixels was selected (see Fig. 2).

For the analysis of cell contraction, two main parameters were chosen: the radius and the angle formed by the vector between the geometric center of the window (the neighborhood of the non-zero point in image $B_{\Sigma 0.5}$) and the center of mass of the brightness of the window (Fig. 3).

When stimulating the cell oscillations with an external electrical signal, the electric field lines are directed along the X or Y axis. The spatial orientation of cardiomyocytes with respect to field lines can be considered as random one. In connection with this, it is also rational to estimate the components of the radius of oscillations R_x and R_y :

$$R = \sqrt{R_x^2 + R_y^2}.$$

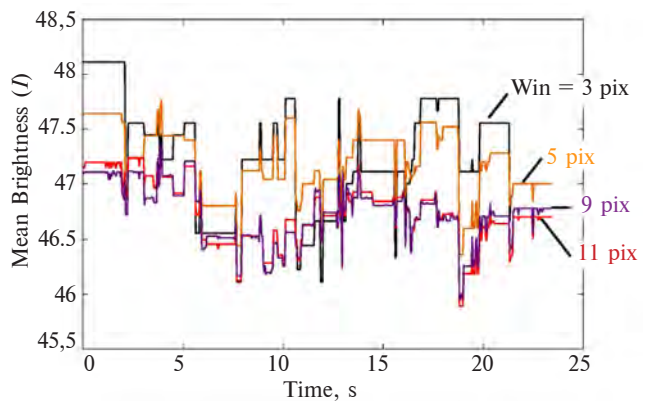


Figure 2: Selection of the window size. In the area without cells, increasing the window size should not change the value of the average brightness

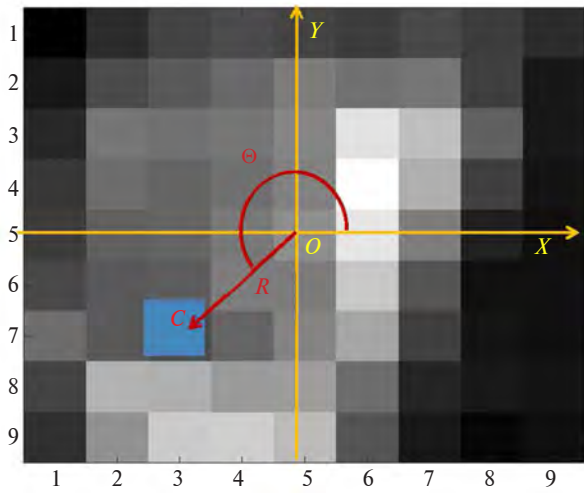


Figure 3: Determination of the radius (R) and angle (Θ): O is the geometric center; C is the center of mass of brightness. Unit of x and y is pixel

The time derivatives $\Delta_t R$, $\Delta_t \Theta$ were estimated as follows:

$$\Delta_t R \equiv \Delta R / \Delta t \approx [R(n_t + 1) - R(n_t)] / \Delta t,$$

$$\Delta_t \Theta \equiv \Delta \Theta / \Delta t \approx [\Theta(n_t + 1) - \Theta(n_t)] / \Delta t$$

where Δt was $1/23.83$ s; n_t is a frame number of the video sequence (time).

Thus, the vector $\mathbf{D} = (i, X_i, Y_i, n_t, R_i, \Theta_i, R_{xi}, R_{yi}, \Delta_t R_i, \Delta_t \Theta_i)$ is formed, where i is a sequence number of the AIP, X_i and Y_i are the coordinates of the i -th point.

To average the data, the ROI space was divided into strata (subranges) along the X and Y axis. The number of striations along the given axis N_{strX} or N_{strY} was determined by the H.A. Sturges formula

$$N_{strX} = 1 + |\log_2 N_X|,$$

$$N_{strY} = 1 + |\log_2 N_Y|$$

where N_X and N_Y are the number of pixels in the ROI along the X and Y axes, respectively. The vectors \mathbf{D}_i , which coordinates X_i , Y_i correspond to the given stratum, are averaged.

According to the time variation of R_i , Θ_i it is possible to evaluate the contraction mode of the cells, and also distinguish low-amplitude oscillations from noise random components.

The subsequent analysis of the signals consisted of a correlation analysis of the oscillations of the mean values of R , R_x , R_y , Θ , $\Delta_t R$, $\Delta_t \Theta$ between strata, and also in the analysis of Fourier spectra. In the striations along the X axis, the components of the contraction R_y were analyzed, and, conversely, in the strata along the Y axis, the average oscillations of R_x were estimated.

The image processing method described above substantially reduces these drawbacks. In addition, the method makes it possible to estimate the magnitude of cell contraction in absolute units of μm , and the rate of oscillations is $\mu\text{m/s}$, and to decompose the mechanical oscillations of cells into components.

Shape of the pulses of mechanical oscillations of cardiomyocytes during their electrical stimulation are presented in Fig. 4. It can be seen that the form of the oscillations of the average brightness tends to rectangular. The oscillations of the radius R have a more complex form. Such a form of signal (Fig. 4b) is similar to the data in [6].

Among all AIP a sufficiently large number of points not belonging to the cells is present. This is largely due to the fact that the environment and micro-inclusions, including inactive and dead cells, also perform mechanical contractions.

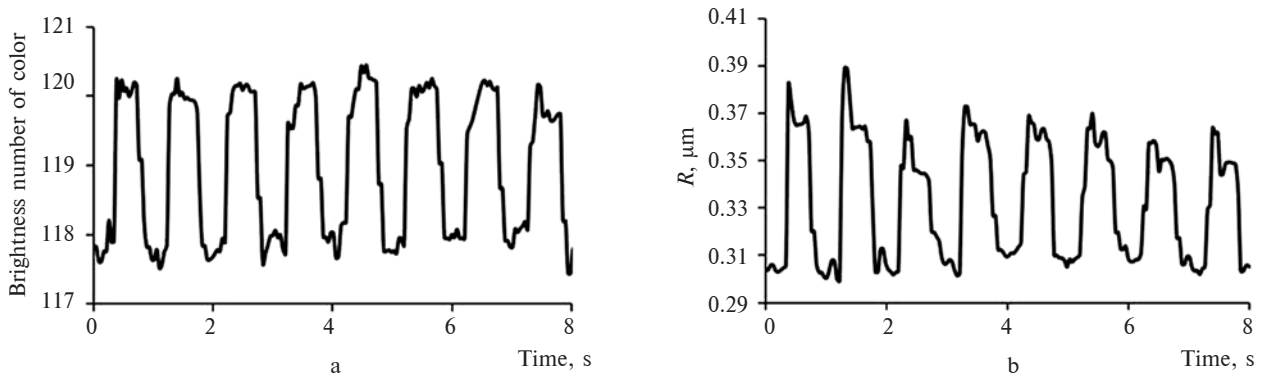


Figure 4: The shape of the pulses of mechanical cell contractions at the stimulation frequency of 1 Hz and voltage 4.5 V, estimated by different methods: (a) according to the average brightness in the zone of interest; (b) the value of the radius of the deviation of the center of mass of brightness from the geometric center (see text)

These points can significantly affect the results of averaging the data. It is possible to distinguish the AIPs belonging to living cells from the others when comparing the shape of the pulses of mechanical oscillations: AIP non-belonging cells are characterized by low-amplitude almost chaotic oscillations. However, comparing the forms of oscillatory processes between all AIP requires a lot of computer resources. Alternatively, the following method is proposed. For each AIP the obtained values of $\Delta_r R_{\max}$ we normalize with respect to their maximal value $\max(\Delta_r R_{\max i})$, where $i = 1, \dots, n$ (n is the total number of AIPs). Those points for which the normalized values $\Delta_r R_{\max}$ are less than a certain threshold level β are excluded from the analysis. In Fig. 5 an example of an estimation of the change in the shape of mechanical oscillations of cells is shown as a function of the level β ($0 < \beta < 1$).

The data in Fig. 5 show that the amplitude of the oscillations increases with increasing β (to 0.5); the shape of the pulse for $\beta > 0$ is quite different from the data for $\beta = 0$ (when all AIP are taken into account). The use of $\beta > 0.5$ is not rational, since in these cases the amount of AIP sharply decreases (Fig. 6), and the average data become sensitive to single relatively high-amplitude fluctuations.

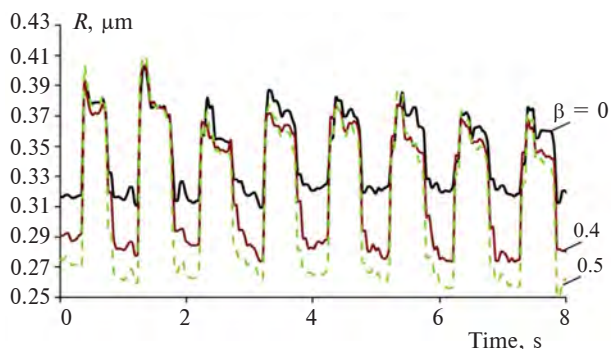


Figure 5: The shape of the pulses of mechanical cell contractions when stimulating oscillations of 1 Hz and 4.5 V are applied, estimated for different values of β

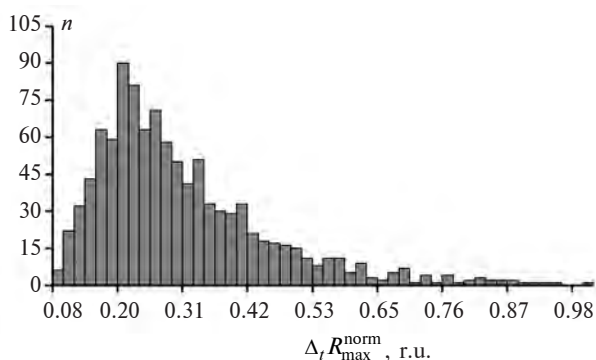


Figure 6: The histogram of the distribution of the normalized maximum values $\Delta_r R_{\max}$. With $\beta = \Delta_r R_{\max}^{\text{norm}} > 0.5$ the amount of AIP decreases significantly

Results

To approximate the average data, the equation

$$\Delta_r R_{\max} = af^{-\lambda}$$

was chosen, where f is the stimulation frequency, a and λ are parameters.

An example of the approximation of the average values of oscillations as a function of the stimulation frequency under different voltage on electrodes is presented in Fig. 7.

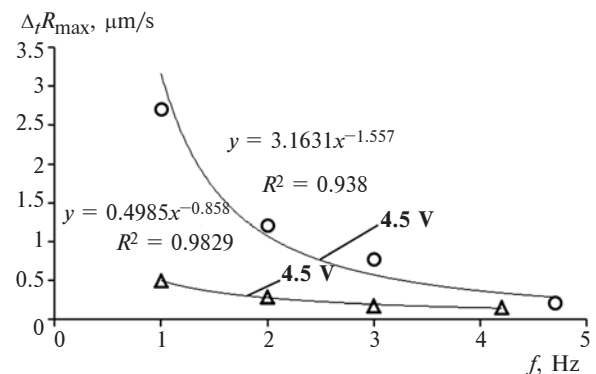


Figure 7: Change in the rate of contraction of cardiomyocytes in the microchip, depending on the voltage and excitation frequency for the control group (A). R^2 is the square of the correlation coefficient between the approximation function and the experimental data

The quantitative values of the approximation of the experimental data are presented in the Table, where R^2 is a square of the correlation coefficient between the approximation function and experimental data.

According to the Table, the following conclusions can be drawn out: with the increase of the stimulating frequency, the amplitude of mechanical contractions decreases monotonically; for cells stimulated with electrical stimuli (groups B and C), the parameters a and λ decrease (in comparison with the group A), which indicates a decrease in the excitability of cells and the ability to perform mechanical work. A similar conclusion can be drawn out by comparing groups B and C: an increase in the strength of the external electric field during the cell culture entails a decrease in the functional capability of cells. In group C, at the stimulation voltage of 4.95 V, there is a certain deviation from the presented general conclusions: the parameter a exceeds the corresponding value at the voltage of 4.5 V. This observation can be explained by the fact that the measurements were carried out on different microchips and every biological system has its own individual characteristics.

Table: The approximation functions for the maximum rate of cell contraction ($\mu\text{m/s}$) cultivated under different conditions, depending on the frequency and the stimulation voltage of the oscillations

Group of microchips	Parameters a and λ of approximation functions		
A	4.5 V, $f \in [1..4.7]$ Hz	4.8 V, $f \in [1..4.2]$ Hz	5.25 V, $f \in [1..4.6]$ Hz
	$a = 3.16, \lambda = -1.557$ ($R^2 = 0.95$)	$a = 0.50, \lambda = -0.858$ ($R^2 = 0.71$)	$a = 0.20, \lambda = -0.786$ ($R^2 = 0.38$)
B	3.75 V, $f \in [1..5]$ Hz	6.6 V, $f \in [1..5.5]$ Hz	—
	$a = 0.99, \lambda = -0.908$ ($R^2 = 0.72$)	$a = 0.15, \lambda = -0.561$ ($R^2 = 0.48$)	—
C	3.9 V $f \in [1..4.8]$ Hz	4.5 V, $f \in [1..3]$ Hz	4.95 V, $f \in [1..5.2]$ Hz
	$a = 0.62, \lambda = -0.706$ ($R^2 = 0.97$)	$a = 0.20, \lambda = -0.898$ ($R^2 = 0.49$)	$a = 0.27, \lambda = -0.765$ ($R^2 = 0.92$)

The presented analysis technique allows estimating the wave processes of spread contractions as well (see Fig. 8).

The wave character (when present) is clearly noticeable on two-dimensional time histograms $\Delta_t R$ along the X and Y axes, see Fig. 9a. It can be seen that the component of the rate of cell contraction $\Delta_t R_Y$ lags behind the right edge of the microchip compared to the origin (the left edge of the microchip). At the same time, cell contractions in strata along the Y axis occur simultaneously (Fig. 9b).

Active cardiomyocytes on a microchip are distributed non-uniform in space. Therefore, the shape of the impulses can be different in different strata. When the stimulation conditions change, the most active regions can shift. The Fig. 10 shows examples of different pulse shape changes

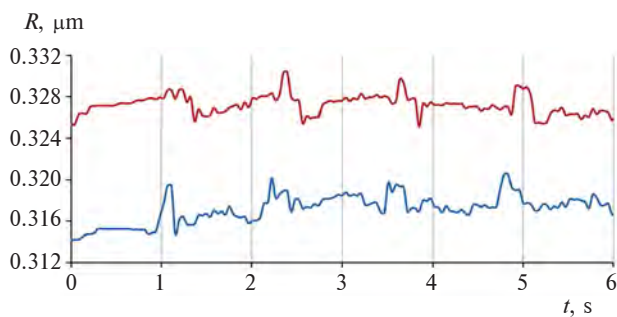


Figure 8: Example of a wave process in a microchip (Condition B, stimulation 1 Hz 4 V). The wave propagates along the X axis, which leads to a delay in cell contraction in the strata. The distance between strata is $380 \mu\text{m}$, the width of strata is $54 \mu\text{m}$. The blue curve is the oscillations in left strata, the red curve is the oscillations in the right strata

R_x and R_y in one of the chips. The oscillations along R_x and R_y axis maybe depended on the way cells remodeled the matrix and re-organized themselves.

At the stimulation frequency of 1 Hz the maximum amplitude of oscillations was observed (see Fig. 10a). The change in the constant component is also noted. The shape of the pulses changes, when the frequency increases. This phenomenon is observed at frequencies higher than 2 Hz. Figure 10b demonstrates that sometimes there are oscillations with opposite phase of contraction. Probably the phase shift between R_x and R_y depends on the number of cellular contacts between the cells and their orientation in space. Oscillations are antiphase if there are few contacts and the cells do not depend on neighbors. The absence of a pronounced phase shift indicates that the cells are oriented with respect to the external field randomly and the direction of the oscillations depends on the neighbors. Nevertheless, it can be stated that along the direction of the lines of external field force the amplitude of the oscillation is usually more pronounced (red curves).

In addition, in most cases asymmetry of the amplitude of cell contraction near two different stimulating electrodes is observed. For example, Fig. 9b shows that the speed and the amplitude of oscillations are higher in the upper part than in the lower one. This is due to the redistribution of charges in the medium. From the methods of electro-physiotherapy (galvanization, electrophoresis, low-frequency methods of exposure) it is known that under the anode a more acidic environment is formed and the sensitivity of tissues decreases,

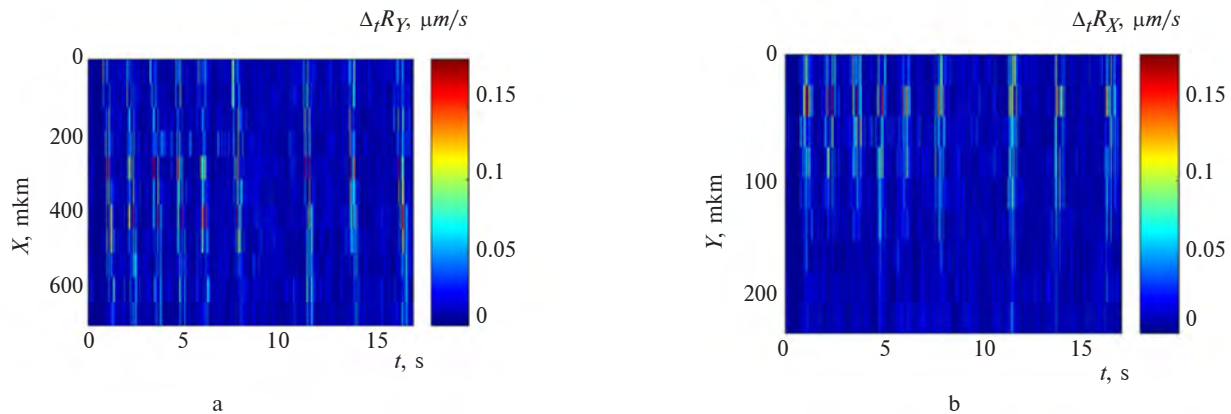


Figure 9: The spread of the average rate of cell contraction in the strata along the axis versus time: (a) along X axis (bright strips that correspond to the maximum rate of the beat are inclined); (b) along Y axis

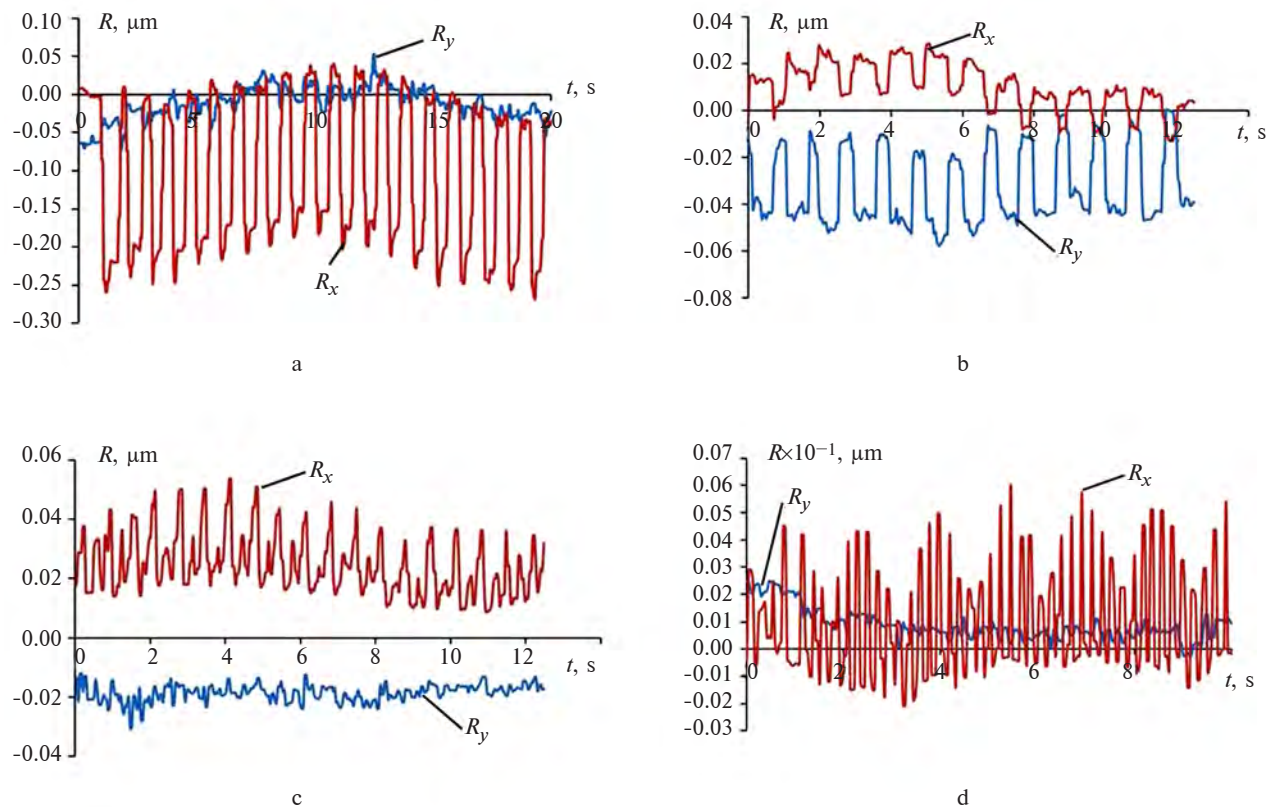


Figure 10: Examples of changes in the shape of the pulses of cell oscillations at different frequencies: (a) 1 Hz, (b) 1 Hz, (c) 3 Hz, (d) 4 Hz

under the cathode there is an increase in pH and an increase in the sensitivity of tissues [12]. In turn, this indicates that when testing the electromechanical properties of cells in a microchip as a complete system, it is necessary or to increase the duty cycle of the exciting external pulses and/or use to a bipolar signal. This will make it possible to restore the spatial distribution of ions. Since the mobility of positive and negative ions is different, one should also limit the time of one measurement and make

substantially larger pauses between measurements on a single chip. With an increase in the oscillation frequency of more than 2 Hz, a low-frequency modulation of the pulse shape is often observed (see Fig. 10d).

It should be noted that at this stage of the study the analysis of the time variation of the parameters Θ , $\Delta_t\Theta$ did not provide additional useful information. These parameters correlated well with the amplitude characteristics but had a slightly larger

noise component. However Θ and $\Delta_t\Theta$ can be of interest for cluster space-time analysis.

The spatial heterogeneity in the mechanical activity of cells can also be considered with the use of maps of the oscillation rate distribution (Fig. 11). The size of one pixel on these maps corresponds to the size of the strata along the corresponding

axis. As a rule, with increasing the stimulation frequency, the spatial distribution of active cells is generally preserved. Blurring and coarse patterns of activity are observed. Fig. 11 illustrates that at the frequency of 5 Hz, the amplitude of the oscillations is sharply reduced, but the activity region is the largest.

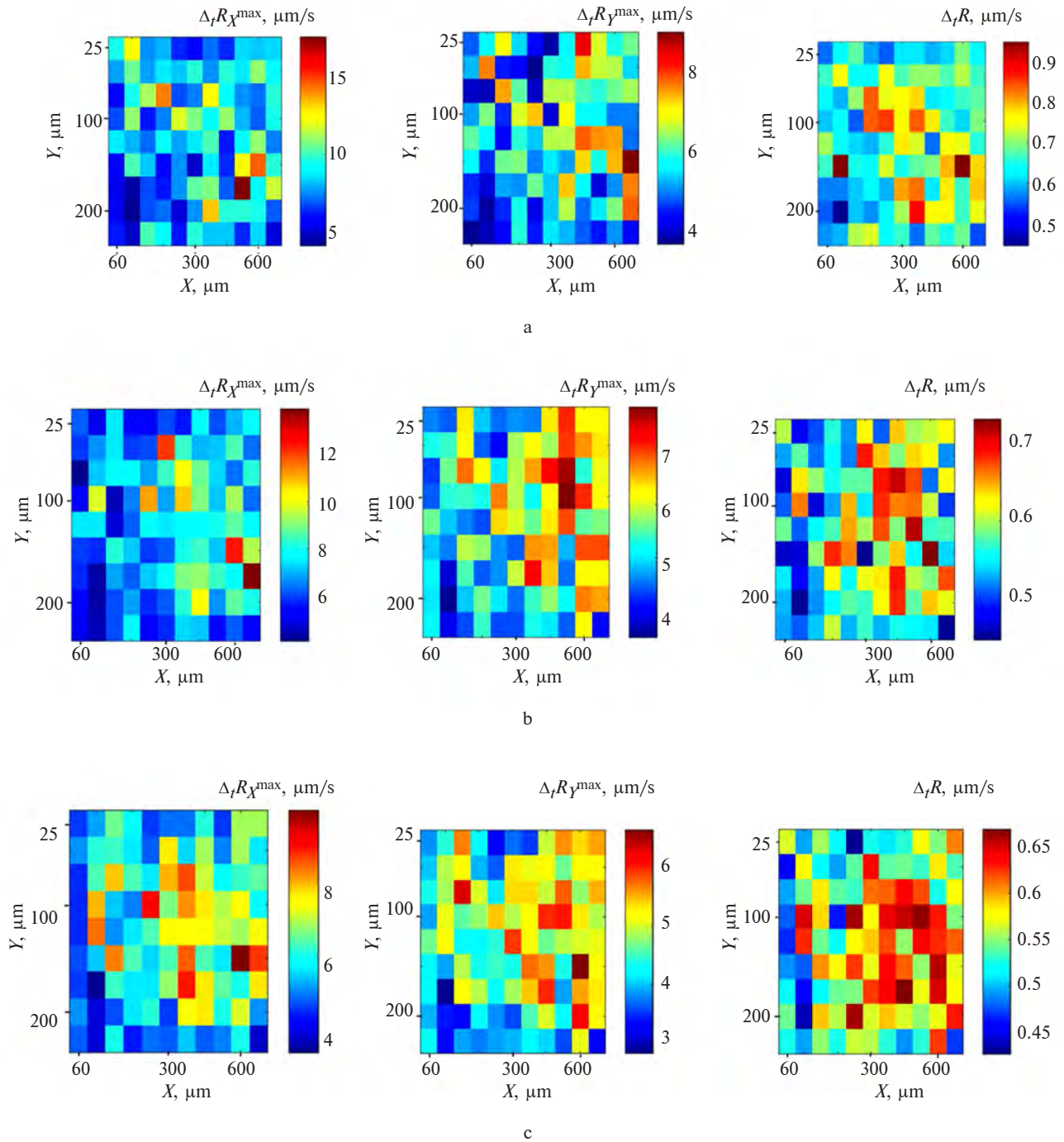


Figure 11: Example of the change in the spatial heterogeneity of the mechanical activity of cells as a function of the stimulation frequency (the voltage is constant – 3.75 V) for Condition B: (a) 1 Hz, (b) 3 Hz, (c) 5 Hz. $\Delta_t R_{\chi}^{\max}$, $\Delta_t R_{\gamma}^{\max}$ are the average value of the maximum oscillation rate along the axes X and Y

Conclusions

An algorithm for analyzing the oscillations of cardiomyocytes on an MP was developed based on optical microscopy video data. The technique does not require any auxiliary biomarkers or media. Analysis of video images allows us to estimate the amplitude and rate of contractions, the shape of the signal, the spatial heterogeneity distribution of the mechanical activity of cells.

The developed algorithm was used for the analysis of cell contraction under different culture conditions. It was shown that the pulsed electric field in the range 5–25 V/cm at frequencies of 1 Hz during

cell culture affects negatively the mechanical functional abilities of cardiomyocyte cells.

Further improvement of the proposed method of analysis is associated with a decrease computer time of the analysis of the video data and the determination of specific properties of cardiomyocytes at the tissue level.

Funding

The study was supported by EU-financed Horizon-2020 project AMMODIT (Grant Number MSCA-RISE 645672).

References

- [1] Rohr S, Scholly DM, Kleber AG. Patterned growth of neonatal rat heart cells in culture morphological and electrophysiological characterization. *Circulation Res.* 1991;68:114-30. DOI: 10.1161/01.RES.68.1.114
- [2] Teplenin A, Krasheninnikova A, Agladze N, Sidoruk K, Agapova O, Agapov I, et al. Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spidroin fiber meshes. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0121155. DOI: 10.1371/journal.pone.0121155
- [3] Wang X, Chen S, Kong M, Wang Z, Costa KD, Li RA, et al. Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies. *Lab Chip.* 2011;11:3656-62. DOI: 10.1039/C1LC20653B
- [4] Wikswo JP, Curtis EL, Eagleton ZE, Evans BC, Kole A, Hofmeisterab LH, et al. Scaling and systems biology for integrating multiple organs-on-a-chip. *Lab Chip.* 2013;13:3496-511. DOI: 10.1039/C3LC50243K
- [5] Burrige P, Thompson S, Millrod M, Weinberg S, Yuan X, Peters A, et al. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e18293. DOI: 10.1371/journal.pone.0018293
- [6] Huebsch N, Loskill P, Mandegar MA, Marks NC, Sheehan AS, Ma Z, et al. Automated video-based analysis of contractility and calcium flux in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes cultured over different spatial scales. *Tissue Eng Part C.* 2015;21(5):467-79. DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0283
- [7] Maddah M, Heidmann J, Mandegar M, Walker C, Bolouki S, Conklin B, et al. A non-invasive platform for functional characterization of stem-cell-derived cardiomyocytes with applications in cardiotoxicity testing. *Stem Cell Reports.* 2015;4(4):621-31. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.02.007
- [8] Marsano A, Conficconi C, Lemme M, Occhetta P, Gaudiello E, Votta E, et al. Beating heart on a chip: A novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues. *LabChip.* 2016 Feb 7;16(3):599-610. DOI: 10.1039/C5LC01356A
- [9] Werley CA, Chien MP, Gaubblomme J, Shekhar K, Butty V, Yi BA, et al. Geometry-dependent functional changes in iPSC-derived cardiomyocytes probed by functional imaging and RNA sequencing. *PLoS ONE.* 2017;12(3):e0172671. DOI: 10.1371/journal.pone.0172671
- [10] Burrige PW, Thompson S, Millrod MA, Weinberg S, Yuan X, Peters A, et al. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e18293. DOI: 10.1371/journal.pone.0018293
- [11] 41965 – DMEM, high glucose | Thermo Fisher Scientific [Internet]. *Thermofisher.com.* 2018 [cited 10 April 2018]. Available from: <https://www.thermofisher.com/it/en/home/technical-resources/media-formulation.170.html>
- [12] Bogolyubov VM, Ponomarenko GN. *General physiotherapy.* 3rd ed. Moscow, SPb: SLP; 1998. 480 p.

Н.А. Николов, Р. Визоне, И.Г. Нестерук, М. Распони, А. Редаелли

НОВЫЙ АЛГОРИТМ АНАЛИЗА ВИДЕОИЗОБРАЖЕНИЙ ОСЦИЛЛЯЦИЙ КЛЕТОК В МИКРОЧИПАХ

Проблематика. Одним из быстро развивающихся направлений в науке является тканевая инженерия с использованием технологии “лаборатория на микрочипе”. Для оценки механических сокращений клеток используются оптическая микроскопия и анализ видеоданных. Однако известные методы регистрируют только факт сокращения клеток и существенно искажают форму и амплитуду полезного сигнала. Поэтому задачи корректного количественного анализа таких видеоизображений являются актуальными.

Цель. Целью работы является разработка алгоритма анализа видеоданных механических сокращений кардиомиоцитов на микрочипе для определения их функциональных и структурных свойств на тканевом уровне.

Методика реалізації. Розроблений алгоритм аналізу відеозображень реалізований програмним кодом Matlab 2016. Для апробації запропонованого методу були проаналізовані дані про скорочення кліток кардіомиоцитів, вирощених в мікрочіпі. Вивчалися три групи кліток: вирощені без стимуляції, а також клітки, які стимулювалися електричними полями 5 і 25 В/см. Форма стимулюючих імпульсів – прямокутна, частота – 1 Гц.

Результати. Запропонований алгоритм аналізу відеоданих, дозволяє оцінити швидкість скорочення кліток в мікрометрах за секунду. Крім того, він дозволяє розкласти механічні коливання кліток на компоненти. Алгоритм використовувався для оцінки зміни швидкості скорочення кардіомиоцитів в залежності від інтенсивності напруги і частоти збудження.

Висновки. Запропонований метод аналізу відеоданих скорочень кліток кардіомиоцитів на мікрочіпі не вимагає жодних біомаркерів або середовищ. Аналіз відеозображень дозволяє оцінити амплітуду і швидкість коливань, форму сигналу, просторовий розподіл механічної активності кліток. Показано, що імпульсне електричне поле в діапазоні 5–25 В/см на частоті 1 Гц при культивуванні кліток викликає негативний вплив на скоротильну здатність кардіомиоцитів.

Ключові слова: кардіомиоцити; клітки; органи на мікрочіпі; коливання; алгоритм; відеодані; оптична мікроскопія; тканинна інженерія.

.....
М.О. Ніколов, Р. Візоне, І.Г. Нестерук, М. Распоні, А. Редаеллі

НОВИЙ АЛГОРИТМ АНАЛІЗУ ВІДЕОЗБРАЖЕНЬ ОСЦИЛЯЦІЙ КЛІТИН У МІКРОЧИПАХ

Проблематика. Одним із напрямів у науці, що швидко розвивається, є тканинна інженерія з використанням технології “лабораторія на мікрочіпі”. Для оцінки механічних скорочень клітин використовуються оптична мікроскопія й аналіз відеоданих. Однак відомі методи реєструють тільки факт скорочення клітин і суттєво спотворюють форму й амплітуду корисного сигналу. Тому актуальним залишається кількісний аналіз таких відеозображень.

Мета. Метою роботи є розробка алгоритму аналізу відеоданих механічних скорочень кардіомиоцитів на мікрочіпі для визначення їх функціональних і структурних властивостей на тканинному рівні.

Методика реалізації. Розроблений алгоритм аналізу відеозображень реалізований програмним кодом Matlab 2016. Для апробації запропонованого методу були проаналізовані дані про скорочення кардіомиоцитів, вирощених у мікрочіпі. Вивчалися три групи клітин: вирощені без стимуляції, а також клітини, які стимулювалися електричними полями 5 і 25 В/см. Форма стимулюючих імпульсів – прямокутна, частота 1 Гц.

Результати. Запропонований алгоритм аналізу відеоданих дає змогу оцінити швидкість скорочення клітин у мікрометрах за секунду. Крім того, він дає можливість розкласти механічні коливання клітин на компоненти. Алгоритм використовувався для оцінки зміни швидкості скорочення кардіомиоцитів залежно від інтенсивності напруги і частоти збудження.

Висновки. Розроблений метод аналізу відеоданих оптичної мікроскопії скорочень кардіомиоцитів на мікрочіпі не вимагає жодних біомаркерів або середовищ. Аналіз відеозображень дає змогу оцінити амплітуду і швидкість коливань, форму сигналу, просторовий розподіл механічної активності клітин. Показано, що імпульсне електричне поле в діапазоні 5–25 В/см на частоті 1 Гц при культивуванні клітин чинить негативний вплив на здатність кардіомиоцитів скорочуватись.

Ключові слова: кардіомиоцити; клітини; органи на мікрочіпі; коливання; алгоритм; відеодані; оптична мікроскопія; тканинна інженерія.

ESTIMATION OF ALGORITHMS EFFICIENCY IN THE TASK OF BIOLOGICAL OBJECTS CLUSTERING

V.S. Umanets*, B.A. Voinyk, V.A. Pavlov, Ie.A. Nastenko

Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

*Corresponding author: 2_bytes@ukr.net

Received 3 June 2018; Accepted 26 June 2018

Background. The task of determining the functional relationship between biophysical parameters is an integral part of the actual problem of finding the optimal impact on a biological object and is currently not completely resolved. One of the important tasks in this area is the partitioning of the original feature space into such areas (clusters) that relate to different functional relationships linking biophysical parameters and have, in general, an arbitrary shape. Such clusters in the future is logical to call functional. To obtain and analyze the functional clusters, there are a number of algorithms, each of which has its advantages and disadvantages. At the same time, the solution of a certain practical problem requires an evaluation of the efficiency of the algorithms in terms of the cluster separation adequacy.

Objective. In this paper, for a general example of the biological objects clustering problem (Fischer's Iris Data Set), the efficiency of a typical clustering tools series is evaluated. The application of k -means classical algorithm, the Ward algorithm and developed in this work the fuzzy version of clustering for the k -means algorithm with a limited mass of the working area for the clusters' formation was considered.

Methods. The algorithm includes a procedure for a priori estimation of the clusters quantity. The estimation is carried out according to the frequency histogram. To determine the optimal number of the histogram columns, the application of the Scott formula is justified. The algorithm allows forming clusters of arbitrary configuration with obtaining the value of the object's membership measure for each of the clusters. The comparative testing of the above algorithms was carried out on Fisher's Iris Data Set.

Results. The best value of F_1 -score is obtained for the algorithm proposed in this paper: $F_1 = 0.92$, the value $F_1 = 0.90$ is obtained for the Ward method and the value $F_1 = 0.88$ – for the classical k -means algorithm.

Conclusions. The obtained test results on the analysis problem of arbitrary-shaped clusters made it possible to give preference to the version of fuzzy k -means with a limited mass of the working area for the clusters' formation. The calculating of the membership measure value allows us to obtain additional information on the structure of cluster formations, as well as to correct the result of clustering of k -means with a limited mass, which is especially important since the formation of clusters occurs in a single pass. Comparing the computational resources required for computing algorithms with relatively close test results also makes it possible to give preference to the developed algorithm. Compared with the Ward algorithm, it requires fewer computing resources since no additional memory is needed to store the distance matrix and no time is required to recalculate it.

Keywords: clustering; k -means; biological object; membership function; estimation of a number of clusters; fuzzy clustering.

Introduction

The task of determining the functional relationship between biophysical parameters is an integral part of the actual task of finding the optimal impact on biological objects and is not fully resolved now. Among the most interesting results of such tasks are the ones that adequately represent groups in initial data with different functional relationships that bind considered biophysical parameters. It is logical to call such clusters functional, and their form in the general case can be arbitrary. To obtain and analyze the functional clusters, there are a number of

algorithms, each of which has its advantages and disadvantages. At the same time, the solution of a certain practical problem requires an evaluation of the efficiency of the algorithms in terms of the cluster separation adequacy. Such an evaluation of algorithms can be performed on a given set of objects, the classification of which is known to the researcher but is unknown to the tested algorithms.

One of the most common approaches to clustering of multidimensional data are the methods of k -means family [1]. However, the classical version of the approach tends to form exclusively multidimensional spherical clusters by minimizing each cluster's

dispersion. One of the ways to overcome this problem is introduction of a limitation on the total mass of the working area, by which the current value of the centroid of the cluster is determined. One of the current versions of the algorithm [2] implements this approach. However, this version of the algorithm has a number of shortcomings: the need to set the number of groups before the clustering and the lack of a mechanism for calculating the membership degree to the cluster. Note that a number of methods based on information entropy [3, 4] and divergence [3, 5] solve the first of these problems, but they are quite loaded from a computational point of view, so it is desirable to have a simpler mechanism for obtaining this estimate. Below we propose to develop an algorithm for fuzzy k -means with a limited mass of the cluster formation working area. Then evaluate the effectiveness of the developed algorithm comparing to the classical algorithm of k -means and one of the most frequently used hierarchical algorithms – Ward’s method.

The work’s purpose is to develop a version of the k -means method, which solves the problem of partitioning the initial sample by forming clusters of arbitrary form.

The study objectives are to develop a version of the fuzzy clustering algorithm for the k -means method with a limited mass of the working area of cluster formation, the introduction into the algorithm a simple mechanism for a priori estimation of the clusters quantity and to evaluate the algorithm efficiency on a biological objects sample with known cluster partitioning.

Materials and methods

The approach justification. The k -means algorithm standard mechanism without limiting the mass (quantity) of the working area objects of cluster formation leads to forming the spherical shape clusters which are identified as the ideal form of object groups. In this case, the centroids’ path to the limiting state is neither an object of the analysis of the algorithm nor a constructive element used in the formation of the cluster. Only the stability of the centroid boundary state is important, which determines the result of clustering.

In [2], the mechanism of the k -means algorithm was first used to obtain non-spherical clusters, while the basis for determining the form of the received cluster is no longer the boundary position of the centroid, but the path at which the working area centroid passes into its limiting state. The displacement of the centroid determines the trend of the cluster working area and actually allows the algo-

rithm to recognize its fragments. However, with the implementation of the standard k -means mechanism as the new objects are joined to the working area, the centroid travel speed steadily decreases. This happens due to reduction in the weight of the attached object impact in relation to the previously accumulated mass of the working area and therefore new object’s impact on the trend becomes insignificant. The introduction of the working area with limited mass of cluster formation in [2] allowed to propose a mechanism forming of arbitrary form clusters and to extend the method of k -means to the task of cluster analysis general case. However, as noted above, this algorithm version may be expediently supplemented by estimating the clusters quantity in this sample of data and by calculating the objects’ measure of membership to clusters.

Clustering algorithm. Let object $x_j, j = 1, \dots, n$ is described as a string $j \{x_{j1}, x_{j2}, \dots, x_{jm}\}$ of initial matrix M of dimension $\dim(n, m)$.

The algorithm implements the following steps:

1. Normalizing data.
2. Initial centroid initialization using one of several methods:
 - (a) close to the zero vector;
 - (b) close to the vector center of mass;
 - (c) initialization on the peripheral data points;
 - (d) centroids are located evenly distant from the center of mass with a given step;
 - (e) the position of the centroids is chosen randomly
3. Object x_l is chosen and distances between x_l and every of k_t centroids are being calculated;
4. The object is joined to the nearest cluster.
5. The centroid moves to the new position calculated using following formulas:

if $n_t < I_{\max}$, then

$$x_{c_t} = \frac{\sum_{i=1}^{n_t} x_i + x_l}{n_t}$$

if $n_t < I_{\max}$, then

$$x_{c_t} = \frac{\sum_{i=1}^{n_t} x_i + x_l - p \cdot o}{I_{\max} - p}, \quad n_t = n_t - p \quad (1)$$

where n_t is a number of points in cluster t , which are used to calculate a centroid new position, I_{\max} is the point’s number threshold, C_t is the name of cluster t , sum $\sum_{i=1}^{n_t} x_i + x_l$ accumulates information or calculating the centroid location, p is the number

of conditional objects o whose coordinates are the coordinates of current centroid's position.

As can be seen from formula (1), if the threshold of points' number is reached, "part" of the pre-accumulated information is "forgotten", which allows controlling movement of the centroid in the process of clustering. An adequate choice of parameters provides more ordered motion when reproducing the functional dependence.

6. The procedure stops after processing all of N points unless different stopping condition specified.

Clustering is carried out in a one-pass, and clusters obtained as a result have a non-spherical form.

The algorithm described above was proposed in [2] however, it needs the number of clusters to give an adequate result. The mechanisms of a clusters quantity priori estimation are rare. For the most part data scientist use posterior methods like gradually lowering the number of clusters together with using quality estimation methods. To address this problem, we propose the next approach. A density distribution histogram is constructed for each of the m variables. Using the number of local maxima in each variable's distribution, one can obtain an estimate of clusters quantity in the sample. The problem of columns optimal number can be solved by using the Scott formula, the Friedman–Diakonis formula, or similar ones. In the implementation of the algorithm, the Scott formula [6] was used, due to lower computational cost compared to the Friedman–Diakonis formula that uses interquartile distance thus requiring data to be ranked.

It was proposed to add membership function calculation to the algorithm. However, to use the known approach for this purpose, similarly to the C -means algorithm [7], it is incorrect, since the calculation of the centroid new position in C -means occurs after the information accumulation and not in the centroids' movement process. In the case when the position of the centroid changes in the process of adding points, calculated value of the membership function will lose its relevance. In this case, the value of the membership function should be calculated already after the initial formation of clusters. In addition, the mechanism of membership degree calculating also requires to be changed, as in contrast to the classical version of the C -means (the formation of clusters of hyperspherical form), the clusters received will in most cases have a stripe-like form

To solve the problem, two possible ways can be suggested:

1. Evaluate membership function using average distance between an object and other objects in the cluster can be used:

$$u_{ij} = \frac{1}{\sum_{k=1}^c \left(\frac{\frac{1}{n_j - 1} \sum_{l=1}^{n_j} \|x_i - x_l^{(j)}\|}{\frac{1}{n_k} \sum_{l=1}^{n_k} \|x_i - x_l^{(k)}\|} \right)^{\frac{1}{m-1}}}$$

where n_j is a number of points in cluster j , c is a number of clusters.

2. Evaluate membership function using the distance between the object and the "trace" left by moving centroids can be used:

$$u_{ij} = \frac{1}{\sum_{k=1}^c \left(\frac{\|x_i - t_{c_j}\|}{\|x_i - t_{c_k}\|} \right)^{\frac{1}{m-1}}}$$

where t_{c_j} is a nearest point of the "trace" left by moving centroid j .

Results

Testing of the algorithm was performed on Fisher's "Iris Data Set" [7].

The data set "Iris Data Set" contains 150 irises of three species, 50 of each. The object features here are the geometric characteristics. Four features were measured from each sample: the length and the width of the sepals and petals, in centimeters.

By using developed estimation procedure, it was found that there are 3 clusters in the data set. When clustering the "Iris Data Set" using developed algorithm the following result was obtained (Table 1).

Table 1: Cross table for clustering result given by developed algorithm

		Actual			Total
		0	1	2	
Result	0	36	0	0	36
	1	14	50	0	64
	2	0	0	50	50
Total		50	50	50	150
True positive, %		72	100	100	

As can be seen, the result of clustering was similar to the actual existing groups (Fig. 1).

The value of F_1 -score was obtained using macro-averaging [8] and was 0.92. Below are the results obtained using classical k -means method (Table 2) and Ward's method hierarchical clustering (Table 3).

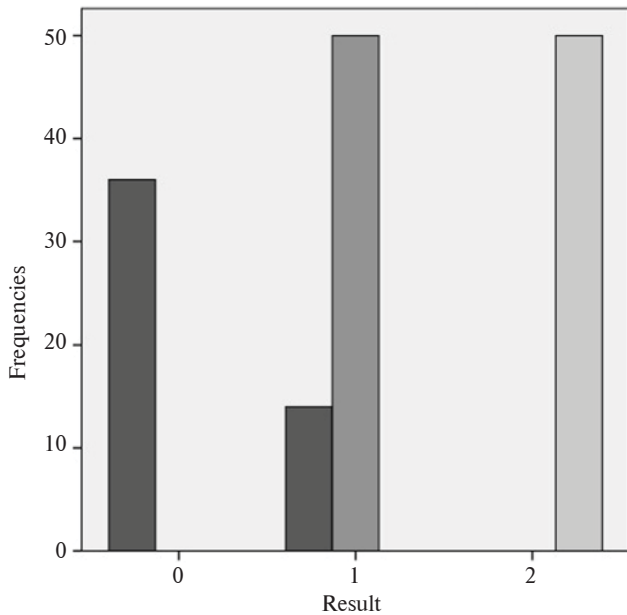


Figure 1: Diagram comparing clusters obtained using developed algorithm with actual classes: ■ - 0; ■ - 1; ■ - 2

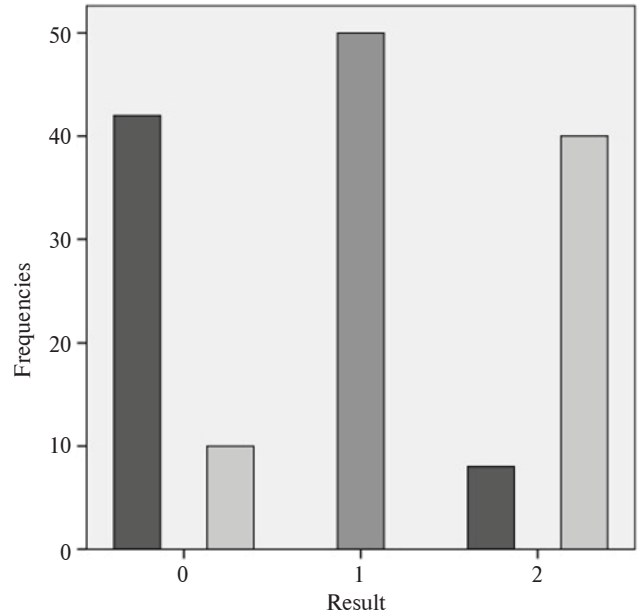


Figure 2: Diagram comparing clusters obtained using *k*-means with actual classes: ■ - 0; ■ - 1; ■ - 2

Table 2: Cross-table for *k*-means clustering result

		Actual			Total
		0	1	2	
Result	0	42	0	10	52
	1	0	50	0	50
	2	8	0	40	48
Total		50	50	50	150
True positive, %		84	100	80	

Table 3: Cross table for clustering result obtained using Ward's method

		Actual			Total
		0	1	2	
Result	0	33	0	0	33
	1	0	50	0	50
	2	17	0	50	67
Total		50	50	50	150
True positive, %		66	100	100	

The result obtained with the *k*-means method has a F_1 value of 0.88. In general, the classic *k*-means showed the worst result on the test sample and gave more mixed clusters (Fig. 2).

The result obtained with Ward's method has a F_1 value of 0.90. This method formed clusters similar to those formed by developed method (Fig. 3).

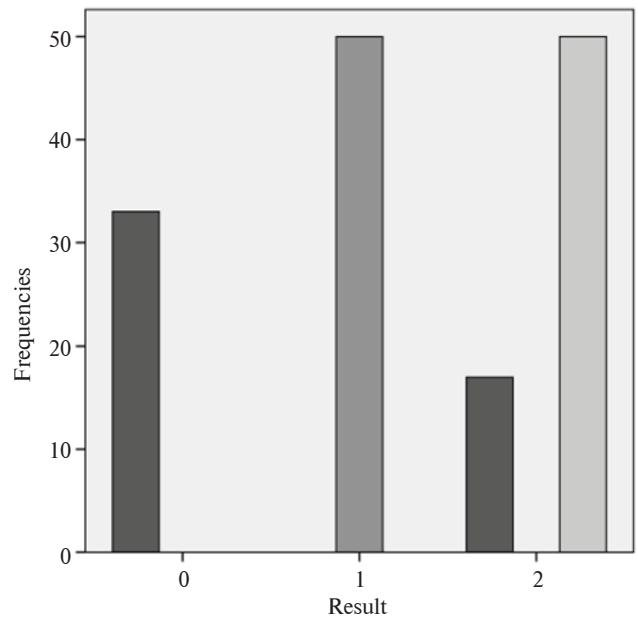


Figure 3: Diagram comparing clusters obtained using Ward's method with actual classes: ■ - 0; ■ - 1; ■ - 2

Discussion

As can be seen above, Ward's method gave similar results (see Fig. 3) to those obtained with *k*-means with a limited mass of working area (see Fig. 1). Some resemblance between the results of clustering is a consequence of the generation of hierarchical algorithms of non-spherical clusters, in the general case. The value of F_1 -score for this result was 0.90, nevertheless, it is worse than for the development algorithm. This algorithm also

tends to unite two closely situated classes in one big cluster.

In testing the algorithm, the calculation of the membership function using the minimum distance to the trace of the centroid of the working area of the algorithm was used, which provided the best result of clustering compared with the use of the mean distance from the studied point to all other cluster points.

Conclusions

The testing of the algorithms discussed in the article allows us to give preference to the developed version of fuzzy k -means with a limited mass of working area of cluster formation for cluster analysis problems with clusters of arbitrary form. The calculation of the membership function

allows to obtain additional information about the structure of cluster entities, as well as to correct the result of clustering k -means with a limited mass, which is especially important for algorithms that obtain the result of clustering in one pass. Regarding the proximity of the qualitative results of the developed algorithm and Ward's method, it should be mentioned that the developed algorithm has a lower computational value since it does not require additional memory to store the matrix of distances and time for its recalculation. In addition, since the algorithm developed uses an a priori estimate of the clusters quantity, it has no problems related to the dendrogram cutting to get a result.

The developed algorithm will be further used in the development of cardiovascular state diagnostics system.

References

- [1] Xiao Y, Yu J. Partitive clustering (K-means family). Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery. 2012;2(3):209-25. DOI: 10.1002/widm.1049
- [2] Nastenko Y. The use of cluster analysis for partitioning mixtures of multidimensional functional characteristics of complex biomedical systems. J Automat Inform Sci. 1996;28(5-6):77-83. DOI: 10.1615/jautomatinfscien.v28.i5-6.100
- [3] Boldak AA, Suharev DL. Determining number of clusters in statistical data. Visnyk NTUU KPI. Informatika, Upravlinnia ta Obchislyvalna Tehnika. 2011;54(2):118-22.
- [4] Shannon C. A mathematical theory of communication. Bell System Tech J. 1948;27(4):379-423, 623-656. DOI: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb00917.x
- [5] Kullback S, Leibler R. On information and sufficiency. Annals Math Stat. 1951;22(1):79-86. DOI: 10.1214/aoms/1177729694
- [6] Scott D. On optimal and data-based histograms. Biometrika. 1979;66(3):605.
- [7] Bezdek JC. Pattern recognition with fuzzy objective function algorithms. New York: Plenum Press; 1981. DOI: 10.1007/978-1-4757-0450-1
- [8] Fisher R. UCI Machine learning repository: Iris data set [Internet]. Archive.ics.uci.edu. [cited 17 February 2018]. Available from: <http://archive.ics.uci.edu/ml/datasets/Iris>
- [9] Asch V. Macro- and micro-averaged evaluation measures [Internet]. Clips.uantwerpen.be. 2012 [cited 13 April 2018]. Available from: <https://www.clips.uantwerpen.be/~vincent/pdf/microaverage.pdf>

В.С. Уманець, Б. О. Войник, В.А. Павлов, Є.А. Настенко

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ АЛГОРИТМІВ У ЗАДАЧІ КЛАСТЕРИЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

Проблематика. Завдання визначення функціонального зв'язку між біофізичними параметрами є складовою частиною актуальної проблеми пошуку оптимального впливу на біологічний об'єкт і на сьогодні не є повністю вирішеним. Однією з важливих задач у цій області є розбиття початкового простору ознак на такі області (кластери), які відносяться до різних функціональних співвідношень, що зв'язують біофізичні параметри, і які мають, у загальному випадку, довільну форму. Такі кластери в подальшому логічно називати функціональними. Для отримання й аналізу функціональних кластерів існує низка алгоритмів, кожен із яких має свої переваги й недоліки. У той же час розв'язання певної практичної задачі вимагає оцінки ефективності алгоритмів з точки зору адекватності виділення кластерів.

Мета. У статті для досить загального прикладу завдання кластеризації біологічних об'єктів (ірис Фішера) оцінюється ефективність низки типових інструментів кластеризації. Розглянуто застосування алгоритму k -середніх, алгоритму Варда, а також розроблено в роботі нечіткої версії кластеризації для алгоритму k -середніх з обмеженою масою робочої області формування кластерів.

Методика реалізації. В алгоритм включено процедуру апіорної оцінки кількості кластерів. Оцінка проводиться по гістограмі частот, для визначення оптимальної кількості стовпців гістограми обґрунтовується застосування формули Скотта. Алгоритм дає змогу формувати кластери довільної конфігурації з отриманням значення міри приналежності об'єкта кожному з кластерів. На наборі даних "Ірис Фішера" проведено порівняльне тестування зазначених алгоритмів.

Результати. Оптимальне значення F_1 -score отримано для алгоритму, що запропонований у роботі – $F_1 = 0,92$, значення $F_1 = 0,90$ одержано для методу Варда і значення $F_1 = 0,88$ – для класичного алгоритму k -середніх.

Висновки. Отримані результати тестування свідчать, що в завданнях аналізу кластерів довільної форми доцільно віддати перевагу розробленій у дійсній роботі версії нечітких k -середніх з обмеженою масою робочої області формування кластерів. Розрахунок значення міри приналежності дає можливість в алгоритмі отримати додаткову інформацію про структуру кластерних утворень, а також здійснити поправки результату кластеризації k -середніх з обмеженою масою, що особливо важливо при формуванні кластерів за один прохід. Порівняння необхідних для розрахунку обчислювальних ресурсів для алгоритмів з відносно близькими результатами тесту також свідчить про перевагу запропонованого в роботі алгоритму. Порівняно з алгоритмом Варда йому необхідно менше обчислювальних ресурсів, оскільки не потрібна додаткова пам'ять для зберігання матриці відстаней і немає витрат часу на її перерахунок.

Ключові слова: кластеризація; k -середні; біологічний об'єкт; міра належності; оцінка кількості кластерів; нечітка кластеризація.

В.С. Уманец, Б.А. Войник, В.А. Павлов, Е.А. Настенко

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АЛГОРИТМОВ В ЗАДАЧЕ КЛАСТЕРИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Проблематика. Задача определения функциональной связи между биофизическими параметрами является составной частью актуальной проблемы поиска оптимального воздействия на биологический объект и в настоящее время не является полностью решенной. Одной из важных задач в этой области является разбиение исходного пространства признаков на такие области (кластеры), которые относятся к различным функциональным соотношениям, связывающим биофизические параметры, и имеют, в общем случае, произвольную форму. Такие кластеры в дальнейшем логично называть функциональными. Для получения и анализа функциональных кластеров существует ряд алгоритмов, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. В то же время решение определенной практической задачи требует оценки эффективности алгоритмов с точки зрения адекватности выделения кластеров.

Цель. В статье для достаточно общего примера задачи кластеризации биологических объектов (ирисы Фишера) оценивается эффективность ряда типичных инструментов кластеризации. Рассмотрено применение алгоритма k -средних, алгоритма Варда, а также разработанной в данной работе нечеткой версии кластеризации для алгоритма k -средних с ограниченной массой рабочей области формирования кластеров.

Методика реализации. В алгоритм включена процедура априорной оценки количества кластеров. Оценка проводится по гистограмме частот, для определения оптимального количества столбцов гистограммы обосновывается применение формулы Скотта. Алгоритм позволяет формировать кластеры произвольной конфигурации с получением значения меры принадлежности объекта каждому из кластеров. На наборе данных "Ирисы Фишера" проведено сравнительное тестирование указанных алгоритмов.

Результаты. Наилучшее значение F_1 -score получено для алгоритма, предложенного в работе – $F_1 = 0,92$, $F_1 = 0,90$ для метода Варда и $F_1 = 0,88$ для классического алгоритма k -средних.

Выводы. Полученные результаты тестирования свидетельствуют о том, что в задачах анализа кластеров произвольной формы целесообразно отдать предпочтение разработанной в данной работе версии нечетких k -средних с ограниченной массой рабочей области формирования кластеров. Расчет значения меры принадлежности в алгоритме позволяет получить дополнительную информацию о структуре кластерных образований, а также осуществить поправки результата кластеризации k -средних с ограниченной массой, что особенно важно при формировании кластеров за один проход. Сравнение требуемых для расчета вычислительных ресурсов для алгоритмов с относительно близкими результатами теста также свидетельствует о преимуществе предложенного в работе алгоритма. По сравнению с алгоритмом Варда ему требуется меньше вычислительных ресурсов, так как не нужна дополнительная память для хранения матрицы расстояний и нет затрат времени на ее перерасчет.

Ключевые слова: кластеризация; k -средние; биологический объект; мера принадлежности; оценка количества кластеров; нечеткая кластеризация.

БІОІНФОРМАЦІЙНЕ ВИЯВЛЕННЯ ПРОДУЦЕНТІВ МАГНІТНИХ НАНОЧАСТИНОК СЕРЕД ЗАЛІЗО- І МАРГАНЕЦЬОКИСНИХ БАКТЕРІЙ

С.В. Горобець¹, О.В. Кравченко², М.О. Булаєвська¹, О.С. Панченко^{2*}

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

²Державне підприємство “Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства”, Київ, Україна

*Corresponding author: elena.panchenko.92@gmail.com

Received 24 February 2018; Accepted 29 March 2018

Проблематика. В Україні понад 17 % підземних водозаборів відносяться до некондиційних за вмістом заліза та 4,4 % – за вмістом марганцю. Підвищений вміст цих елементів спричиняє погіршення органолептичних властивостей питної води, призводить до утворення осадів і заростання водопровідних мереж через розвиток залізобактерій. Тому актуальним є дослідження магнітних властивостей залізо- та марганецьокисних бактерій для можливості їх застосування у технологіях магнітної сепарації з метою удосконалення технологій очищення води з надмірним вмістом заліза та марганцю.

Мета. Мета роботи полягає в пошуку потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок (БМН) серед залізо- і марганецьокисних бактерій та класифікації останніх за типом внутрішньої структури (кристалічна чи аморфна) і місцем локалізації БМН (зовнішньоклітинна чи внутрішньоклітинна) з використанням методів порівняльної геноміки.

Методика реалізації. Для оцінки ступеня подібності білків біомінералізації БМН у магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 та у залізо- і марганецьокисних бактерій застосовано методи парного та множинного вирівнювання з використанням вільної в доступі програми “BLAST” Національного центру біотехнологічної інформації.

Результати. Проведений біоінформаційний аналіз показав, що серед 30 досліджуваних залізо- та марганецьокисних бактерій, які є представниками 5 родів (р. *Gallionella*, р. *Siderocapsa*, р. *Sphaerotilus*, р. *Hyphomicrobium*, р. *Leptothrix*), потенційними продуцентами БМН є 28 мікроорганізмів.

Висновки. Зроблено висновки щодо перспективності подальшого дослідження впливу магнітного поля на мікроорганізми р. *Leptotrix*, р. *Sphaerotillus*, р. *Gallionella*, р. *Hyphomicrobium*. Важливим напрямом для подальших експериментів є вивчення можливих шляхів проведення магнітної сепарації залізо- та марганецьокисних бактерій для запобігання вторинній контамінації питної води та утворенню відкладень у трубопроводах. Використання магнітних властивостей досліджених мікроорганізмів корисне для розробки шляхів видалення застарілих відкладень усередині трубопроводів.

Ключові слова: залізо- та марганецьокисні бактерії; біогенні магнітні наночастинок; біомінералізація; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Мат-білки; очищення води.

Вступ

Проблема збереження якості питної води під час транспортування до споживачів значною мірою залежить від технічного та санітарного стану трубопроводної системи. Через неналежну експлуатацію розподільних мереж, відсутність їх періодичної промивки та дезінфекції, профілактичних оглядів і ремонтних робіт внутрішня поверхня труб може піддаватися корозії, обростанням та іншим пошкодженням, що зрештою призводить до вторинної контамінації очищеної води. Особливо це стосується транспортування залізо- та марганецьовмісних вод. Залізо- та марганецьокисні бактерії, які містяться у воді, здатні “прикріплюватися” до стінок трубопроводів, утворюючи на них так звані плівки та пухкі об’ємні відкладення, що

спричиняє до “заростання” труб і погіршення якості води (збільшення каламутності, забарвлення, поява неприємних запахів і присмаків, підвищення хімічних і біологічних показників). Крім того, такий стан внутрішньої поверхні трубопроводів впливає на гідравлічний режим транспортування води, спричиняє перевитрати електроенергії, скорочує строк експлуатації розподільних мереж тощо [1].

Для запобігання означеним проблемам вода з підвищеним вмістом сполук заліза та/або марганцю повинна перед надходженням у розподільні системи проходити відповідне кондиціонування на станціях водоочищення. Але це є досить складною задачею, тому що понад 17 % підземних водозаборів відносяться до некондиційних за вмістом заліза та 4,4 % – за вмістом марганцю [2].

У процесі пошуку ефективних біотехнологічних методів видалення з води заліза та марганцю нами з працюючих фільтрів знезалізнення було виділено 10 чистих культур залізо- та марганецьокисних мікроорганізмів, віднесених до 6 родів: *Siderocapsa*, *Leptothrix*, *Sphaerotillus*, *Gallionella*, *Metallogenium*, *Hyphomicrobium* [3], які зустрічаються як у природних умовах, так і всередині водопровідних труб. Зокрема, результати цих та інших досліджень показали, що мікроорганізми можуть застосовуватись у біотехнологіях видалення з води сполук заліза та марганцю.

Наприклад, у роботі [4] доведено, що магнітні метали, наявні у стічних водах, можуть накопичуватись мікроорганізмами, в яких утворюються магнітосоми, а потім видалятися за допомогою магнітної сепарації. Для ефективного застосування магнітних сепараторів у технології очищення води необхідно знати магнітні властивості біогенних магнітних наночастинок (БМН), накопичених залізо- та марганецьокисними мікроорганізмами, оскільки від функціональної залежності намагніченості магнітних наночастинок від зовнішнього магнітного поля залежить ефективність їх магнітної сепарації [5–10].

Використання магнітних властивостей залізо- та марганецьокисних бактерій для очищення питної води вивчене поки що недостатньо. Проте дослідження можливостей їх застосування в технологіях магнітної сепарації дасть змогу запропонувати нові біотехнології очищення води з надмірним вмістом заліза та марганцю. У цьому напрямі важливу прогностичну інформацію надають методи біоінформатики.

Так, класифікацію мікроорганізмів, які здатні біомінералізувати БМН, за їх магнітними властивостями, запропоновано в [5], де умовно виділено 4 групи мікроорганізмів залежно від магнітних властивостей та місця локалізації БМН відносно клітини. Група 1 включає мікроорганізми, які формують позаклітинні аморфні БМН. Група 2 представлена мікроорганізмами, які утворюють позаклітинні кристалічні БМН. До групи 3 відносяться мікроорганізми, які синтезують внутрішньоклітинні аморфні БМН. Групу 4 становлять мікроорганізми, у клітинах яких виявлено кристалічні БМН, у т.ч. магнетитвмісні.

Мета нашої роботи полягала в пошуку потенційних продуцентів БМН серед залізо-

та марганецьокисних бактерій і класифікації останніх за типом внутрішньої структури (кристалічна чи аморфна) та місцем локалізації БМН (зовнішньоклітинна чи внутрішньоклітинна) з використанням методів порівняльної геноміки. Виявлення потенційних продуцентів БМН серед залізо- та марганецьокисних бактерій та їх класифікація за типом внутрішньої структури і місцем локалізації БМН дадуть змогу диференціювати біотехнологічний процес видалення сполук заліза та марганцю з питної води, а також оцінити перспективність використання технологій магнітної сепарації для інтенсифікації процесів водопідготовки.

Матеріали і методи

У дослідженні використано методи попарного та множинного вирівнювання з використанням вільної в доступі програми “BLAST” Національного центру біотехнологічної інформації [11]. За допомогою методів порівняльної геноміки проведено вирівнювання протеомів залізо- і марганецьокисних бактерій з протеомом магнітотаксисної бактерії (МТБ) *Magneto-spirillum gryphiswaldense* MSR-1, механізм біомінералізації БМН якої вивчений докладно [12, 13].

Проведено порівняння амінокислотних послідовностей білків групи Mat, без яких неможлива біомінералізація БМН у *Magneto-spirillum gryphiswaldense* MSR-1, з протеомами мікроорганізмів, здатних до видалення заліза й марганцю із питної води, а саме 30 представників, які належать до 5 основних родів (р. *Gallionella*, р. *Siderocapsa*, р. *Sphaerotilus*, р. *Hyphomicrobium*, р. *Leptothrix*), здатних до знезалізнення та деманганізації.

При вирівнюванні послідовностей для оцінки ступеня подібності амінокислотних послідовностей білків враховувалися такі показники: Ident – кількість ідентичних амінокислотних залишків порівнюваних білків при оптимальному вирівнюванні; E-число – показник, який відображає статистичну значимість вирівнювання; зниження його значення вказує на менший рівень прояву фактора випадковості при збігу амінокислотних залишків порівнюваних білків; Length – довжина вирівнювання (довжина вирівнювання має бути >100 амінокислотних залишків) [14].

Результати

Вирівнювання білків МТБ MamA, MamB, MamM, MamE, MamO і MamK, за наявності яких прогнозується біомінералізація БМН, і білків залізо- та марганецьокисних бактерій, наведено в табл. 1–4.

У табл. 1–4 використано такі позначення:
 ● – геном організму розшифровано повністю;
 ● – геном організму розшифровано на $\frac{3}{4}$; ● – геном організму розшифровано на $\frac{1}{2}$; ● – геном організму розшифровано на $\frac{1}{4}$.

Таблиця 1: Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 й амінокислотних послідовностей білків залізо- та марганецьокисних бактерій р. *Gallionella*

Група	Досліджуваний організм	Повнота геному	E-число					
			Ident (%)					
			Length					
			Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
			MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
4	<i>Gallionella ferruginea</i> subsp. <i>capsiferriformans</i>	●	2e-09	4e-37	9e-25	3e-09	5e-38	6e-04
			25	27	28	26	43	24
			138	286	262	171	185	303
4	<i>Gallionella ramosa</i>	●	6e-07	6e-05	7e-06	3e-12	4e-39	3e-04
			23	27	30	29	46	25
			195	115	102	178	184	334
4	<i>Gallionella acididurans</i> ShG14-8	●	3e-13	1e-34	8e-22	5e-07	4e-34	2e-04
			25	27	28	28	45	23
			186	279	260	148	171	301
4	<i>Gallionella capsiferriformans</i> ES-2	●	5e-12	1e-37	5e-26	8e-10	2e-38	2e-04
			24	27	28	26	43	24
			210	286	262	171	185	303

Таблиця 2: Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 й амінокислотних послідовностей білків залізо- та марганецьокисних бактерій р. *Siderocapsa* і р. *Sphaerotilus*

Група	Досліджуваний організм	Повнота геному	E-число					
			Ident (%)					
			Length					
			Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
			MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
			Рід <i>Siderocapsa</i>					
4	<i>Siderocapsa amnicola</i> JOSHI_001	●	4e-08	1e-14	2e-16	3e-09	7e-36	2e-04
			30	26	26	31	45	24
			120	184	264	165	164	300
			Рід <i>Sphaerotilus</i>					
4	<i>Sphaerotilus fluitans</i>	●	0,008	4e-34	3e-28	7e-10	9e-34	0,001
			23	30	31	27	44	23
			98	265	268	164	177	295
4	<i>Sphaerotilus dichotomus</i>	●	0,008	4e-34	3e-28	7e-10	9e-34	0,001
			23	30	31	27	44	23
			98	265	268	164	177	295
4	<i>Sphaerotilus natans</i>	●	0,008	4e-34	3e-28	7e-10	9e-34	0,001
			23	30	31	27	44	23
			98	265	268	164	177	295
–	<i>Sphaerotilus natans</i> subsp. <i>Natans</i> DSM 6575	●	0,007	2,0	0,32	7e-10	5e-34	2,2
			23	36	32	27	44	33
			98	42	93	164	177	86

Таблиця 3: Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 й амінокислотних послідовностей білків залізо- та марганецьокисних бактерій р. *Hyphomicrobium*

Група	Досліджуваний організм	Повнота геному	E-число					
			Ident (%)					
			Length					
			Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
			MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
2	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>	●	8e-07	6e-16	3e-18	2e-12	3e-39	5,7
			27	24	25	30	45	33
			153	257	278	166	190	73
4	<i>Hyphomicrobium facile</i> / <i>Hyphomicrobium facilis</i>	●	4e-08	2e-14	7e-18	1e-13	2e-39	0,047
			28	22	25	33	46	27
			169	269	281	167	188	201
4	<i>Hyphomicrobium sp. S1</i> / <i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	●	5e-06	3e-14	2e-17	3e-08	1e-37	0,018
			24	26	26	29	48	22
			136	185	265	164	168	294
2	<i>Hyphomicrobium sp. MC1</i>	●	4e-06	0,025	4e-05	2,5	1,2	2.2
			22	30	34	29	45	31
			160	73	59	126	29	49
4	<i>Hyphomicrobium sp. CS1BSMeth3</i>	●	2e-06	2e-22	7e-19	3e-10	2e-39	2e-06
			24	28	27	30	45	27
			151	270	274	173	188	304
2	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i>	●	7e-06	1e-17	3e-17	1e-08	2e-39	24
			34	27	27	29	44	30
			95	183	262	156	191	93
2	<i>Hyphomicrobium sp. 12-62-95</i>	●	5e-08	3e-07	2e-12	2e-08	2e-39	8,7
			27	25	25	28	43	29
			161	72	265	161	195	91
4	<i>Hyphomicrobium sp. 32-62-53</i>	●	2e-07	3e-08	1e-04	1e-09	5e-41	2e-04
			27	25	22	27	43	25
			77	208	91	176	195	339
2	<i>Hyphomicrobium sp. GJ21</i>	●	3e-06	2e-15	6e-19	2e-07	9e-39	35
			25	23	25	28	44	37
			153	269	284	164	190	41
4	<i>Hyphomicrobium sp. NDB2Meth4</i>	●	4e-06	7e-14	1e-16	1e-10	3e-38	0,004
			29	25	25	30	46	25
			109	189	283	164	188	212
4	<i>Hyphomicrobium sp. 99</i>	●	5e-08	7e-16	6e-18	3e-12	4e-38	0,001
			23	24	24	31	45	26
			166	258	267	143	188	309
2	<i>Hyphomicrobium sp. SCN 65-11</i>	●	2e-06	0,035	3e-05	8e-09	2e-30	16
			24	26	28	29	45	39
			151	91	173	164	181	54
2	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> ATCC 51888	●	8e-07	6e-16	3e-18	2e-12	3e-39	5,7
			27	24	25	30	45	33
			153	257	278	166	190	73
2	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> INES1	●	8e-07	1e-11	5e-14	0,41	3e-39	5,6
			27	22	23	31	45	33
			153	277	269	121	190	73
2	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> NL23	●	5e-08	5e-16	1e-16	3e-07	7e-31	7,2
			29	29	26	30	39	28
			134	185	287	165	198	39

Таблиця 4: Вирівнювання амінокислотних послідовностей білків магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 й амінокислотних послідовностей білків залізо- та марганецьокисних бактерій р. *Hyphomicrobium*

Група	Досліджуваний організм	Повнота геному	<i>E</i> -число					
			Ident (%)					
			Length					
			Білки <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1					
			MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
4	<i>Leptothrix valderiana</i>	●	2e-09	2e-17	1e-22	1e-06	4e-31	5e-12
			31	29	30	28	45	27
			137	184	247	177	167	304
4	<i>Leptothrix buccalis</i>	●	7e-09	1e-24	5e-27	3e-14	1e-34	5e-10
			27	25	24	29	41	25
			136	280	281	166	166	300
4	<i>Leptothrix cholodnii</i> / <i>Leptothrix</i> sp. OUMS1	●	8e-09	2e-40	2e-30	2e-08	1e-34	0,003
			23	32	30	28	44	23
			192	259	286	184	178	300
1	<i>Leptothrix ochracea</i>	●	0,43	9e-17	1e-18	0,76	1,0	3,4
			35	26	26	25	33	24
			40	184	216	56	39	97
2	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6	●	8e-09	2e-40	2e-30	2e-07	9e-35	12
			23	32	30	28	44	33
			192	259	286	167	178	48
–	<i>Leptothrix ochracea</i> L12	●	0,86	0,29	1,2	1,6	2,8	9,1
			29	24	28	33	33	36
			41	46	54	33	64	33

Обговорення

Згідно з результатами проведеного біоінформаційного аналізу серед 30 видів досліджених залізо- та марганецьокисних бактерій 5-ти родів потенційними продуцентами БМН є 28 мікроорганізмів. Для мікроорганізмів *Sphaerotilus natans* subsp. *natans* DSM 6575 та *Leptothrix ochracea* L12 поки що неможливо прогнозувати біомінералізацію БМН, оскільки їх геноми секвеновано не повністю.

Бактерії *Leptothrix ochracea*, які здатні синтезувати зовнішньоклітинні аморфні БМН, віднесено до 1-ї групи. Це може бути пов'язано з тим, що представники роду *Leptothrix* накопичують оксиди заліза в чохлах.

Мікроорганізми іншої групи із 10 видів (*Hyphomicrobium denitrificans*, *Hyphomicrobium* sp. MC1, *Hyphomicrobium zavarzinii*, *Hyphomicrobium* sp. 12-62-95, *Hyphomicrobium* sp. GJ21, *Hyphomicrobium* sp. SCN 65-11, *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888, *Hyphomicrobium denitrificans* INES1, *Hyphomicrobium nitrativorans* NL23, *Leptothrix cholodnii* SP-6) здатні синтезувати зовнішньоклітинні кристалічні БМН і відносяться до 2-ї групи.

Нарешті, 17 представників залізо- та марганецьокисних бактерій, здатних синтезувати внутрішньоклітинні кристалічні БМН (*Gallionella ferruginea* subsp. *capsiferiformans*, *Gallionella ramosa*, *Gallionella acididurans* ShG14-8, *Gallionella capsiferiformans* ES-2, *Siderocapsa amnicola* JOSHI_001, *Sphaerotilus fluitans*, *Sphaerotilus dichotomus*, *Sphaerotilus natans*, *Hyphomicrobium facile*/*Hyphomicrobium facilis*, *Hyphomicrobium* sp. S1/*Hyphomicrobium sulfonivorans*, *Hyphomicrobium* sp. CS1BSMeth3, *Hyphomicrobium* sp. 32-62-53, *Hyphomicrobium* sp. NDB2Meth4, *Hyphomicrobium* sp. 99, *Leptothrix valderiana*, *Leptothrix buccalis*, *Leptothrix cholodnii*/*Leptothrix* sp. OUMS1), віднесено до 4-ї групи.

Низкою дослідників експериментально доведено здатність до біомінералізації кристалічних залізо- та марганецьовмісних наночастинок, наприклад *Gallionella ferruginea* [15–17], *Leptothrix discophora* [18–20], *Sphaerotilus natans* [21, 22], а також деяких представників р. *Siderocapsa* [20], що підтверджує достовірність нашого біоінформаційного аналізу.

Висновки

Проведені біоінформаційні дослідження свідчать про наявність природних видів різних

родів залізо- та марганецьокисних бактерій, здатних до формування БМН. Зокрема, виявлено, що потенційними продуцентами БМН серед 30 досліджених штамів є 28 мікроорганізмів, які належать до 5 родів: р. *Gallionella*, р. *Siderocapsa*, р. *Sphaerotilus*, р. *Hyphomicrobium*, р. *Leptothrix*.

Показано, що 27 із 28 досліджених видів мікроорганізмів синтезують кристалічні (внутрішньоклітинні та зовнішньоклітинні) БМН і тільки один вид здатен утворювати аморфну зовнішньоклітинну магнітосому.

У вирішенні проблеми очищення питної води від сполук заліза та марганцю з використанням магнітної сепарації перспективним є застосування біотехнологій на основі досліджених мікроорганізмів, які накопичують магнітосоми.

Результати біоінформаційного аналізу вказують на актуальність подальших експериментальних досліджень взаємодії магнітного поля з мікроорганізмами родів *Leptotrix*, *Sphaerotillus*, *Gallionella*, *Hyphomicrobium*, особливо вивчення поведінки залізо- та марганецьокисних бактерій з накопиченими магнітосомами. Дослідження особливостей вилучення таких мікроорганізмів із води за допомогою магнітного поля дасть змогу розробити технологічні режими магнітної сепарації для запобігання вторинній контамінації питної води та утворенню відкладень у трубопроводах. Іншим напрямом використання магнітосомних властивостей досліджених мікроорганізмів є розроблення шляхів видалення відкладень усередині трубопроводів для очищення їх внутрішньої поверхні, а отже, і для запобігання погіршенню якості води під час її транспортування.

References

- [1] Iron bacteria in drinking water supply systems [Internet]. Wwtec.ru. 2018 [cited 1 February 2018]. Available from: <http://wwtec.ru/index.php?id=418>
- [2] Prokopov VO. Drinking water in Ukraine: Medico-ecological and sanitary-hygienic aspects. Kyiv: VSV "Medicina"; 216. 400 p.
- [3] Kravchenko O. Development of methods for identification of microbial cultures that are able to oxidize iron and manganese compounds in natural waters. Problemy Vodopostachannya, Vodovidvedennya ta Hidravliki. 2014;24:140-5.
- [4] Yan L, Da H, Zhang S, Lypez V, Wang W. Bacterial magnetosome and its potential application. Microbiol Res. 2017;203:19-28. DOI: 10.1016/j.micres.2017.06.005
- [5] Gorobets OYu, Gorobets SV, Sorokina LV. Biomineralization and synthesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi. Functional Mater. 2014;21(4):427-36. DOI: 10.15407/fm21.04.427
- [6] Gorobets O, Gorobets S, Gorobets Y. Biogenic magnetic nanoparticles: Biomineralization in prokaryotes and eukaryotes. 3rd ed. Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. New York: CRC Press; 2014. p. 300-8.
- [7] Gorobets O, Gorobets S, Koralewski M. Physiological origin of biogenic magnetic nanoparticles in health and disease: From bacteria to humans. Int J Nanomed. 2017;12:4371-95. DOI: 10.2147/IJN.S130565
- [8] Gorobets S, Gorobets O, Butenko K. Potential producers of biogenic magnetic nanoparticles among pathogenic and opportunistic microorganisms. Naukovi Visti NTUU KPI. 2015;3:23-32.
- [9] Gorobets S, Gorobets O, Gorobets Yu. Biomineralization of intracellular biogenic magnetic nanoparticles and their possible functions. Naukovi Visti NTUU KPI. 2013;3:28-33.
- [10] Gorobets S, Mikhaylenko N. High gradient ferromagnetic matrices for waste water purification, obtained by magnetoelectrolysis method. J Water Chem Technol. 2014;3:153-9.
- [11] BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. Blast.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 22 February 2018]. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- [12] Ullrich S, Kube M, Schubbe S, Reinhardt R, Schuler D. A hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth. J Bacteriol. 2005;187(21):7176-84. DOI: 10.1128/JB.187.21.7176-7184.2005
- [13] Schübbe S, Würdemann C, Peplies J, Heyen U, Wawer C, Glöckner F, et al. Transcriptional organization and regulation of magnetosome operons in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Appl Environ Microbiol. 2006;72(9):5757-65. DOI: 10.1128/AEM.00201-06
- [14] Li W, Pio F, Pawlowski K, Godzik A. Saturated BLAST: An automated multiple intermediate sequence search used to detect distant homology. Bioinformatics. 2000 Dec;16(12):1105-10. DOI: 10.1093/bioinformatics/16.12.1105
- [15] Hallberg R, Ferris F. Biomineralization by *Gallionella*. Geomicrobiol J. 2004;21(5):325-30. DOI: 10.1080/01490450490454001

- [16] Suzuki T, Hashimoto H, Matsumoto N, Furutani M, Kunoh H, Takada J. Nanometer-scale visualization and structural analysis of the inorganic/organic hybrid structure of *Gallionella ferruginea* twisted stalks. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(9):2877-81. DOI: 10.1128/AEM.02867-10
- [17] Søgaard E, Aruna R, Abraham-Peskir J, Bender Koch C. Conditions for biological precipitation of iron by *Gallionella ferruginea* in a slightly polluted ground water. *Appl Geochem*. 2001;16(9-10):1129-37. DOI: 10.1016/S0883-2927(01)00014-2
- [18] Shi X, Avci R, Lewandowski Z. Electrochemistry of passive metals modified by manganese oxides deposited by *Leptothrix discophora*: Two-step model verified by ToF-SIMS. *Corrosion Sci*. 2002;44(5):1027-45. DOI: 10.1016/S0010-938X(01)00104-4
- [19] Banfield J. Aggregation-based crystal growth and microstructure development in natural iron oxyhydroxide biomineralization products. *Science*. 2000;289(5480):751-4. DOI: 10.1126/science.289.5480.751
- [20] Keim C, Nalini H, de Lena J. Manganese oxide biominerals from freshwater environments in Quadrilatero Ferrifero, Minas Gerais, Brazil. *Geomicrobiol J*. 2014;32(6):549-59. DOI: 10.1080/01490451.2014.978513
- [21] Seder-Colomina M, Morin G, Benzerara K, Ona-Nguema G, Pernelle J, Esposito G, et al. *Sphaerotilus natans*, a neutrophilic iron-related sheath-forming bacterium: Perspectives for metal remediation strategies. *Geomicrobiol J*. 2013;31(1):64-75. DOI: 10.1080/01490451.2013.806611
- [22] Park S, Kim D, Lee J, Hur H. *Sphaerotilus natans* encrusted with nanoball-shaped Fe(III) oxide minerals formed by nitrate-reducing mixotrophic Fe(II) oxidation. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;90(1):68-77. DOI: 10.1111/1574-6941.12372.

С.В. Горобец, А.В. Кравченко, М.А. Булаевская, Е.С. Панченко

БИОИНФОРМАЦИОННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ СРЕДИ БАКТЕРИЙ, ОКИСЛЯЮЩИХ ЖЕЛЕЗО И МАРГАНЕЦ

Проблематика. В Украине более 17 % подземных водозаборов относятся к некондиционным по содержанию железа и 4,4 % – по содержанию марганца. Повышенное содержание этих элементов приводит к ухудшению органолептических свойств питьевой воды, к образованию осадков и зарастанию водопроводных сетей из-за развития железобактерий. Поэтому актуальным является исследование магнитных свойств бактерий, окисляющих железо и марганец, для возможности их применения в технологиях магнитной сепарации с целью усовершенствования технологий очистки воды с избыточным содержанием железа и марганца.

Цель. Цель работы заключается в поиске потенциальных продуцентов биогенных магнитных наночастиц (БМН) среди бактерий, окисляющих железо и марганец, и классификации последних по типу внутренней структуры (кристаллическая или аморфная) и месту локализации БМН (внеклеточная или внутриклеточная) с использованием методов сравнительной геномики.

Методика реализации. Для оценки степени сходства белков биоминерализации БМН у магнитотаксисной бактерии *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 и у бактерий, окисляющих железо и марганец, применены методы парного и множественного выравнивания с использованием свободной в доступе программы "BLAST" Национального центра биотехнологической информации.

Результаты. Проведенный биоинформационный анализ показал, что среди 30 исследуемых бактерий, окисляющих железо и марганец, которые принадлежат к 5 родам (р. *Gallionella*, р. *Siderocapsa*, р. *Sphaerotilus*, р. *Hyphomicrobium*, р. *Leptothrix*), 28 микроорганизмов являются потенциальными продуцентами БМН.

Выводы. Сделаны выводы о перспективности дальнейшего исследования влияния магнитного поля на микроорганизмы р. *Leptothrix*, р. *Sphaerotillus*, р. *Gallionella*, р. *Hyphomicrobium*. Важным направлением для дальнейших экспериментов является изучение возможных путей проведения магнитной сепарации бактерий, окисляющих железо и марганец, для предотвращения вторичной контаминации питьевой воды и образования отложений в трубопроводах. Использование магнитных свойств исследованных микроорганизмов полезно для разработки путей удаления застарелых отложений внутри трубопроводов.

Ключевые слова: окисляющие железо и марганец бактерии; биогенные магнитные наночастицы; биоминерализация; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Мат-белки; очистка воды.

S.V. Gorobets, O.V. Kravchenko, M.O. Bulaievska, O.S. Panchenko

BIONFORMATION DETECTION OF MAGNETIC NANOPARTICLES PRODUCERS AMONG IRON- AND MANGANESE-OXIDIZING BACTERIA

Background. In Ukraine, more than 17 % of underground water intakes are classified as unfunded in terms of iron content and 4.4 % in terms of manganese content. The increased content of these elements leads to a deterioration in the organoleptic properties of drinking water, the formation of precipitation and overgrowing of the water supply networks due to the development of iron-oxidizing bacteria. Therefore, it is important to study the magnetic properties of iron- and manganese-oxidizing bacteria for the possibility of their use in magnetic separation technologies in order to improve water treatment technologies with excess iron and manganese content.

Objective. The aim of the paper is to search for potential producers of BMN among iron- and manganese-oxidizing bacteria and classify them by an internal structure (crystalline or amorphous) and BMN allocation (extracellular or intracellular), using comparative genomics methods.

Methods. To evaluate the degree of similarity of BMN biomineralization proteins in MTB *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 and in iron- and manganese-oxidizing bacteria, pair and multiple alignment methods using the free access program BLAST of the National Center for Biotechnological Information were used.

Results. The bioinformatic analysis showed that among the 30 investigated iron- and manganese-oxidizing bacteria which belong to 5 genera (*Gallionella*, *Siderocapsa*, *Sphaerotilus*, *Hyphomicrobium*, *Leptothrix*), 28 microorganisms are potential producers of BMN.

Conclusions. Conclusions are made about the prospects of further investigation of the influence of the magnetic field on the microorganisms of genera: *Leptotrix*, *Sphaerotillus*, *Gallionella*, *Hyphomicrobium*. An important direction for further experiments is the study of possible ways of conducting magnetic separation of iron- and manganese-oxidizing bacteria to prevent secondary contamination of drinking water and the formation of scales in pipelines. The use of the magnetic properties of the investigated microorganisms is useful for the development of ways to remove old scales within pipelines.

Keywords: iron- and manganese-oxidizing bacteria; biogenic magnetic nanoparticles; biomineralization; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1; Mam-proteins; water purification.

СПЕЦИФІЧНА АКТИВНІСТЬ ПРЕПАРАТІВ *STREPTOMYCES ALBUS* У БІОРЕГУЛЯЦІЇ РОСТУ І РОЗВИТКУ РОСЛИН ОГІРКА

Н.Я. Левчик¹, А.В. Любінська¹, Я.О. Герасименко², Т.С. Тодосійчук^{2*}

¹Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України, Київ, Україна

²КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: todosiichuk@i.ua

Received 2 May 2018; Accepted 15 June 2018

Проблематика. Наукові основи розробки полікомпонентних препаратів мікробного походження для рослинництва, що проявляють широку специфічність біологічної дії.

Мета. Встановлення біологічної активності дослідних зразків препаратів *S. albus* UN44 щодо процесів біорегуляції рослин огірка для подальшого обґрунтування напрямів оптимізації готових форм і способів застосування.

Методика реалізації. Досліджувані препарати отримували культивуванням продуцента *S. albus* UN44 із подальшим відділенням біомаси та (в одному з варіантів) термічною стерилізацією фуґату. Насіння огірка сорту Конкурент оброблювали розчинами препаратів та визначали рістстимуляцію, метаболічну активність рослин і стан стресу.

Результати. Встановлено, що Біопрепарат-1 стимулює ріст кореня та стебла огірка після обробки насіння розчином у концентрації 15–22 од/мл (або 1–1,5 %). Отримані дані свідчать, що біологічна активність препаратів культури може бути зумовлена наявністю гормонів класу ауксинів, які раніше не були ідентифіковані серед її метаболітів. Уперше показано здатність біопрепаратів *S. albus* UN44 впливати на вміст проліну в рослині огірка, а отже, на її стресостійкість.

Висновки. Результати роботи є підставою для вивчення нових біологічно активних продуктів *S. albus* UN44 та оптимізації готових форм препаратів, а саме стерильної рідкої форми та сухого комплексного препарату, а також препаратів окремих метаболітів із цільовою високоспецифічною активністю. Здатність дослідних препаратів впливати на стресостійкість рослини потребує додаткового вивчення і обумовлює можливість створення засобу для корегування наслідків дії на рослині різних негативних факторів.

Ключові слова: *S. albus* UN44; біопрепарати; огірки сорту Конкурент; біологічна активність; стимуляція росту; метаболічна активність; стресостійкість.

Вступ

Препарати мікробного походження давно знайшли своє застосування в аграрному виробництві у світі, а в Україні вони до того ж становлять значну частину продукції сучасної біотехнологічної промисловості [1]. Окрім високої ефективності, це зумовлено їх безпечністю, невисокою вартістю та широким спектром біологічної дії.

Серед мікробних продуцентів різних біопрепаратів, у т.ч. для рослинництва, часто використовують актиноміцети роду *Streptomyces*. Більше половини досліджених останніми роками нових інсектицидів і гербіцидів є метаболітами стрептоміцетів, а більшість їх видів здатні до синтезу антибіотичних сполук [2, 3]. Актиноміцети були виявлені в асоціаціях з рослинами, де вони стимулювали ріст і захищали від комах завдяки продукуванню біологічно активних спо-

лук, а також біостимуляції і біозахисту. Мікроорганізми, що існують поряд із рослинами, можуть звести до мінімуму проблеми, спричинені фітопатогенами, насамперед завдяки конкурентній колонізації кореневої системи. Стрептоміцети можуть додатково сприяти мінеральному постачанню через синтез сидерофорів і системи поглинання сидерофорів, а стимуляція росту рослин відбуватися за рахунок продукування мікроорганізмами метаболічних сполук з фітогормональною активністю [3–5].

Значний спектр метаболітів, що часто синтезує один продуцент, відкриває можливості до створення препаратів комплексної дії на його основі. Але одночасно це вимагає визначення спрямованості біологічної дії, ефективних доз і режимів обробки рослин [6]. До таких продуцентів належить культура *Streptomyces albus* (первісно *recifensis* v. *lyticus*), рістстимулювальна активність якої тривалий час пов'язувалася насамперед із

синтезом комплексу ферментів [7, 8]. Однак встановлена останнім часом антагоністична здатність культури щодо фітопатогенів і синтез комплексу антибіотичних сполук селекціонованим штамом *S. albus* UN44 роблять актуальними дослідження особливостей біологічного впливу препаратів на його основі [9, 10].

Тому задачею нашої роботи був аналіз специфічної активності препаратів *S. albus* UN44 щодо процесів біорегуляції рослин огірка з метою подальшого обґрунтування напрямів оптимізації готових форм препарату і способів його застосування.

Матеріали і методи

У роботі використовували дослідні зразки препарату Стрептофунгін-Фіто – Біопрепарат-1 (нативний фугат культуральної рідини) та стерильний Біопрепарат-2 (автоклавований фугат культуральної рідини), які отримували культивуванням штаму *Streptomyces albus* UN44 із музею кафедри промислової біотехнології КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Для підтримки культури використовували середовище Гаузе, а для біосинтезу препарату – живильне середовище на основі соєвого борошна та крохмалю [11]. Біосинтез проводили при перемішуванні (160 об/хв) за температури 28 ± 1 °C протягом 96 год. Після завершення процесу біомасу відділяли центрифугуванням, а активність препарату стандартизували за літичною активністю, яку визначали турбідиметричним методом щодо ліофілізованої тест-культури *Lactobacillus bulgaricus* [11].

Для вивчення специфічності біологічного впливу зразків препарату використовували насіння огірка *Cucumis sativus* L. сорту Конкурент із колекції відділу культурної флори Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України. Дослідження рістстимулювальної активності біопрепаратів проводили за методикою вирощування рослин методом водної культури *in vivo* [12]. Насіння замочували на 30 хв у слабкому розчині перманганату калію та пророщували при 26 °C до накльовування, після чого проростки обробляли досліджуваними біопрепаратами в різних концентраціях. Контролем слугували проростки, вирощені на дистильованій воді. Культивування проводилось при 26–28 °C в умовах природного освітлення. За рослинами вели фенологічні спостереження, стан проростків оцінювали на 3 і 7-му добу за морфометричними показниками (висота пагонів, довжина коренів, розмір сім'ядолі). Повторюваність дослідів трикратна.

Визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів у зеленій масі вирощених *in vitro* рослин здійснювали спектрофотометричним методом за загальноприйнятою методикою Wellburn [13]. Пігменти екстрагували диметилсульфоксидом із наважки зеленої частини рослин протягом 3 год за температури 68 °C, після чого вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 480, 649, 665, 652 нм. Вміст вільного проліну в рослинах визначали за методикою Bates у модифікації за Г. Шихалєєвою та співавторами [14] з використанням кислого нінгідринного реактиву. Результати досліджень оброблювали статистично з використанням програми Microsoft Office Excel.

Результати

На першому етапі роботи у зазначених вище умовах проводили напрацювання дослідних зразків препарату з використанням продуцента комплексу біологічно активних речовин *S. albus* UN44. Літична активність Біопрепарату-1 становила 1500 од/мл, а стерильний Біопрепарат-2 відрізнявся відсутністю термолабільних метаболітів культури (у т.ч. ферментів) унаслідок термічної стерилізації. Вибір діапазону концентрацій біопрепаратів для обробки насіння та дослідження їх впливу на ростові процеси огірка проводили на основі даних літератури та власних результатів досліджень щодо інших культур [2, 5, 7, 10].

Обробка насіння Біопрепаратом-1 без розведення (100 %) призводила до повного пригнічення процесів накльовування та росту рослини огірка, що є свідченням високої концентрації біологічно активних речовин (рис. 1). Через 5 діб росту оброблене Біопрепаратом-1 у концентраціях 0,1 та 1,0 % насіння візуально (див. рис. 1) та за морфометричними показниками рослин (табл. 1) відрізнялося від контролю в межах 5–20 %.

Однак спрямованість біологічної дії використаних концентрацій препарату була різною: нижча з них сприяла збільшенню довжини кореня на 6 %, але на 5 % пригнічувала ріст стебла. Протилежний ефект проявляв препарат у концентрації 1,0 %, підвищуючи довжину стебла на 19 %.

У той же час після обробки препаратом в обох концентраціях розмір сім'ядолі проростка збільшувався, але більш суттєво при застосуванні 1 %-ного розчину. Зважаючи на виявлені впливи, надалі було розширено діапазон концентрацій препарату, яким проводили обробку насіння, від 0,01 до 5 %.

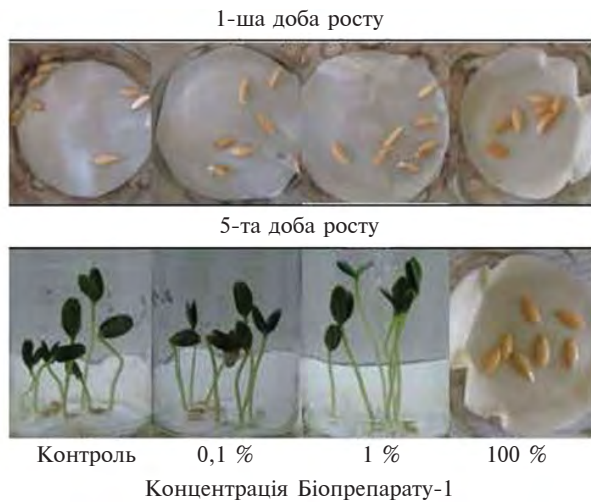


Рисунок 1: Вплив Біопрепарату-1 на швидкість проростання насіння огірка

Таблиця 1: Вплив Біопрепарату-1 на морфометричні показники проростків огірка на 5-ту добу росту

Показник	Контроль	Концентрація Біопрепарату-1	
		0,1 %	1,0 %
Довжина кореня, %	100 ± 2,0	106 ± 3,0*	98 ± 1,8
Довжина стебла, %	100 ± 3,0	95 ± 2,4*	119 ± 4,5*
Розмір сім'ядолі, мм			
довжина	11,6 ± 0,9	13,0 ± 1,1	14,3 ± 1,2*
ширина	6,6 ± 0,3	7,0 ± 0,2*	8,6 ± 0,3*

*Статистично достовірні відмінності відносно контролю ($p < 0,05$).

Показано (рис. 2), що препарат у діапазоні концентрації 1–1,5 % чинить найвищий позитивний вплив на ріст кореня та стебла огірка на 3 і 7-му добу росту. Одночасно чітко видно, що максимуми таких ефектів не однакові: ріст кореня більше стимулюють нижчі концентрації препарату (0,05–1 %), ніж ріст стебла (1–2 %). Нечікувані результати показала обробка насіння препаратом у найнижчій концентрації (0,01 %), а саме суттєве пригнічення розвитку рослин відносно контролю (див. далі п. “Обговорення”).

Враховуючи встановлені залежності впливу препарату в досліджених концентраціях на ростові процеси огірка, надалі в роботі використовували обробку насіння 1 %-ними розчинами обох зразків (нативного та стерилізованого автоклавуванням). Після вирощування насіння впродовж 20 діб в умовах *in vitro* проводили комплексний аналіз вмісту основних функціональних речовин у складі зеленої маси рослин огірка.

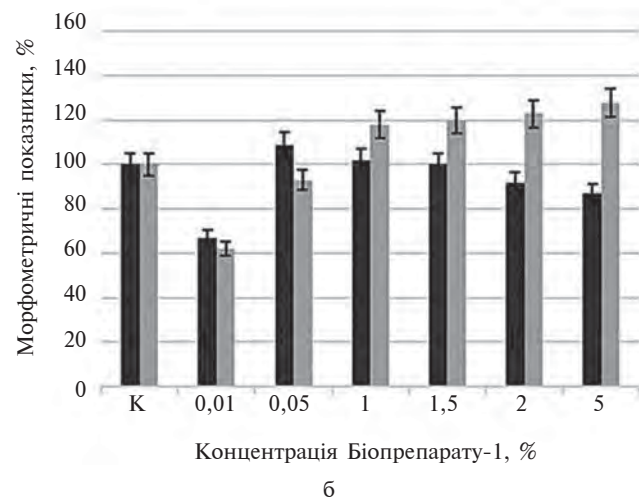
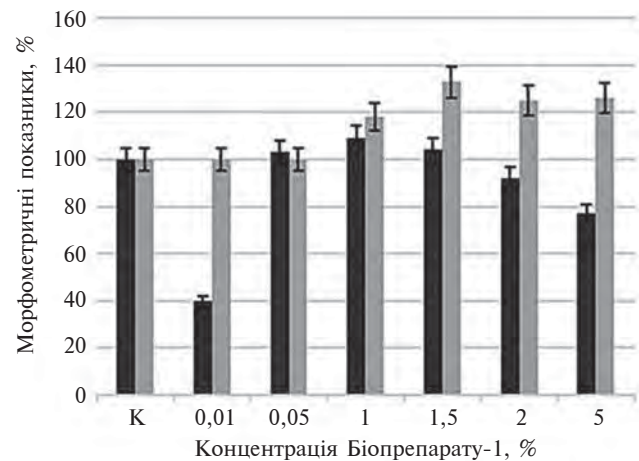


Рисунок 2: Вплив Біопрепарату-1 на морфометричні показники* рослин огірка на 3-тю (а) і 7-му (б) добу росту (*наведені дані при $p < 0,05$; статистично достовірні відмінності відносно контролю показані для концентрацій препарату 0,01; 1; 1,5 і 5 %): ■ – довжина кореня; ■ – довжина стебла

Речовини, які визначали (хлорофіли, каротиноїди, пролін), є індикаторами стану рослин, а їх вміст свідчить про перебіг метаболізму в рослині та характер впливу зовнішніх факторів [15–17]. Встановлено (рис. 3), що при обробці огірків 1 %-ним розчином Біопрепарату-1 відбувається зниження вмісту хлорофілів і каротиноїдів приблизно на 40 %, а при застосуванні 1 %-ного розчину Біопрепарату-2 – незначне збільшення хлорофілу *a* і *b* на 5 і 11 % відповідно.

Загалом підвищення вмісту хлорофілів свідчить про підвищення інтенсивності метаболізму в рослині, але для процесу фотосинтезу більш важливим є не абсолютний вміст пігментів, а їх співвідношення. Вони можуть показувати порушення у функціонуванні світозбиральних комп-

Таблиця 2: Вплив біопрепаратів на співвідношення хлорофілів (*a* і *b*) та каротиноїдів (*car*) у 20-добових рослинах огірка

Варіант обробки	Співвідношення вмісту пігментів, мг/г сухої маси рослин					
	<i>Ca/Cb</i>		<i>Ca + Cb</i>		<i>(Ca + Cb)/Ccar</i>	
Біопрепарат-1, 1 %	1,14 ± 0,04*	94 %	5,70 ± 0,17*	64 %	4,53 ± 1,14	112 %
Біопрепарат-2, 1 %	1,14 ± 0,03*	94 %	9,80 ± 0,39	108 %	5,38 ± 0,21*	133 %
Контроль	1,22 ± 0,04	100 %	9,05 ± 0,27	100 %	4,02 ± 1,05	100 %

*Статистично достовірні відмінності відносно контролю ($p < 0,05$).

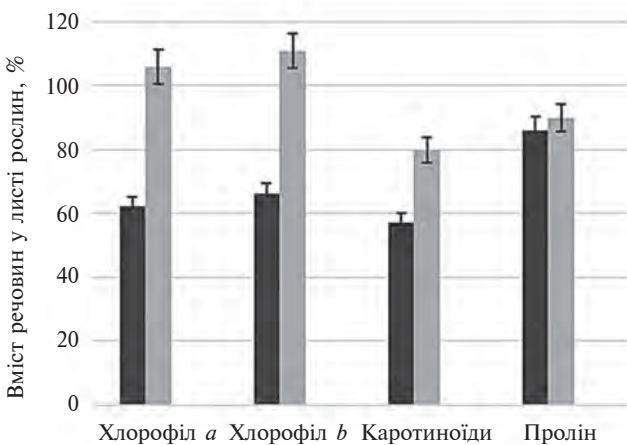


Рисунок 3: Вплив досліджуваних препаратів на вміст функціональних речовин у зеленій масі рослин огірка на 20-ту добу росту (наведені дані при $p < 0,05$; статистично достовірні відмінності відносно контролю показані для Біопрепарату-2 щодо хлорофілів): ■ – Біопрепарат-1; ■ – Біопрепарат-2; контроль – 100 %

лексів і реакційних центрів фотосистем (співвідношення хлорофілів *a/b*), а також стійкість хлорофілів до фоторуйнування, яка визначається кількістю каротиноїдів, здатних захищати хлорофіли [16]. Тому розраховували й аналізували співвідношення вмісту хлорофілів *a/b* і хлорофілів до каротиноїдів.

Співвідношення вмісту хлорофілів *a/b* у рослин після обробки обома препаратами знижується на 6 %, що вказує на підвищену інтенсивність метаболізму (табл. 2). А загальний вміст хлорофілів значно різнився у рослин після обробки різними препаратами: знижувався до 64 % унаслідок впливу Біопрепарату-1 і на 8 % зростав при дії термічно обробленого Біопрепарату-2.

Загальний вміст каротиноїдів у рослинах після обробки Біопрепаратом-1 зменшувався, а отже, збільшувалося до 133 % співвідношення хлорофілів до каротиноїдів, вказуючи на відсутність стресових факторів, що вимагали б реакції рослини.

Свідченням останнього є також зниження вмісту вільного проліну в масі рослини, оскільки його накопичення є реакцією рослин на абіотичний стрес [15, 17].

Однак показана останнім часом важлива роль проліну в метаболізмі та стресостійкості рослин активно дискутується (як вміст у рослині, так і екзогенний вплив), що буде зазначено також нижче при обговоренні результатів.

Обговорення

Біологічна активність досліджуваних зразків препаратів зумовлена надзвичайно широким спектром метаболітів культури-продуцента *S. albus* UN44. Донедавна здатність до стимуляції ростових процесів рослин препаратами різних штамів культури пов'язували насамперед із синтезом комплексу гідролаз і певним термостабільним фактором глікопептидної природи [7, 8]. Але встановлена здатність культури до синтезу одночасно й комплексу антибіотиків дає змогу прогнозувати додаткові ефекти препаратів на її основі та нові можливості біорегуляції рослин [9]. Очевидно, також потребує подальшого аналізу та ідентифікації спектр метаболітів продуцента, зважаючи на відому біосинтетичну активність стрептоміцетів загалом [4–6].

Отримані на першому етапі проведених досліджень результати (див. рис. 1, табл. 1) дали можливість встановити вихідний діапазон концентрацій препарату, що виявляє вплив на розвиток огірка. Ця рослина має важливе практичне значення, але зустрічається як об'єкт дослідження впливу біопрепарату цієї культури-продуцента лише в поодиноких повідомленнях [7]. Однак при отриманні згаданого препарату використовували інший штам культури (2P-15) і зазначали лише загальну характеристику препарату (ГЗХ), за якою неможливо порівняти вміст ферментного комплексу в ньому, а отже, співвіднести досліджувані концентрації.

Тому показаний у нашій роботі вплив біопрепарату в концентраціях від 0,01 до 5 % при активності нативного зразка 1500 од/мл дає змогу уніфікувати розрахунки його робочих концентрацій за показниками активності. Отже, ріст кореня стимулює біопрепарат із концентрацією комплексу ферментів 0,25–15 од/мл, а ріст стебла – 15–30 од/мл. Таким чином, є можливість отримувати готовий рідкий біопрепарат у більш концентрованому розчині або сухий та готувати робочий розчин для обробки відповідно до вмісту діючих речовин – у розглядуваному випадку ферментів.

Рекомендованими концентраціями Біопрепарату-1 для передпосівної обробки насіння огірка, за даними наступного етапу досліджень (див. рис. 2), є 1–1,5 %, або 15–22 од/мл. Більш високі концентрації незначно підвищують довжину стебла порівняно із зазначеними, однак при цьому відбувається гальмування розвитку кореня на 7–12 %.

Неочікувані результати щодо значного пригнічення росту кореня та стебла мінімальними використаними концентраціями препарату (0,01 %, або 0,05 од/мл) свідчать про наявність у ньому метаболітів культури, які проявляють високу біологічну активність у наднижьких концентраціях. В іншому випадку вплив препарату в таких концентраціях взагалі не спостерігався б і значення показників росту відповідали б контролю. Серед загальновідомих подібних речовин – фітогормони, активність яких суттєво залежить від використаних концентрацій і до того ж значно коливається (від гальмування до стимуляції росту рослин) навіть за дуже близьких їх значень [2, 5, 6]. Зважаючи на те, що для стрептоміцетів (грунтових бактерій, які живуть у симбіозі з рослинами) є типовим синтез фітогормонів, висока ймовірність знаходження їх серед метаболітів продуцента *S. albus* UN44. Тому одним з очевидних напрямів подальшої роботи з культурою є аналіз продуктів біосинтезу на вміст основних груп стимуляторів росту рослин.

Подальший аналіз впливу обох біопрепаратів (1 – нативного та 2 – автоклавованого) став додатковим підтвердженням можливої наявності у складі продуктів метаболізму культури фітогормонів (див. рис. 3). Істотна різниця вмісту хлорофілів після обробки Біопрепаратом-2 порівняно з іншим зразком препарату, очевидно, пояснюється зниженням вмісту біологічно активних речовин унаслідок термічної стерилізації. За інформацією дослідників, що працювали з цією культурою продуцента, серед її метаболітів наявний певний термостабільний фактор

літів наявний певний термостабільний фактор глікопептидної природи [18].

Не виключаючи цього, зазначимо, що найбільш поширені представники такого класу фітогормонів, як ауксини (насамперед індолицтова кислота), є термостабільними сполуками і можуть цілком залишатися у препаратах після автоклавовання. Цим, вірогідно, і пояснюється біологічна активність Біопрепарату-2 щодо інтенсифікації метаболічних процесів огірка та підвищення вмісту хлорофілів. Натомість певне пригнічення метаболічної активності рослин нативним Біопрепаратом-1, про що свідчить зниження вмісту хлорофілів, може бути спричинене високим вмістом фітогормонів, у т.ч., наприклад, гіберелінів, що є термостабільними сполуками і точно відсутні у Біопрепараті-2.

Разом із тим обробка обома дослідними зразками препаратів у використаних концентраціях не викликає у рослин стресу, про що свідчить зниження на 12–15% вмісту вільного проліну в зеленій масі рослин (див. рис. 3), а отже, є можливою для біорегуляції огірків. Механізми включення проліну в метаболізм рослин настільки різноманітні (антиоксидантна, мембранопротекторна, осмолітична дія та інші), що є окремим напрямом досліджень, однак його вміст може бути важливим фактом при виборі препаратів для стимуляції росту рослин.

Висновки

Показано широкий спектр специфічної активності біопрепаратів з *S. albus* UN44 щодо біорегуляції рослин огірка *Cucumis sativus* L. сорту Конкурент, а саме здатність до стимуляції росту кореня, стебла, вплив на інтенсивність метаболізму і стан стресу.

Встановлено, що Біопрепарат-1 стимулює ріст кореня та стебла огірка після обробки насіння розчином у концентрації 15–22 од/мл (або 1–1,5 %). Разом із тим у концентрації 0,01 % препарат має значний пригнічувальний ефект, що визначає актуальність подальших досліджень активності препарату в діапазоні наднижьких концентрацій.

Висока біологічна активність Біопрепарату-1 у низьких концентраціях поряд з іншими визначеними фактами дає підстави припускати наявність у ньому (і відповідно, серед метаболітів продуцента) фітогормонів. Показана стимуляція метаболізму рослини термічно стерилізованим Біопрепаратом-2 може бути зумовлена

дією гормонів класу ауксинів, що є термостабільними сполуками.

Отримані результати є підставами для вивчення нових біологічно активних продуктів *S. albus* UN44 та оптимізації стерильної рідкої форми препарату, що матиме більш тривалий строк зберігання. Здатність обох досліджених препаратів впливати на стресостійкість рослини зумовлює можливість розробки біопрепаратів культури для зниження наслідків дії різних негативних факторів.

Фінансування

Ця робота проводилась у рамках виконання держбюджетних тем № 2033п “Створення лінії інноваційних біологічно активних продуктів для медицини, харчової промисловості та сільськогосподарства” в КПІ ім. Ігоря Сікорського та № 374-НК “Еколого-біологічні основи збереження, збагачення та ефективного використання генетичних ресурсів нових господарсько-цінних рослин України” в Національному ботанічному саду імені М.М. Гришка.

References

- [1] Kyrychenko OV. Market analysis and microbial biopreparations creation for crop production in Ukraine. *Biotechnologia Acta*. 2015;8(4):40-52. DOI: 10.15407/biotech8.04.040
- [2] Tanaka Y, Omura S. Agroactive compounds of microbial origin. *Annu Rev Microbiol*. 1993;47:57-87. DOI: 10.1146/annurev.mi.47.100193.000421
- [3] Gao F, Dai C, Liu X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr J Microbiol Res*. 2010 Jul;4(13):1346-51.
- [4] Glick RB. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)* [Internet]. 2012 Sep [cited 2012 Sep 19];15:1-15. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/cta> DOI: 10.6064/2012/963401
- [5] De Jesus Sousa JA, Olivares FL. Plant growth promotion by Streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem Biol Technol Agric* [Internet]. 2016 Aug [cited 2016 Aug 3];3(1):1-12. Available from: <https://chembioagro.springeropen.com/articles/10.1186/s40538-016-0073-5> DOI: 10.1186/s40538-016-0073-5
- [6] Biliavska LO. Actinobacteria of the genus *Streptomyces* and its metabolites in bioregulation of plants [Doctoral thesis]. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine; 2018. 47 p.
- [7] Zhernosekova IV, Tymchuk OA, Tkachenko VP, Vinnikov AI. Effect of metabolic products of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* on the vegetables sprouts growth. *Mikrobiologiya i Biotehnologiya*. 2014 Mar;1(25):79-90. DOI: 10.18524/2307-4663.2014.1(25).48252
- [8] Sokolova IE, Kylochek TP, Vinnikov AI. A biosynthesis activity of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 2004 Nov-Dec;66(6):10-7.
- [9] Todosiichuk TT, Sichel L. A novel producer of the antibiotic substances *Streptomyces albus* UN 44. 14th International Conference on the Chemistry of Antibiotics and Other Bioactive Compounds; 2015; Galveston. p. 22.
- [10] Levchyk NJ, Liubinska AV, Todosiichuk TT, Rakhmetov JB, Diakova MA. The development of biological product for plant growing on the basis of *Streptomyces albus*. *Eureka: Life Sciences*. 2016;5:32-9. DOI: 10.21303/2504-5695.2016.00235
- [11] Todosiichuk TT, Sichel L, inventors. The strain of *Streptomyces albus* – producer of lytic enzymes complex. Ukrainian patent 09478. 2015.
- [12] Voitcehivska OV, Kapustjan AV, Kosyk OI, Musijenko MM, Olhovych OP, Panjuta OO, et al. *Physiology of Plants*. Lutsk: Teren; 2010. 420 p.
- [13] Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b as well, as the total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*. 1994;144(3):307-13. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- [14] Shihalyeyeva GN, Budnyak AK, Shihalyeyev II, Ivaschenko OL. A modified method for determination of proline in plants. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: Biology*. 2014 Apr;1112(21):168-72.
- [15] Kolupaev YE, Vayner AA, Yastreb TO. Proline: Physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*. 2014 May;2(32):6-22.
- [16] Farghali KA, El-Aidarous AA. Thermostability of chlorophylls in some native species of xerophytes. *IOSR-JAVS*. 2014 Jan;6(6):52-65. DOI: 10.9790/2380-0665265
- [17] Kaur G, Asthir B. Proline: A key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*. 2015 Sep;59(4):609-19. DOI: 10.1007/s10535-015-0549-3.
- [18] Chornogor NP, Zhernosekova IV, Tymchuk OA, Kilochok TP, Vinnikov AI. Phytoregulation and adaptation properties of biopreparations in conditions of technogenic pollution of the environment. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology*. 2005 Oct;13(2):209-13 DOI: 10.15421/010594

Н.Я. Левчик, А.В. Любинская, Я.О. Герасименко, Т.С. Тодосийчук

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ *STREPTOMYCES ALBUS* В БИОРЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА

Проблематика. Научные основы разработки поликомпонентных препаратов микробного происхождения для растениеводства, которые проявляют широкую специфичность биологического действия.

Цель. Определение биологической активности опытных образцов препаратов *S. albus* UN44 относительно процессов биорегуляции растений огурца для дальнейшего обоснования направлений оптимизации готовых форм и способов применения.

Методика реализации. Исследуемые препараты получали культивированием продуцента *S. albus* UN44 с последующим отделением биомассы и (в одном из вариантов) термической стерилизацией фугата. Семена огурца сорта Конкурент обрабатывали растворами препаратов и определяли ростстимуляцию, метаболическую активность растений и состояние стресса.

Результаты. Определено, что Биопрепарат-1 стимулирует рост корня и стебля огурца после обработки семян раствором в концентрации 15–22 ед/мл (или 1–1,5 %). Полученные данные свидетельствуют о том, что биологическая активность препаратов культуры может быть обусловлена присутствием гормонов класса ауксинов, которые ранее не были идентифицированы среди ее метаболитов. Впервые показана способность биопрепаратов *S. albus* UN44 влиять на содержание пролина в растениях огурца, а значит, на их стрессоустойчивость.

Выводы. Результаты работы являются основанием для изучения новых биологически активных продуктов *S. albus* UN44 и оптимизации готовых форм препаратов, а именно стерильной жидкой формы и сухого комплексного препарата, а также препаратов отдельных метаболитов с целевой высокоспецифичной активностью. Способность опытных образцов препаратов влиять на стрессоустойчивость растения требует дополнительного изучения и обуславливает возможность создания средства для коррекции последствий действия на растения различных негативных факторов.

Ключевые слова: *S. albus* UN44; биопрепараты; огурцы сорта Конкурент; биологическая активность; стимуляция роста; метаболическая активность; стрессоустойчивость.

N.Ya. Levchik, A.V. Liubinska, Y.O. Herasymenko, T.S. Todosiichuk

SPECIFIC ACTIVITY OF *STREPTOMYCES ALBUS* PREPARATIONS FOR BIOREGULATION OF GROWTH AND GERMINATION OF CUCUMBER PLANT

Background. Scientific bases for the development of microbial-derived polycomponent preparations for plant growing, which show a wide specificity of biological action.

Objective. The aim of the paper is an establishment of the biological activity of *S. albus* UN44 experimental preparations for cucumber plant bioregulation processes for further substantiation of optimization directions of ready-made forms and application methods.

Methods. The experimental preparations were produced by cultivating the *S. albus* UN44 producer, in subsequently separating biomass and (in one variant) heat sterilization of supernatant. The cucumber seeds of the variety Konkurent were treated with solutions of the preparations and the growth stimulation, metabolic activity of plants, and the state of stress were determined.

Results. It is determined that Biopreparat-1 stimulates the growth of the root and stem of the cucumber after seed treatment with a solution at a concentration of 15–22 units/ml (or 1–1.5 %). It is shown, based on the data obtained, that the biological activity of culture preparations can be due to the presence of hormones of the auxin class that were not previously identified among its metabolites. For the first time, the ability of *S. albus* UN44 biopreparations to influence the proline content in cucumber plants, and therefore their stress resistance, is shown.

Conclusions. The results of the research are the basis for studying new biologically active products of *S. albus* UN44 and optimization of the ready-made forms of preparations, namely sterile liquid form and dry complex preparation, as well as preparations of certain metabolites with target highly specific activity. The ability of experimental preparations to influence the plant stress resistance requires additional study and makes it possible to create means for correcting the effects on plants of various negative factors.

Keywords: *S. albus* UN44; biopreparation; cucumber plants of the variety Konkurent; biological activity; growth stimulation; metabolic activity; stress resistance.

FORMATION AND PROPERTIES OF POLYMER NANOLAYERS TO ENHANCE CELL GROWTH *IN VITRO*

O.V. Shtapenko^{1*}, I.I. Hevkan¹, Yu.I. Slyvchuk¹, V.Y. Syrvatka², N.M. Matvienko³

¹Institute of Animal Biology, National Academy of Agrarian Sciences, Lviv, Ukraine

²Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine

³Institute of Fisheries, National Academy of Agrarian Sciences, Kyiv, Ukraine

*Corresponding author: shtapenko31@gmail.com

Received 29 March 2018; Accepted 23 June 2018

Background. Cultivation of cell cultures on synthetic coating makes it possible to obtain a complex spatially organized cellular system that enhances cell attachment and determines all further processes of differentiation, proliferation, and formation of extracellular matrix. It is necessary to examine properties of coatings, particularly, such as biocompatible polymers with cells, as they can be applied for various biological and medical applications.

Objective. We investigated the effects of glass surfaces modified with dextran, APTES, albumin and their compositions on the proliferation and metabolic activity of B16F10 cells.

Methods. Cellular line B16F10 were cultured in DMEM medium supplemented with 10 % fetal calf serum, 1 % penicillin-streptomycin in 5 % CO₂ at 37 °C for 72 h. Cells were seeded at the glass plates, which modified nanolayers in various combinations: control group – glass, glass/APTES, glass/APTES/dextran, glass/APTES/albumin, glass/albumin, glass/APTES/dextran/albumin. The influence of the surface properties on the proliferation of B16F10 culture and its viability was analyzed after every 24 h of incubation. The cultural medium was collected after 24, 48, and 72 h of cultivation for investigation lactate dehydrogenase activity.

Results. The high viability and proliferation growth of cells on APTES, albumin, and APTES/dextran/albumin coating were higher if compared with growth of cells on a glass surface. Improved the proliferation of the B16F10 cells was observed onto albumin ($P < 0.001$) and APTES/dextran/albumin ($P < 0.001$) nanolayers on 48 and 72 h, in contrast to control and other experimental groups. Whereas, the difference between the number of cells grown on glass and APTES coating increases only on 72 h of cultivation.

Conclusions. Obtained results have shown that the glass surface modified albumin and APTES/dextran/albumin resulted in improving the viability and cell proliferation of B16F10 cell line and can be used as a 3D system for cultivation of cells of different types.

Keywords: cell culture; proliferative activity; surface; nanolayers.

Introduction

Three-dimensional (3D) cultures models may more accurate representation of the *in vivo* environment than two-dimensional (2D) cultures while maintaining the cytoarchitecture of *in situ* tissue that supports cells differentiation or maturation [1, 2].

Cell adhesion is depended upon surface hydrophilicity, surface charge density, surface morphology, specific chemical groups present on the surface of the scaffold [3]. Given that surface chemistry is crucial for the biocompatibility of the nanolayers, specific surface modifications are used with different polymers [4, 5].

In particular, there is an increased interest in the polymeric surfaces which can change their affinity towards proteins and cells under external stimuli [6, 7] and therefore have potential applications in biology and medicine.

Despite various investigations, specific and complex mechanisms govern the reactions that occur between the biomaterial and the cellular environment are still incomplete understanding.

The objective of this study was to establish and comparison cells line B16F10 viability cultured onto different coatings. We used surfaces obtained by grafting APTES, dextran, albumin and their combinations to the surface of the modified glass plates.

Materials and Methods

Preparation of coatings. Glass plates (20×20) were dipped into 0.2 % (w/w) methanolic solution of (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) for 24 h. After the incubation, loosely-attached silane molecules were removed with methanol in Soxhlet's apparatus. Then the plates functionalized with APTES

were dipped into 1 % solution of peroxide in air dioxin for 24 h. Similarly, loosely attached peroxide was removed with dioxane in Soxhlet's apparatus for 4 h. As a result, peroxides grafted to aminated surfaces were obtained [8].

With participation of these aminogroups dialdehydedextran obtained by partial oxidation of the anhydroglucopyranoside subunits of dextran by periodate acid was covalently grafted to the surface of the modified glass plates. The oxidation of dextran was conducted for 2 h, and then the plates functionalized with amino-terminated APTES were dipped into 2 % solution of dialdehydedextran in water for a grafting time of 6 h. Similarly, loosely-attached dialdehydedextran was removed with water in Soxhlet's apparatus for 4 h. As a result, dialdehydedextran grafted to aminated surfaces were obtained.

After modification procedure, all groups of samples were dipped in bovine serum albumin (BSA) phosphate-citric buffer solution (pH 7.4; BSA – 0.2 mg/ml and adsorption time – 2 h). Obtained surfaces were characterized by E. Bittrich [9].

Cell assay. B16 Melanoma Cells (B16-F10 cell ATCC #CRL-6475) were harvested and cultivated in DMEM medium supplemented with 10 % fetal calf serum (FBS, Gibco, USA), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco, USA) for 72 h at 37 °C in an atmosphere containing 5 % CO₂ and maximum humidity. Cells were seeded with an initial concentration of 800 thousands cells in a 100 µl drop of the medium on glass (control) and coating modified with Glass/APTES; Glass/APTES/dextran; Glass/APTES/albumin; Glass/albumin; Glass/APTES/dextran/albumin.

The influence of the surface properties on the proliferation of B16-F10 cells culture and its ability to form a monolayer was investigated. Cells were allowed to attach and proliferate for 24, 48, and 72 h. After each time point, the number of plated cells was determined by counting using a hemacytometer. For each group, three samples were tested independently. Trypan blue exclusion test (0.4 %) was used to discriminate and count living cells.

Lactate dehydrogenase (LDH) assays. Medium supernatants collected from both experimental and control cells every 24 h were tested for LDH activity using Cytotoxicity Detection kit LDH (Roche). This test is a colorimetric assay for the quantification of cell death and cell lysis based on the measurement of LDH activity released from the cytosol of damaged cells into the supernatant. The amount of enzyme activity detected in the culture supernatant correlates with the proportion of lysed cells. The assays were conducted following the manufacturer's instructions, in flat-bottomed wells of 96-well plates. Following incubation, the absorbance of samples was measured at a wavelength of 490 nm as a measure of enzyme activity using an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) plate reader.

Evaluation of cytotoxicity using the microtetrazolium (MTT) assay. The MTT assay was used to assess the *in vitro* cytotoxicity of surface-modified glasses in this study. A quantitative colorimetric MTT test was performed after 3 days of culture to characterize cellular metabolism (vitality) and, by implication, proliferation. The MTT solution (0.5 mg/ml) was added to each well 3 h prior to the end of the experiment. After the incubation period dimethylsulfoxide was added in the dish to dissolve the purple formazan crystals that formed as a result of the restoration of MTT reagent-reductase living cells. The concentration of formazan in the wells was determined by the spectrophotometric method at a wavelength of 490 nm. The number of living cells (in percentage) was determined by the ratio of optical in which the cells were incubated for study and control mediums.

Statistical analysis. Tests were repeated three times for every type of the samples. The results were presented as the mean ± standard deviation. Differences between groups were determined by Student t-tests.

Results

The influence of the surface nature on the proliferative growth of B16F10 cells during 72 h was investigated (Table).

Table: Proliferative growth of B16F10 cells onto the modified surfaces during 72 h cultivation ($M \pm m$, $n = 3$)

Experimental groups	Number of cells ($\times 10^6$)		
	24 h	48 h	72 h
Control (glass)	2.03 ± 0.02	2.33 ± 0.05	2.50 ± 0.03
Glass/APTES	1.65 ± 0.03***	2.19 ± 0.03	2.99 ± 0.08**
Glass/APTES/dextran	1.80 ± 0.06**	2.13 ± 0.04*	2.23 ± 0.05**
Glass/APTES/albumin	2.81 ± 0.04***	2.58 ± 0.04***	2.61 ± 0.02
Glass/albumin	1.37 ± 0.07***	3.13 ± 0.06***	3.14 ± 0.07***
Glass/APTES/dextran/albumin	1.94 ± 0.03	2.71 ± 0.04**	3.13 ± 0.04***

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared to the control.

The results of our investigations show that proliferative activity of B16F10 cells was gradually increased in the experimental group with APTES ($P < 0.01$). While in the experimental groups with APTES/dextran cells concentration were lower compared to control. Improved the viability and proliferation of the B16F10 cells were observed after cultivation onto albumin ($P < 0.001$) and APTES/dextran/albumin ($P < 0.001$) nanolayers during 48 and 72 h compared to control and other experimental groups.

The viability and functional activity of B16F10 cells under cultivation onto different nanolayers we investigated of LDH levels (Fig. 1).

LDH concentration in all groups was sufficiently high at the beginning of the experiment. As increasing times cultivation, LDH activity was

changed differently in each group. Enzyme activity significantly reduced in cells cultivated onto APTES, albumin and APTES/dextran/albumin coating at 48 and 72 h as opposed to the group with APTES/dextran coating. The higher concentration of LDH during whole time cultivation were observed in the experimental group with APTES/albumin compared to other experimental groups.

Decreasing lactate dehydrogenase activity was observed in APTES, albumin, and APTES/dextran/albumin coating experimental groups at 48–72 h of cultivation, which coincides with the growth of the proliferative activity of cells in these groups and high cell viability.

Biocompatibility and functional impact of modified surfaces were studied *in vitro* using MTT

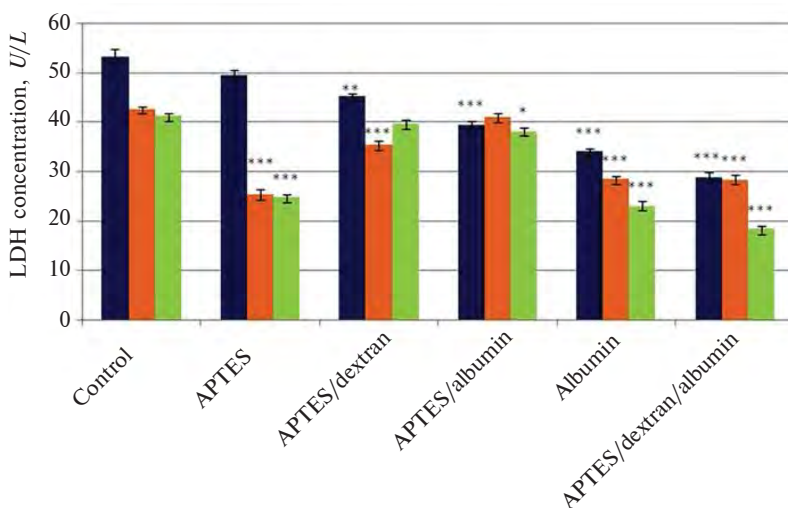


Figure 1: LDH activity in culture medium after cultivation B16F10 cells onto different nanolayers during 72 h ($M \pm m$, $n = 3$). Results are expressed as mean of three independent experiments: ■ – 24 h; ■ – 48 h; ■ – 72 h. Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared to the control

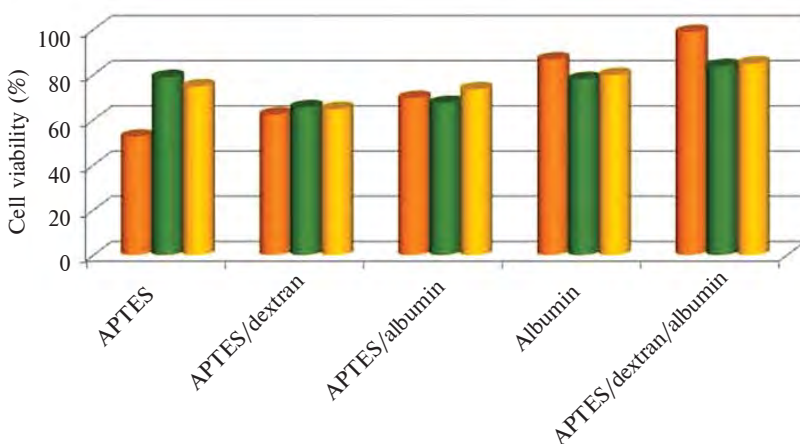


Figure 2: Viability of B16F10 cells exposed onto different nanolayers after 72 h incubation. The cytotoxicity was determined by MTT assay as the percentage of experimental cells compared with control: ■ – 24 h; ■ – 48 h; ■ – 72 h

assay. In Fig. 2 the data of obtained results of MTT absorbance value for cells after cultivation onto different nanolayers are representing.

The cell viability in the experimental group with APTES/dextran/albumin was the highest during the whole time of cultivation compared to other experimental groups. Whereas the lowest cell viability was noted in the experimental group with APTES/dextran. The absorbance values in experimental groups with albumin and APTES/albumin were also higher. The MTT assay showed 86.6–79.7 % and 69.5–73.4 % of viability to B16F10 cells in this groups respectively.

Discussion

Most cells are anchorage-dependent because they grow as monolayers and require attachment to proliferate. Disposable plastic, especially polystyrene is now most commonly used for cell culture growth. But many cells prefer surfaces with high surface energies (i.e. hydrophilic surfaces). Whereas most plastics are hydrophobic and unsuitable for cell growth, they are often treated with radiation, chemicals or electric ion discharge to generate a charged, hydrophilic surface. The characteristics of glasses depend on organic compounds properties present in their composites its chemical composition, surface area, and textural properties (pore size, pore volume, pore structure) [10]. Given that surface chemistry is crucial for the biocom-

patibility of the nanolayers, the coatings should be tested on various cell types [11]. But methods of investigations of effects of the biocompatible and smart bioactive surfaces on cells are still not fully developed. For these studies usually are applied cell viability tests and counted a quantity of the living cells with different morphology and also their proliferation index. Among different surface modification approaches studied, grafting of carbon nanotubes on the surface provides the growth, morphology and cell viability of bone cells (osteoblasts) [12]. This positive effect on cell viability may be attributed to the fact that nanotubes create 3D cultures models that can provide additional nucleation and growth sites for cells to thrive.

In our studies, the cell viability rate and proliferation were showed an increase after cultivation of B16-F10 cell on the surface with grafted nanolayers of APTES, albumin and APTES/dextran/albumin during 72 h. While using coating glasses, a moderate cytotoxicity was observed after 72 h of incubation. The increased sensitivity of B16F10 cells (cell growth induction as well as inhibition) suggests that the effects may be dependent on nature of the polymer nanolayers. So it could be concluded that the stereochemistry of the polymers used for coating glasses greatly influence the cell growth and survival. This agrees with another study [13] and could be explained by the organization and maturation of the extracellular matrix surrounding cells by the created three-dimensional system.

References

- [1] Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207-18. DOI: 10.1089/adt.2014.573
- [2] Madich A, Sheremeta V, Hevkan I, Shtapenko O, Fedorova S, Slyvchuk Yu. Cell culture and its possible use in embryonic biotechnology. Kyiv: ArtEkom, 2012. 144 p.
- [3] Ishizaki T, Saito N, Takai O. Correlation of cell adhesive behaviors on superhydrophobic, superhydrophilic, and micropatterned superhydrophobic/superhydrophilic surfaces to their surface chemistry. *Langmuir.* 2010 Feb;26(11):8147-54. DOI: 10.1021/la904447c
- [4] Miksa D, Irish ER, Chen D, Composto RJ, Eckmann DM. Dextran functionalized surfaces via reductive amination: morphology, wetting, and adhesion. *Biomacromolecules.* 2005 Dec 27;7(2):557-64. DOI: 10.1021/bm050601o
- [5] Rabe M, Verdes D, Seeger S. Surface-induced spreading phenomenon of protein clusters. *Soft Matter.* 2009 Aug;5:1039-47. DOI: 10.1039/B814053G
- [6] Noorisafa F, Razmjou A, Emams N, Low Z-X, Korayem H, Kajani AA. Surface modification of polyurethane via creating a biocompatible superhydrophilic nanostructured layer: role of surface chemistry and structure. *J Experimental Nanosci.* 2016;11(14):1087-109. DOI: 10.1080/17458080.2016.1188223
- [7] Brynda E, Houska M, Jirouskova M. Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices. *J Biomed Mater Res.* 2000 May;51(2):249-57. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(200008)51:2<249::AID-JBM14>3.0.CO;2-X
- [8] Luzinov I, Minko S, Tsukruk VV. Responsive brush layers: from tailored gradients to reversibly assembled nanoparticles. *Soft Matter.* 2008 Feb;4:714. DOI: 10.1039/B718999K
- [9] Bittrich E, Burkert S, Müller M, Eichhorn KJ, Stamm M, Uhlman P. Temperature-sensitive swelling of poly(N-isopropylacrylamide) brushes with low molecular weight and grafting density. *Langmuir.* 2012 Feb;28(7):3439-48. DOI: 10.1021/la204230a

An additional approach for the detection of cells viability is the determination of LDH levels. LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells and is rapidly released following damage to the plasma membrane [14]. Evaluation of LDH activity is crucial in the study of cell viability. From with the increasing of cultivation time, LDH activity was changed differently for each group, but, in general, its concentration in the control group and in all experimental groups was similar, which indicates to proliferative activity of cells. These results confirm by the index of MTT value: the viability of B16F10 cells cultivated onto different nanolayers after 72 h incubation number remains at a high level.

Conclusions

The different coatings were created through grafting of APTES, dextran, albumin and their combinations on glass surfaces. The effect of those nanolayers was studied on B16-F10 cell line in terms of change cell viability and morphology during 72 h of incubation. These coatings present different morphologies according to the introduced polymer nanolayers. It was found out that modification of the surface with grafted nanolayers of APTES, albumin and APTES/dextran/albumin is allows improving the viability and proliferation of B16-F10 cell. These results confirm the advantage of nanolayers surface for applications in cell biology and medicine because they create three-dimensional (3D) system and ensures optimum for the cultivation of cells *in vitro*.

- [10] Kaur gurbinder clinical applications of biomaterials: state-of-the-art progress, trends, and novel approaches [Internet]. Springer; 2017 [cited 22 May 2018]. 467 p. Available from: <https://www.springer.com/gb/book/9783319560588>
- [11] Wendy K, Scholz W. Cell adhesion and growth on coated or modified glass or plastic surfaces [Internet]. Tools.thermofisher.com. 2018 [cited 22 May 2018]. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D00253.pdf>
- [12] Maurer E, Hussain S, Mukhopadhyay SM. Cell growth in a porous microcellular structure: Influence of surface modification and nanostructures. *Nanosci Nanotechnol Lett* 2011;3(1):110-3. DOI: 10.1166/nnl.2011.1128
- [13] Alves LB, de Souza SLS, Taba JM, Novaes AB Jr, Oliveira PT, Palioto DB. Bioactive glass particles in two-dimensional and three-dimensional osteogenic cell cultures. *Braz Dent J*. 2017 May/June;28(3). DOI: 10.1590/0103-6440201600953
- [14] Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *J Biotechnol*. 1992;25(3):231-43. DOI: 10.1016/0168-1656(92)90158-6

О.В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю.І. Сливчук, В.Я. Сирватка, Н.М. Матвієнко

ФОРМУВАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІМЕРНИХ НАНОШАРІВ ДЛЯ ПОЛІПШЕННЯ РОСТУ КЛІТИН *IN VITRO*

Проблематика. Культивування культур клітин на синтетичних покриттях дає можливість отримати комплексну просторово організовану клітинну систему, що підвищує прикріплення клітин і сприяє їх подальшій диференціації, проліферації та формуванню міжклітинного матриксу. Тому виникає потреба у вивченні властивостей покриттів, зокрема біосумісності з клітинами, оскільки вони можуть бути використані для різних біологічних і медичних досліджень.

Мета. Завданням наших досліджень є вивчення впливу нанопокриттів, модифікованих АПТЕСом, декстраном, альбуміном та їх композиціями, на проліферативну і метаболічну активність клітин V16F10.

Методика реалізації. У дослідженні використовували клітини лінії V16F10, які культивували на живильному середовищі ДМЕМ із додаванням 10 % ЕТС, 1 % пеніциліну та стрептомицину в атмосфері з вмістом 5 % CO₂ при 37 °С упродовж 72 год. Клітини висівали на скельця, модифіковані наночастинами у різних комбінаціях: контрольна група – скло; скло/APTES; скло/APTES/декстран; скло/APTES/альбумін; скло/альбумін; скло/APTES/декстран/альбумін. Вплив покриттів на проліферативний ріст і життєздатність культури оцінювали кожні 24 год культивування. Для визначення активності лактатдегідрогенази кондиційне середовище відбирали на 24, 48 та 72-гу год культивування.

Результати. Висока життєздатність та інтенсивність проліферативного росту клітин спостерігались при культивуванні на поверхнях, модифікованих АПТЕСом, альбуміном, АПТЕС/декстран/альбуміном. Підвищення проліферації клітин V16F10, вирощених на нанопокриттях з альбуміном ($P < 0,001$) та АПТЕС/декстран/альбуміном ($P < 0,001$), відзначено на 48 та 72-гу год культивування, на відміну від контролю та інших дослідних груп. При культивуванні на покритті з АПТЕСом кількість клітин зростала, на відміну від клітин на поверхні скельця, тільки на 72-гу год культивування.

Висновки. Досліджувані нанопокриття, модифіковані альбуміном і АПТЕС/декстран/альбуміном, покращують життєздатність та проліферацію клітин лінії V16F10 та можуть бути використані як 3D-системи для вирощування клітин різних типів.

Ключові слова: культура клітин; проліферація; покриття; нанопокриття.

О.В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю.І. Сливчук, В.Я. Сирватка, Н.М. Матвієнко

ФОРМИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА ПОЛИМЕРНЫХ НАНОПОКРЫТИЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ РОСТА КЛЕТКИ *IN VITRO*

Проблематика. Культивирование культур клеток на синтетических покрытиях позволяет получить комплексную пространственно организованную клеточную систему, что повышает прикрепление клеток и способствует их дальнейшей дифференциации, пролиферации и формированию межклеточного матрикса. Поэтому возникает необходимость в изучении свойств покрытий, в частности биосовместимости с клетками, поскольку они могут быть использованы для различных биологических и медицинских исследований.

Цель. Задачей наших исследований является изучение влияния нанопокровов, модифицированных АПТЕСом, декстраном, альбумином и их композициями, на пролиферативную и метаболитическую активность клеток V16F10.

Методика реализации. В исследовании использовали клетки линии V16F10, которые культивировали на питательной среде ДМЕМ с добавлением 10 % ФСТ, 1 % пенициллина и стрептомицина в атмосфере с содержанием 5 % CO₂ при 37 °С в течение 72 ч. Клетки высевали на стекла, модифицированные нанослоями в различных комбинациях: контрольная группа – стекло; стекло/APTES; стекло/APTES/декстран; стекло/APTES/альбумин; стекло/альбумин; стекло/APTES/декстран/альбумин. Влияние покрытий на пролиферативный рост и жизнеспособность культуры оценивали каждые 24 ч культивирования. Для определения активности лактатдегидрогеназы кондиционную среду отбирали на 24, 48 и 72-й час культивирования.

Результаты. Высокая жизнеспособность и интенсивность пролиферативного роста клеток наблюдались при культивировании на поверхностях, модифицированных АПТЕСом, альбумином и АПТЕС/декстран/альбумином. Повышение пролиферации клеток V16F10, выращенных на нанопокровов с альбумином ($P < 0,001$) и АПТЕС/декстран/альбумином ($P < 0,001$), отмечено на 48 и 72-й час культивирования, в отличие от контроля и других групп. При культивировании на покрытиях с АПТЕСом количество клеток возрастало, в отличие от роста клеток на поверхности стекол, только на 72-й час культивирования.

Выводы. Исследуемые нанопокровов, модифицированные альбумином и АПТЕС/декстран/альбумином, улучшают жизнеспособность и пролиферацию клеток линии V16F10 и могут быть использованы как 3D-системы для выращивания клеток различных типов.

Ключевые слова: культура клеток; пролиферація; покриття; нанопокриття.

КРИСТАЛОУТВОРЕННЯ У ФАЦІЯХ РОТОВОЇ РІДИНИ ЦИКЛАМИ ЇХ ГІДРАТАЦІЇ ТА ДЕГІДРАТАЦІЇ

А.Г. Мисюра, Л.І. Ушій*, С.О. Мамілов

Інститут прикладних проблем фізики і біофізики НАН України, Київ, Україна

*Corresponding author: ushiy@ukr.net

Received 1 February 2018; Accepted 18 April 2018

Проблематика. Аналіз фотозображень кристалічних структур, утворених під час висушування біологічних рідин, зокрема ротової рідини, широко використовується як діагностичний метод оцінювання стану організму людини. Актуальною задачею є розробка автоматизованих методів числової морфометрії з використанням комп'ютерних програм для аналізу відмінностей форми, розмірів, текстури, кольору та кількості кристалічних структур для виключення суб'єктивного внеску та залежності аналізу від кваліфікації дослідника.

Мета. У роботі вивчаються процеси дегідратаційної структуризації ротової рідини і безпосередньо формування кристалічних структур в умовах застосування повторних циклів гідратації та дегідратації. Вивчається їх вплив на утворення кристалічної структури, якості її відтворення на цифрових фотозображеннях фації.

Методика реалізації. Зразки ротової рідини отримували у групи добровольців віком 19–23 роки, чоловіків і жінок. Зі зразків після їх попереднього перемішування і дегазації до однорідного стану відбирались дозовано краплі досліджуваної ротової рідини, які наносились мікродозатором на горизонтальне предметне скло. Проводились цикли часткової гідратації–дегідратації.

Результати. Розглянуто процеси повторного розчинення твердої фази висушеної краплі ротової рідини (фації), осмотичного, дифузійного, екстракційного переміщення кристалотвірних речовин та їх структуризації після розчинення краплею нової рідини і дегідратації висушуванням. Виявлено, що під впливом циклів гідратації–дегідратації кристалотвірні речовини ротової рідини продовжують зберігати свої кристалотвірні властивості у похідних фаціях. Отримані результати дослідження свідчать, що циклами часткової гідратації–дегідратації фацій ротової рідини досягається фільтрація (очищення) частини фації, що розчиняється, від сторонніх домішок, підвищення чіткості зображення кристалічної структури.

Висновки. Показано, що кристалотвірні компоненти фації ротової рідини зберігають свої кристалотвірні властивості й здатність до перекристалізації після висихання, а також здатні відновлювати врівноважений стан під впливом гідратації розчинником. Гідратація розчинником частини площини твердої фації відновлює розчинення і екстрагування компонентів фації в поле краплі розчинника, а подальша дегідратація висушуванням формує оновлену кристалізаційну текстуру похідної фації. При цьому оптично активні домішки та завади фільтруються, а цифрові зображення кристалізованої структури похідної фації ротової рідини формуються очищеними і набувають значної чіткості. Пропонуються розроблені алгоритми, формальні процедури та засоби отримання електронного фотозображення кристалізованої текстури похідних фацій.

Ключові слова: фація краплі; ротова рідина; текстура кристалів; цикли гідратації–дегідратації; цифрова мікроскопія; фотометрія; аналіз фотозображення.

Вступ

Кристалізація біологічної рідини організму – слини та, відповідно, ротової рідини – генетично зумовлена їх властивістю, що забезпечується наявністю в них певних органічних та неорганічних компонентів, які підтримують рідини у певному рівноважному стані. Ротова рідина являє собою слабколужне рідинне середовище, що містить секрет слинних залоз – слину, ферменти (амілазу і мальтозу), неорга-

нічні солі, білки, зокрема муцини, та інші компоненти [1].

Вивчення процесів структурного і макромолекулярного кристалогенезу в такому складно організованому середовищі, яким є ротова рідина людини, – одна з актуальних задач біофізики, де науковому пошуку методів і розробленню засобів для числового аналізу характеристик, морфометрії та геометрії кристалічної структури цього доступного біологічного субстрату надається пріоритетне значення [2].

Аналіз відмінностей форми, розмірів, текстури, кольору і кількості кристалів, а також залежності від наявності в рідині різних метаболітів і біологічно активних речовин, інших характеристик сформованого твердого осаду, утвореного висушуванням біологічної рідини, що отримав назву фація, залишається складною аналітичною задачею [3].

Переважає більшість публікацій щодо кристалізації біологічних рідин містить аналіз процесів і механізмів дегідратаційної структуризації ротової рідини й утворення фації та її текстури [1–5]. Визначаються властивості розподілу швидкостей утворення кристалів, наявність дифузійного і конвекційного переносу речовин, що містяться в краплі рідини при її висушуванні, формування зображень різної складності та інші фізико-хімічні обґрунтування процесів кристалізації. Зазначається, що просторовий розподіл ідентичних молекул і надмолекулярних комплексів, які в цих умовах створюють концентричні хвилі, є результатом взаємодії органічних і неорганічних компонентів, а також різних значень осмотичних та іонних сил, температурних полів, перемішування, в'язкості, геометрії кристалізатора, перенасичення розчину та інших чинників. Визначається, що утворена текстура ліотропних біологічних рідин залежить від стану організму. Найменші порушення, які пов'язані з хворобами, ведуть до зміни хімічного складу біологічних рідин, а відповідно, і очікувано до певних змін текстури фації [1, 6].

Висновки переважної більшості публікацій ґрунтуються на аналізі фотозображень, отриманих засобами цифрової мікроскопії [7]. Разом із цим майже не приділяється уваги супутнім процесам і явищам, що теж впливають на якість і точність аналізу цифрових зображень кристалічної текстури фації та окремих кристалів, їх морфометрії і геометрії [8]. Маловивченими залишаються власні фізико-хімічні властивості фації та взаємодія поля сил при її утворенні, можливе використання аналізу фацій у медико-біологічних дослідженнях.

Порівняно з іншими біологічними рідинами, що мають ендогенне походження, властивості ротової рідини та її кристалотвірних компонентів є додатково залежними від впливу і доступу зовнішніх чинників (їжі, води, повітря тощо), що ускладнює дотримання належної чистоти й однорідності її зразків, а відповідно, і фотозображення. Наявність зовнішніх чинників створює певні завади для якісного відтво-

рення текстури фації на цифровому фотозображенні і його аналіз методами мікроскопії та числової морфометрії.

Наявні у ротовій рідині та фаціях залишки їжі, складники питної води різного складу, неактивні елементи деградації тканин, сторонні нерозчинні мікродомішки, продукти незавершеного метаболізму та інші компоненти різної оптичної густини спотворюють цілісну картину дендритоподібних кристалічних структур, які характеризують фізико-хімічні властивості ротової рідини.

У цій роботі поряд із вивченням процесів дегідратаційної структуризації ротової рідини висушуванням до утворення твердого стану – фації – наведено результати власного дослідження безпосередньо формування її властивостей в умовах застосування зворотно циклів гідратації–дегідратації у порядку, що застосовувався для первинної дегідратаційної структуризації краплі ротової рідини. Вивчались умови і наслідки такої дії та їх вплив на утворення кристалічної структури, відтворення її чіткості та якості на цифрових фотозображеннях фації [9].

Задачею дослідження є підвищення контрастності та якісне відтворення кристалічної структури фацій ротової рідини на фотозображенні фільтрацією розчиненої частини фації від сторонніх домішок циклами часткової гідратації–дегідратації.

Матеріали і методи

Зразки ротової рідини отримували в групі добровольців віком 19–23 роки, чоловіків і жінок, натще. Зі зразків після їх попереднього перемішування і дегазації до однорідного стану відбирались дозовано краплі досліджуваної ротової рідини об'ємом 0,02 мл для нанесення мікродозатором на знежирене предметне скло, розміщене горизонтально. Нанесена крапля утворювала дискподібну структуру діаметром 5–7 мм з товщиною (висотою) в середині близько 1 мм.

Дотримання умов повторюваності нанесення краплі на предметне скло, вертикального їх центрування досягалось завдяки застосуванню створеної установки (рис. 1), яка має пристрої регулювання горизонтальності розміщення предметних скельць і вільного вертикального падіння краплі на скельце з однакової висоти. Установка складається з корпусу *I*, у якому

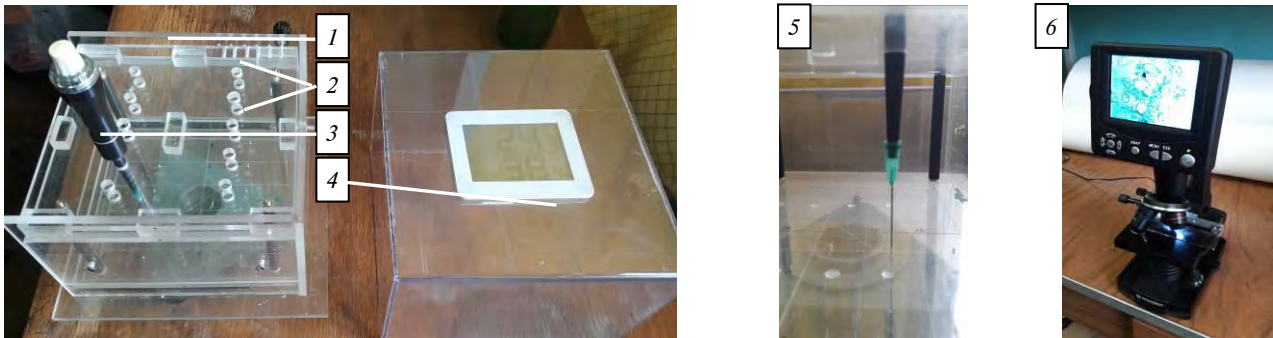


Рисунок 1: Установка для підготовки крапель ротової рідини для дегідратаційної структуризації їх висушуванням до твердого осаду й отримання цифрового зображення: 1 – корпус камери з пристроями для встановлення горизонтально планшети зі скельцями; 2 – отвори для вертикального центрування мікродозатора; 3 – мікродозатор; 4 – кришка зі встановленими в ній сенсорами контролю вологості й температури; 5 – нанесення вертикально краплі ротової рідини для висушування; 6 – оптично-цифровий мікроскоп

встановлено пристрої для горизонтального розміщення планшети з предметними скельцями в кількості 10 шт. В отвори 2 у верхній частині пристрою вертикально встановлюється мікродозатор П-1 3.

Після нанесення вертикально 10-ти зразків краплі рідини на скельця 5 камера установки накривається кришкою зі встановленими в ній сенсорами контролю вологості й температури 4. Надалі зразок піддавався дегідратаційній структуризації висушуванням ($t = 20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відносна вологість повітря 65–70 %) протягом 6–8 год до твердого стану (фації).

Цифрові фотографії утвореної на предметному склі фації ротової рідини отримували за допомогою usb-мікроскопа з 2-кратним збільшенням та реєстрацією зонної текстури фації краплі електронно-цифровим мікроскопом LCD MICRO 40 \times –1600 \times Bresser 6 із 4-кратним збільшенням.

Отримані фотозображення фації з 10-кратним збільшенням використовували для виявлення й аналізу зміни кристалізованої текстури фації, а також співвідношення оптичної щільності її компонентів окремо по зонах фації.

Фотозображення фації з 40-кратним збільшенням використовували для виявлення й аналізу зміни геометрії дендритної текстури кристалів фації, утворених їх розгалужень, кутів та інших характеристик морфометрії.

Отримано та піддано аналізу більше 1000 цифрових зображень похідних фації ротової рідини на різних стадіях структуризації й утворення текстури кристалів первинної фації та її похідних при застосуванні циклів гідратації–дегідратації, різних умов впливу сил осмотичного, дифузійного переміщення кристалотвір-

них речовин, їх структуризацію після розчинення фацій краплями нової рідини та їх дегідратації висушуванням.

Результати

Загальною подібністю зображень структури фацій краплі ротової рідини виявилось умовне тризонне утворення кристалічної структури з центральною, проміжною та периферичною (крайньою) зонами (рис. 2).

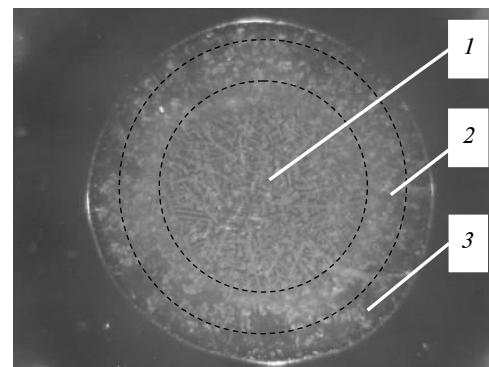


Рисунок 2: Цифрова фотографія фації ротової рідини, де видно характерне відцентроване зменшення оптичної щільності твердих кристалотвірних речовин з умовним поділом на зони: 1 – центральна зона; 2 – проміжна зона; 3 – крайня (периферична) зона. Збільшення 2 \times

Висихання краплі приводить до руху гідрофільних іонів у напрямку рідинної фази, а солей – до центра краплі (сольового центра) зі зниженням оптичної густини на зображенні фації від центра до периферії. Морфологія зонного поділу обумовлюється впливом хімічного складу слини та фізико-хімічної взаємодії іонних, осмотичних і сорбційних сил у краплі рідини при її висушуванні.

Кожна із зон має наповнення структурами різних форм і різної орієнтації в просторі, різної кількості та площини дендритів і кристалів.

Застосовуючи 4-, 10-, 40-кратне оптичне збільшення мікроскопа, реєстрували кристалізовані текстури фації ротової рідини в кожній зоні з характерними ознаками. На рис. 3 показано відмінності кристалоутворення в різних зонах фації. Найбільш активний ріст кристалів спостерігався у центральній зоні фації, де утворювалися різні за формою та розміщенням структури (1), у т.ч. схожі на листки папороті. Прийнято вважати [1–4], що ділянки фацій із текстурою кристалів, подібною листкам папороті, виникають у зоні вільного росту кристалів, і що характерно, найчастіше така текстура притаманна фаціям краплі ротової рідини у здорової людини.

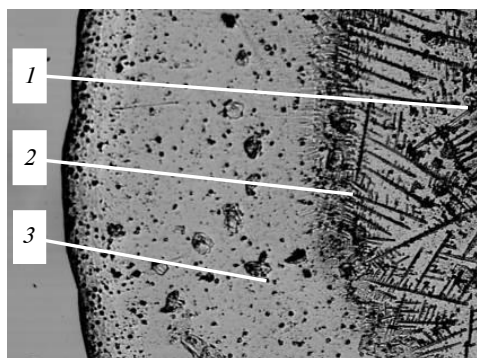


Рисунок 3: Зображення наповнювачів різних зон фації ротової рідини: 1 – центральна зона; 2 – проміжна зона; 3 – крайня (периферична) зона. Збільшення 4×

На зображенні, отриманому при 4-кратному збільшенні мікроскопа (рис. 4а), видно мозаїку розміщення кристалів у фації, а також взаємне розміщення окремих кристалічних утворень, співвідношення довжин та ширин гілок кристалів, кутів їх згину. При 10-кратному збільшенні (рис. 4б) можна визначити кількість і характер розгалужень основного стовбура, кути розгалужень. При 40-кратному збільшенні мік-

роскопа можна бачити форми верхівок відростків мікрочастин та інших елементів (рис. 4в) [7, 8].

Разом із цим на всіх збільшеннях мікроскопа було помічено, що візерунок кристалів часто в різних ділянках містить темні оптично щільні зерна чорного кольору некристалічної природи. Відомо [10], що завади створюють наявні в ротовій рідині та фаціях оптично щільні, неактивні, нерозчинні і некристалотвірні речовини зовнішнього походження. Це неактивні елементи деградації тканин, сторонні нерозчинні мікродомішки, залишки їжі та інші компоненти, залишки яких завжди містяться у краплі ротової рідини. Фізичним очищенням порожнини рота полосканням водою досягалося зменшення концентрації завад, але повністю позбутися їх впливу на зображення кристалів не вдавалося (див. рис. 4).

Своїм вмістом у фації та подібністю за оптичною щільністю до кристалів такі утворення спотворюють реальні геометричні розміри кристалічної текстури фації і, як наслідок, вносять похибку у висновок про частку оптично щільних кристалів на мікроскопічному зображенні. Відповідно, вони є завадою для отримання чітких фотозображень і точності їх аналізу. Насамперед це стосувалося похибок при великому збільшенні мікроскопа, коли треба отримувати фактичні розміри і співвідношення компонентів кристалічної структури, оцінювати текстуру й окремі її зони методами морфометрії та комп'ютерного аналізу.

Для вивчення чинників і властивостей очищення утвореної фації від неактивних нерозчинних домішок застосували розчинення первинної фації певної маси додатково доданою краплею розчинника (води).

Твердий субстрат первинно утвореної фації покривався новою краплею розчинника (дистильованої води), як показано на рис. 5, спостерігалась повна гідратація фації, після чого здійснювалась дегідратація висушуванням.

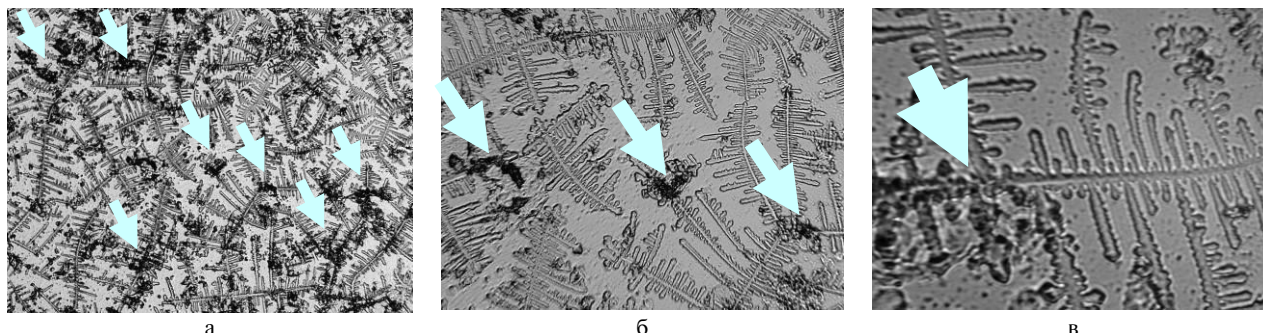


Рисунок 4: Зображення кристалічних утворень у зоні кристалізації фації ротової рідини. Збільшення: (а) 4×; (б) 10×; (в) 40× (стрілками вказано на забруднювальні компоненти)

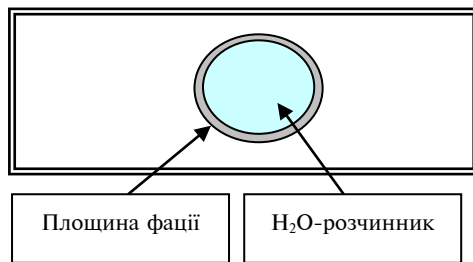


Рисунок 5: Схема нанесення центральної краплі водного розчинника на фацію ротової рідини для її гідратації та подальшого зневоднення висушуванням

Цикл завершувався отриманням твердої фази фації – похідної первинної фації ротової рідини, з оновленою текстурою кристалотворення та її мікроскопічного зображення. Тобто додаванням об'єму розчинника досягалося зменшення значення початкової концентрації кристалотвірних речовин у розчині та створювались умови для кристалотворення подальшою дегідратацією новоутвореного розчину висушуванням з утворенням похідної первинної фації в порядку, що застосовувався для отримання первинної фації ротової рідини.

Аналіз зображень фацій після повторної гідратації–дегідратації показав, що після циклу гідратації первинної фації з подальшою дегідратацією похідна фація зберігає кристалотвірні властивості і здатність до перекристалізації. Збільшення (додавання) кількості водного розчинника впливає на перерозподіл концентрації компонентів фації, гідратаційних, іонних і осмотичних сил переходу її компонентів до нового фізико-хімічного стану, дегідратаційної структуризації та кристалогенезу. Проте названими діями не досягається очищення новоутвореної фації від сторонніх нерозчинних речовин-домішок, які своєю оптичною щільністю формують похибку геометрії та текстури кристалотворення в похідних фаціях.

Для отримання очищеного зображення було застосовано інший підхід. Крапля розчинника (води) наносилась на фацію так, щоб вона покривала площину фації частково, а інша її частина покривала чисте предметне скло, тобто створювались умови обмеженого доступу розчинника до поверхні фації і її часткової гідратації та дії сил екстракції (рис. 6).

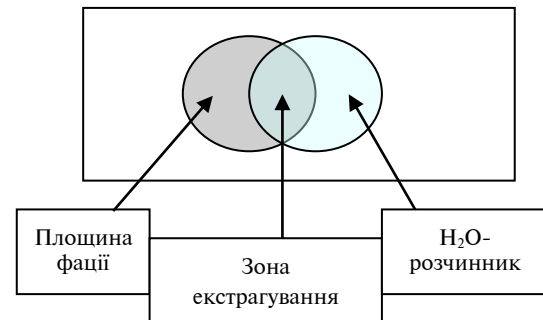


Рисунок 6: Схема нанесення краплі водного розчинника з частковим покриттям фації ротової рідини для її гідратації та подальшого зневоднення висушуванням

При частковій гідратації сухої фації краплею розчинника виникало явище екстракції кристалотвірних компонентів із тіла твердої фації в краплю розчинника, які після проведеного висушування краплі відтворювали візерунки кристалічної структури, причому без наявності забруднювальних домішок, що наповнювали первинну фацію.

На рис. 7а подано фотозображення кристалічної структури фації первинного утворення, де стрілками показано вкраплення залишків їжі, злущених епітеліальних клітини порожнини рота та інших сторонніх неактивних речовин, які спотворюють оптичну картину при оцінках параметрів кристалів і які можуть вносити похибку при автоматизованій обробці зображень.

На рис. 7б подано фотозображення фації, утвореної із застосуванням методу часткової гідратації твердої фації краплею рідини, екстрагування до неї кристалотвірних речовин із твердої фації та подальшого циклу дегідратації з утворенням картини кристалогенезу. Відмінність контрастності кристалічних утворень видно при порівнянні фотографій зони кристалізації фації одного і того ж об'єкта.

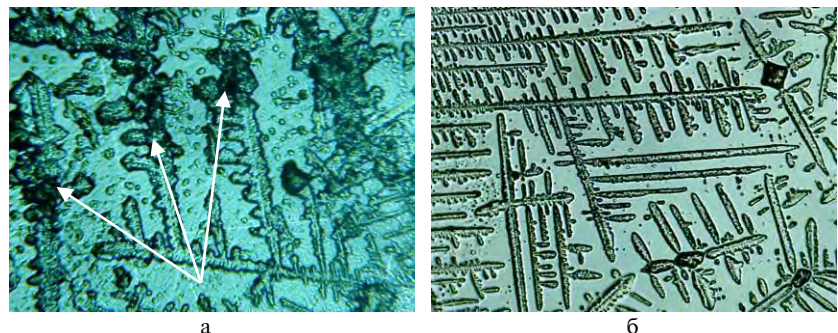


Рисунок 7: Фотозображення дендритних кристалотворень ротової рідини: (а) з наявністю забруднювальних речовин (темні плями чорного кольору показано стрілками); (б) фотозображення тієї ж кристалічної текстури висушеної суміші з ротової рідини, отриманої методом часткової гідратації з подальшою дегідратацією. Збільшення 10x

Обговорення

Отримані результати дослідження свідчать, що циклами часткової гідратації–дегідратації фацій ротової рідини досягається фільтрація (очищення) розчиненої частини фації від неактивних сторонніх домішок, підвищення чіткості зображення кристалічної структури, чого не вдавалося досягти раніше. Як наслідок екстрагування на рис. 8 – межа контакту двох середовищ. Важливу функцію очищення краплі від неактивних домішок ротової рідини відіграють процеси, що виникають на межі контакту частини площини твердої фації з краплею розчинника.



Рисунок 8: Фотозображення кристалічної текстури висушеної суміші з ротової рідини і дистильованої води: 1 – поле фації, частково змоченої краплею, 2 – поле краплі розчинника з екстрагованими через межу контакту компонентами. Збільшення 10×

На межі контакту нерухомого твердого шару фації ротової рідини, при змочуванні його частиною краплі розчинника, створюються умови для процесу екстракції кристалотвірних речовин із фації, де їх концентрація висока, в поле краплі розчинника, що в загальному випадку включає: проникнення водного розчинника екстрагента в пори твердого матеріалу фації ротової рідини, розчинення компонента кристалотвірних речовин та їх перенесення в простір краплі силами екстракції. Завдяки цьому відбувається їх вилучення зі зволоженої суміші фації ротової рідини завдяки дифузії та екстракції. Нейтральні нерозчинні домішки не проявляють достатньої іонної сили, залишаються в полі фації. Тим самим досягається фільтрація, очищення фацій ротової рідини від сторонніх нерозчинних мікродомішок, чого не вдавалося досягти попередніми методами. Як наслідок, значно підвищується точність аналізу кристалічних агрегатів при 10- та 40-кратному оптичному збільшенні й вимірюванні таких параметрів: довжина та ширина основного

стовбура; ступінь кривизни основного стовбура; кількість і характер розгалужень основного стовбура: галуження 1-, 2-го порядку, кут галужень; форма верхівок відростків мікрочастин (списоподібна, округла) тощо (рис. 9).

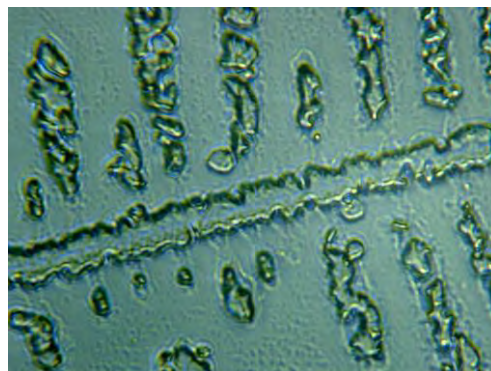
Одержана пропонованим способом чіткість зображення кристалічної текстури підвищує точність комп'ютерної обробки мікроскопічних фотозображень та оцінку кристалічних агрегатів, утворених білково-сольовими компонентами ротової рідини.



а



б



в

Рисунок 9: Зображення кристалічних утворень, отриманих циклами часткової гідратації–дегідратації, у зоні кристалізації зразка фації ротової рідини. Збільшення: (а) 4×; (б) 10×; (в) 40×

Висновки

Кристалотвірні компоненти фації ротової рідини зберігають свої кристалотвірні властивості та здатність до перекристалізації після висихання і можуть відновлювати рівноважний стан під впливом гідратації розчинником.

Гідратація розчинником повної площини твердої фації ротової рідини відновлює розчинення компонентів фації, а подальша дегідратація висушуванням формує оновлену кристалізаційну текстуру похідної фації. При цьому оптично активні домішки і завади залишаються на цифрових зображеннях.

Гідратація розчинником частини площини твердої фації ротової рідини відновлює розчинення й екстрагування компонентів фації в поле краплі розчинника, їх структурування, а подальша дегідратація висушуванням формує

оновлену кристалізаційну текстуру похідної фації. При цьому оптично активні домішки і завади фільтруються, а цифрові зображення кристалізованої структури похідної фації ротової рідини формуються очищеними і набувають значної чіткості.

Використання очищених фотозображень кристалів ротової рідини є важливим елементом для розроблюваних методів числової морфометрії, призначених для оцінки стану людини, зокрема захворювань ротової порожнини і зубів, та зменшення похибки оцінки специфіки форми, розмірів, текстури тощо як поодиноких кристалічних структур, так і їх комплексів автоматизованими комп'ютерними програмами.

У подальшому автори планують створити програму для автоматизованої обробки зображення фацій та дослідити вплив води різного фізико-хімічного складу на ротову рідину людини.

References

- [1] Zaporozhchenko IV. Fractal biological fluids. Actual Problems of the Modern Medicine. 2015;15(4):309-14.
- [2] Shpulina OA, Alieva IM. Oral fluid microcrystallization and prospects of its investigation in preventive dentistry. Ukrainskyi Morfolohichnyi Almanakh. 2012;10(3):177-82.
- [3] Garmash OV, Ryabokon YeM, Garmash YeK. Approaches for using of the crystal optic method in the study of biological fluids. Clinical Pharmacy. 2014;18(4):34-7.
- [4] Tarasevich YuYu. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids. Physics-Uspekhi. 2004;47(7):717-28. DOI: 10.1070/PU2004v047n07ABEH001758
- [5] Markevich VE, Kirilenko EA, Petrashenko VA, Zablotskaya TU, Bilokon TA. Methods of wedge dehydration of biological fluids. Morphologia. 2014;8(1):113-7.
- [6] Yakhno TA, Yakhno VG, Sanin AG, Sanina OA, Pelyushenko AS. Protein and salt: Spatiotemporal dynamics of events in a drying drop. Technical Physics. Rus J Appl Phys. 2004;49(8):1055-63.
- [7] Denisov AB. Algorithm for evaluation of crystal figures obtained after drying of mixed saliva. Bull Exp Biol Med. 2004 Jul;138(1):30-3. DOI: 10.1007/BF02694466
- [8] Spinei A, Picos AM, Romanciuc I, Berar A, Mihailescu AM. The study of oral liquid microcrystallization in children with gastro-esophageal reflux disease. Clujul Medical. 2014;87(4):269-76. DOI: 10.15386/cjmed-387
- [9] Fedorov VO, Ushiy LI, Mamilov SO, Misyra AG. Method analysis crystal form oral fluid. XV Int Young Scientists' Conf Appl Phys. 2015 June. p. 76-7.
- [10] Korol MD. Propedeutics of orthopedic stomatology. Vinnytsya: Nova Knyha; 2009. 200 p.

.....
 А.Г. Мисюра, Л.И. Уший, С.А. Мамилов

КРИСТАЛЛОБРАЗОВАНИЕ В ФАЦИЯХ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ЦИКЛАМИ ИХ ГИДРАТАЦИИ И ДЕГИДРАТАЦИИ

Проблематика. Анализ фотоизображений кристаллических структур, образованных при высушивании биологических жидкостей, в частности ротовой жидкости, широко используется как диагностический метод оценки состояния организма человека. Актуальной задачей является разработка автоматизированных методов численной морфометрии с помощью компьютерных программ для анализа различий формы, размеров, текстуры, цвета и количества кристаллических структур для исключения субъективного вложения и зависимости анализа от квалификации исследователя.

Цель. В работе изучаются процессы дегидратационной структуризации ротовой жидкости и непосредственно формирования кристаллических структур в условиях применения повторных циклов гидратации и дегидратации. Изучается их влияние на образование кристаллической структуры, качество ее воспроизведения на цифровых фотоизображениях фации.

Методика реализации. Образцы ротовой жидкости получали у группы добровольцев в возрасте 19–23 лет, мужчин и женщин. С образцов после их предварительного перемешивания и дегазации до однородного состояния отбирались дозированно капли исследуемой ротовой жидкости и наносились микродозатором на горизонтальное предметное стекло. Проводились циклы частичной гидратации–дегидратации.

Результаты. Рассмотрены процессы повторного растворения твердой фазы высушенной капли ротовой жидкости (фации), осмотического, диффузного, экстракционного перемещения кристаллообразовавшихся веществ и их структуризации после растворения капель новой жидкости и дегидратации высушиванием. Выявлено, что под влиянием циклов гидратации–дегидратации кристаллизованные вещества ротовой жидкости продолжают сохранять свои свойства кристаллообразования в производных фациях. Полученные результаты исследования свидетельствуют, что циклами частичной гидратации–дегидратации фаций ротовой жидкости достигаются фильтрация (очистка) части фации, которая растворяется, от посторонних примесей, повышение четкости изображения кристаллической структуры.

Выводы. Показано, что компоненты кристаллообразования фации ротовой жидкости сохраняют свои кристаллические свойства и способность к перекристаллизации после высыхания и способны восстанавливать уравновешенное состояние под влиянием гидратации растворителем. Гидратация растворителем части плоскости твердой фации восстанавливает растворение и экстрагирование компонентов фации в поле капли растворителя, а последующая дегидратация высушиванием формирует обновленную кристаллизационную текстуру производной фации. При этом оптически активные добавки и помехи фильтруются, а цифровые изображения кристаллизованной структуры производной фации ротовой жидкости формируются очищенными и приобретают значительную четкость. Предлагаются разработанные алгоритмы, формальные процедуры и средства получения электронного фотоизображения кристаллизованной текстуры производных фаций.

Ключевые слова: фация капли; ротовая жидкость; текстура кристаллов; циклы гидратации–дегидратации; цифровая микроскопия; фотометрия; анализ фотоизображения.

.....
A.G. Misyura, L.I. Ushiy, S.A. Mamilov

CRYSTAL FORMATION IN THE FACIES OF ORAL FLUID THEIR CYCLES OF HYDRATION AND DEGRADATION

Background. Analysis of photographs of crystalline structures formed during drying of biological fluids and in particular oral liquid, is widely used as a diagnostic method for assessing the state of the human body. The urgent task is the development of automated methods of numerical morphometry with the help of computer programs for analyzing the differences in the shape, size, texture, color and number of crystalline structures to exclude subjective contributions and dependence of analysis on the qualifications of the researcher.

Objective. Study of processes of dehydration structurization of oral liquid and direct formation of crystalline structures in conditions of application of repeated cycles of hydration and dehydration. They studied their influence on the formation of the crystalline structure, on the quality of its reproduction on digital photos of the facies.

Methods. Oral liquor samples were given to groups of volunteers aged 19–23, men and women. From the samples after their preliminary mixing and degassing to a homogeneous state, drops of the examined oral liquid were dosed and microaspirators were applied to the horizontal objective glass. There were cycles of partial hydration–dehydration.

Results. The processes of repeated dissolution of the solid phase of the dried drop of the oral liquid (facies), the conditions of osmotic, diffusion, extraction displacement of crystalline substances and their structuring after dissolution of a drop of a new liquid and dehydration by drying are considered. It was found that under the influence of cycles of hydration–dehydration, crystalline substances of the oral liquid continue to preserve their crystalline properties in the derivative facies. The obtained results of the study indicate that the cycles of partial hydration - dehydration of the facies of the oral liquid – are achieved by filtration (purification) of the release of a part of the dissolved facies from foreign impurities, and the clarity of the image of the crystalline structure.

Conclusions. It has been shown that the crystal-forming components of the facial fluid of the mouth retain their crystalline properties and the ability to recrystallize after drying and are capable of restoring a balanced state under the influence of solvent hydration. Hydration by a solvent of a particle of a solid facial plane restores the dissolution and extraction of the facial components in the drop field of the solvent, and the subsequent dehydration by drying forms the updated crystallization texture of the derivative of the facies; while the optically active impurities and interferences are filtered, and digital images of the crystallized structure of the derivative of the facial fluid of the mouth are formed by purified and gaining a high degree of clarity. The offered algorithms, formal procedures and means of obtaining an electronic image of crystallized textures of derivative facies are offered.

Keywords: drop facia; mouth liquid; crystal texture; hydration cycles; dehydration; digital microscopy; photometry; photo analysis.

ОЦІНКА КРИТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ПРОЦЕСУ КУЛЬТИВУВАННЯ У БІОТЕХНОЛОГІЇ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ

С.М. Семенюк, В.Ю. Шибецький*, В.М. Поводзинський, С.І. Костик

КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: v.shybetsky@gmail.com

Received 13 February 2018; Accepted 5 March 2018

Проблематика. Виробництво лікарських засобів визначеної якості, ефективності та безпечності ніколи не втрачало своєї актуальності. Сучасні системи забезпечення та керування якістю – належна виробнича практика – враховують існування критичних стадій та критичних параметрів процесу. Виробництво біологічних лікарських засобів способами культивування клітин або при використанні класичної ферментації відноситься до критичних стадій і потребує адекватних методик валідації процесів культивування в оригінальних ферментерах і ферментерах, у які внесені конструкційні зміни.

Мета. Метою дослідження є апробація методик оцінки гідродинамічної обстановки у ферментері з класичним перемішувальним пристроєм і специфічним перемішувальним пристроєм V-blade на модельних середовищах та різних імітаційних об'єктах, а також визначення залежності змін гідродинамічних характеристик від основних критичних параметрів процесу.

Методика реалізації. Гідродинамічна обстановка у ферментері характеризується специфічними параметрами потоків наявних фаз. Для визначення специфіки руху потоків запропоновано методи візуалізації та метод вирівнювання концентрації трасера – час гомогенізації.

Результати. Методами візуалізації, що проведені при швидкісній зйомці, було виявлено специфічні особливості потоків для різних перемішувальних пристроїв. Більш адекватним і зручним для оцінки гідродинамічної обстановки у ферментері при зміні факторів зовнішнього оточення виявився метод введення хімічного трасера й оцінки часу гомогенізації за зміною рН.

Висновки. Доведено можливість використання простої та легко відтворюваної методики для валідації ферментаційного обладнання при оцінці критичних стадій виробництва біологічних лікарських засобів способами культивування клітин або при використанні класичної ферментації. Показана висока ефективність мішалки V-blade порівняно з типовою конструкцією.

Ключові слова: біотехнологія; належна виробнича практика; критична виробнича стадія; ферментер; гідродинаміка; мішалка V-blade.

Вступ

Виробництво лікарських засобів, що повинні мати відповідну якість, безпечність та ефективність, сучасними прийомами біотехнології має базуватись на організації виробництва відповідно до вимог належної виробничої практики (НВП) – Good Manufacturing Practice. Як визначено у Настанові СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 “Лікарські засоби. Належна виробнича практика”, НВП є частиною системи забезпечення якості, яка гарантує, що лікарські засоби (ЛЗ) постійно виробляються і контролюються за стандартами якості, які відповідають її призначенню, а також відповідають вимогам реєстраційних документів (реєстраційному досьє) або специфікації на ЛЗ.

Одною зі специфічних умов НВП на стадії виробництва є те, що повинні бути виконані вимоги на етапі організації технологічного проце-

су, і це означає, що всі виробничі процеси мають бути чітко визначені, а критичні стадії виробничого процесу повинні пройти валідацію.

У цьому випадку *критична виробнича стадія* технологічного процесу є вимогою до випробувань, які слід підтримувати в межах заздалегідь встановлених критеріїв для забезпечення відповідності активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) своїм специфікаціям – НВП. Під *критичними виробничими стадіями* розуміють процеси, що мають значний вплив на кінцевий результат, тобто якість, безпеку та ефективність кінцевого продукту.

Але, на жаль, НВП (GMP) не містить методу визначення того, який процес є критичним.

Означені стадії виробництва представлені у Реєстраційному досьє – Модуль 3. Якість. Хімічна, фармацевтична та біологічна інформація про лікарські засоби, що містять хімічні та/або біологічні діючі речовини. Розділ. 3.2.Р.3.4. Контроль критичних стадій і проміжної продукції.

НВП вимагає того, щоб критичні виробничі стадії підлягали обов'язковому контролю стосовно *критичних параметрів процесу*, і до них відносять ті параметри моніторингу та контролю, зміна яких може вплинути на критичний показник, що характеризує якість АФІ.

Конкретика контролю виробництва полягає в тому, що в Реєстраційному досьє в розділі 3.2.S.2.2 “Опис виробничого процесу та його контролю” потрібно наводити критичні показники якості (Critical Quality Attribute – CQA), які своєю чергою є контрольованими і до яких належать фізичні, хімічні, біологічні чи мікробіологічні властивості або характеристики, що для забезпечення необхідної якості продукції мають знаходитися у відповідних межах і відповідному діапазоні.

У сучасному реєстрі лікарських засобів значне місце посідають імунобіологічні препарати, які відповідно до НВП відносяться до *біологічних лікарських препаратів*, якими вважаються ті, у яких діюча речовина (АФІ) є біологічною речовиною. Своєю чергою біологічною речовиною є та речовина, що виробляється біологічним джерелом або екстрагується з нього.

Згідно з Настановою СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 “Лікарські засоби. Належна виробнича практика” до біологічних лікарських препаратів відносять імунологічні лікарські препарати (вакцини, токсини, сироватки або препарати алергенів) і препарати, що отримані біотехнологічними прийомами:

- технологією рекомбінантної ДНК;
- при контрольованій експресії генів, що кодують біологічно активні білки у прокариотів та еукаріотів, у т.ч. трансформовані клітини ссавців;
- методи гібридоми і моноклональних антитіл.

Відповідно до вимог НВП виробництво біологічних АФІ для людини реалізується культивуванням клітин та ферментацією і, в загальному випадку, проводиться при використанні біологічних агентів (БА), якими є клітини та природні або рекомбінантні мікроорганізми.

Існують суттєві відмінності у критичних параметрах процесу виробництва біологічних АФІ і АФІ із синтетичної сировини. На відміну від АФІ, синтезованих у хімічному процесі, за участі синтетичної сировини, АФІ біологічного походження, що отримані “за допомогою культивування клітин або ферментації з використанням природних або рекомбінантних мікроорганізмів”, знаходяться в зоні впливу значної кількості факторів зовнішнього оточення.

Для адекватного розуміння, які фактори визначають зовнішнє оточення, і аналізу можливості впливу на результати культивування їх можна згрупувати у такі блоки:

1. Фактори на етапі проведення підготовчих робіт технологічного та санітарно-гігієнічного призначення:

- проведення мийки і робіт з дезінфекції та стерилізації (стерилізація гострою паром, підготовка та стерилізація газів у повітряних фільтрах тонкого очищення тощо);
- перевірка і технічне забезпечення асептики (герметизація обладнання, герметизація відкритих трубних закінчень, монтаж парових затворів, використання багатоходових вентилів, використання мембранних вентилів і паровідвідників, використання галоїдних течешукачів тощо).

2. Фактори на етапі виробничого культивування:

- фізичні чинники (інтенсивність гідравлічних/гідродинамічних процесів, процеси масо- і теплообміну);
- хімічні чинники (зміна складу живильного середовища – сорбція/метаболізм поживних речовин і утворення метаболітів, що призводить до зміни концентрації взаємодіючих фаз, тощо);
- біологічні чинники (можлива зміна фенотипічних ознак БА, можливість контамінації, зміна конфірмаційної структури АФІ тощо);
- технологічні чинники (відбір проб, підживлення, титрування, регулювання рівня піни, підведення і відведення газової фази).

У Наставі 42-3.5:2016 “Лікарські засоби. Валідація процесів” *валідація процесу (Process Validation)* визначається як “документоване підтвердження того, що процес, який відбувається в межах встановлених параметрів, може здійснюватися ефективно та з відтворюваними результатами і призводить до отримання лікарського препарату, що відповідає заздалегідь встановленим специфікаціям і показникам якості”.

Валідація заснована на проведенні випробувань у реальних виробничих умовах з необхідним числом повторень для забезпечення достовірності отриманих результатів. Тому вона є найбільш складним і дорогим процесом, що вимагає значних ресурсів підприємства.

Виявлення критичних процесів виробництва дає змогу саме на них зосередити насамперед людські та фінансові ресурси. Це дає можливість отримати кращі результати за менших витрат.

Наведена аргументація визначає, що стадія культивування/ферментації є критичною стадією зі значною кількістю впливових зовнішніх чинників, і цей факт обумовлює цілий блок супутніх процедур, найбільш суттєвою з яких є валідація технологічних процедур.

Метою нашого дослідження є вирішення проблеми стосовно валідаційних процедур для стадії культивування, що не можуть бути реалізовані в умовах культивування, зважаючи на їх високу вартість, тому оцінка впливовості факторів зовнішнього оточення повинна проводитись на модельних середовищах для оцінки інтенсивності *гідродинамічних* процесів і процесів масопередачі.

Матеріали і методи

Оцінка гідродинамічного режиму роботи ферментера. Специфічною особливістю етапу культивування БА є те, що він реалізується в штучно створених умовах, при цьому в нас є можливість керувати факторами зовнішнього оточення при збереженні стабільності фенотипу БА. Серед таких найбільш популярних факторів зовнішнього впливу можна відзначити зміну гідродинамічних параметрів, які своєю чергою визначають інтенсивність процесів масо- та теплопереносу [1].

Як правило, формування зовнішнього оточення реалізується у біологічних реакторах – ферментерах різних конструкцій [2–4]. Конструювання ферментера/біореактора базується на оптимізації факторів зовнішнього впливу з метою досягнення високої ефективності з напрацювання цільового продукту – АФІ [5, 6].

У роботі була поставлена задача дослідження гідродинамічного становища у ферментері на модельному середовищі як методу валідації інтенсивності перемішування.

Як об'єкт дослідження були вибрані мішалка V-blade [1] і типова шестилопатева турбінна мішалка відкритого типу, що встановлені у ферментер запатентованої конструкції (Пат. Україна № 116783U. Апарат для культивування клітин, опубл. 12.06.2017, Бюл. 11/2017; Пат. Україна № 116784U. Апарат для культивування клітин, опубл. 12.06.2017, Бюл. 11/2017) (рис. 1).

Для створення фізичної моделі мішалки V-blade і типової шестилопатевої турбінної мішалки відкритого типу було проведено математичне моделювання гідродинамічних процесів ферментера ідеального змішування.

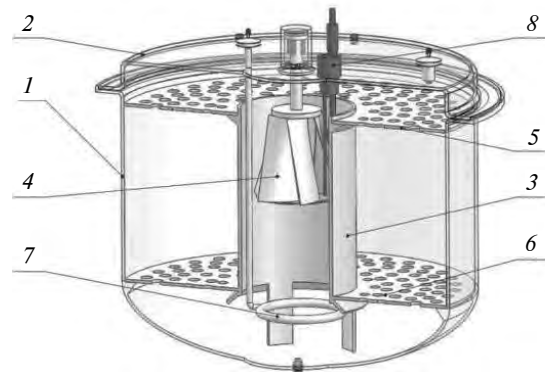


Рисунок 1: Конструкція ферментера/біореактора: 1 – корпус; 2 – кришка; 3 – циркуляційна труба; 4 – перемішувальний пристрій V-blade; 5 – верхня решітка; 6 – нижня решітка; 7 – барботер; 8 – датчики контролю

Моделювання ферментера і перемішувального пристрою. Для моделювання гідродинаміки ферментера використовується k - ϵ модель турбулентності.

Щоб замкнути турбулентність, необхідно визначити зв'язок між напруженнями за Рейнольдсом і параметрами усередненого потоку. Цей зв'язок визначають за допомогою різних моделей турбулентності.

У цих моделях покладають певні припущення, на основі яких вводиться достатня кількість рівнянь, що дає змогу знайти всі невідомі. Одним із таких припущень є введення турбулентної в'язкості, яке вперше здійснив Ж. Буссінеск (1877 р.).

Турбулентну динамічну в'язкість вводять по аналогії з динамічною в'язкістю:

$$-\overline{\rho u_i' u_j'} = \mu_t \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right).$$

Далі перейдемо безпосередньо до отримання стандартної k - ϵ моделі турбулентності з двох рівнянь, яка нарізі розглядається як стандартна модель для опису турбулентності та розв'язання інженерних задач. У цій моделі вводяться два важливих поняття – генерація P і дисипація ϵ . Фізичний сенс генерації турбулентності P полягає в породженні нових вихорів і пульсацій, які й утворюють турбулентність. Дисипація ϵ , навпаки, являє собою розсіювання великих вихорів на менші, призводить до усереднення течії та зменшення турбулентності. Два рівняння переносу дають змогу розглядати турбулентність у просторі й часі. Ця модель є напівемпіричною і спирається на феноменологічний підхід та результати, отримані дослідним шляхом.

Виконавши деякі алгебричні перетворення і помноживши на u_j , рівняння

$$\rho \left(\frac{\partial \overline{u_i}}{\partial t} + \overline{u_i} \frac{\partial \overline{u_i}}{\partial x_j} \right) = \rho \overline{g_i} + \frac{\partial}{\partial x_j} (\overline{\sigma_{ij}} - \rho \overline{u'_i u'_j})$$

можна звести до такого вигляду:

$$\begin{aligned} \partial_t \overline{u'_i u'_j} + \overline{u'_k} \partial_k \overline{u'_i u'_j} = & -\frac{1}{\rho} (\overline{u'_j} \partial_i p + \overline{u'_i} \partial_j p) - \\ & - 2\nu \overline{\partial_k u'_i \partial_k u'_j} - \overline{\partial_k u'_k u'_i u'_j} - \\ & - \overline{u'_k u'_j} \partial_k u_i - \overline{u'_j u'_k} \partial_k u_j + \nu \nabla^2 \overline{u'_i u'_j}. \end{aligned} \quad (1)$$

Позначимо кінетичну енергію турбулентності $k = 0,5 \overline{u'_i u'_i}$ і підставимо в рівняння (1), покладаючи $i = j$:

$$\begin{aligned} \partial_t k + \overline{u'_k} \partial_k k = & -\frac{1}{\rho} \partial_i \overline{u'_i p} - \overline{\nu \partial_k u'_i \partial_k u'_i} - \\ & - \frac{1}{2} \overline{\partial_k u'_k u'_i u'_i} - \overline{u'_i u'_k} \partial_k u_i + \nu \nabla^2 k. \end{aligned} \quad (2)$$

Другий доданок правої частини (2), за визначенням, є дисипацією:

$$\varepsilon = \overline{\nu \partial_k u'_i \partial_k u'_i}, \quad (3)$$

у той час як четвертий доданок правої частини виразу (2), включаючи мінус, за визначенням – генерація:

$$P = -\overline{u'_i u'_k} \partial_k u_i. \quad (4)$$

Далі робиться допущення, що

$$-\partial_j \left(\frac{1}{2} \overline{u'_j u'_i u'_i} - \frac{1}{\rho} \overline{u'_i p} \right) \approx \partial_j (\nu_T \partial_j k). \quad (5)$$

Враховуючи (3)–(5), рівняння (1) можна записати в такому вигляді:

$$\frac{1}{\rho} \partial_t k + \overline{u'_j} \partial_j k = P - \varepsilon + \partial_j \left(\left(\nu + \frac{\nu_T}{\sigma_k} \right) \partial_j k \right), \quad (6)$$

що відображає залежність кінетичної енергії k від гідродинамічних параметрів системи. σ_k – параметр, що забезпечує потрібну розмірність для доданка з ν_k . Зазвичай покладається $\sigma_k = 1$. Рівняння для дисипації ε аналітично не виводиться і просто записується по аналогії з (6):

$$\partial_t \varepsilon + \overline{u'_j} \partial_j \varepsilon = \frac{C'_{1\varepsilon} P - C'_{2\varepsilon} \varepsilon}{T} + \partial_j \left(\left(\nu + \frac{\nu_T}{\sigma_\varepsilon} \right) \partial_j \varepsilon \right), \quad (7)$$

де $T = k/\varepsilon$ забезпечує потрібну розмірність, а константи $C'_{1\varepsilon}$, $C'_{2\varepsilon}$, σ_ε вводяться, оскільки форма рівняння (7) лише передбачається, а не виводиться аналітично.

На підставі математичного моделювання були отримані параметри мішалки, що була виготовлена як просторова модель. Мішалки V-blade і турбінна 6-лопатева відкрита були надруковані на 3D-принтері (рис. 2). Використовувався друк за технологією пошарового накладання розплавленої полімерної нитки (Fused Deposition Modeling – FDM). Принцип друку полягає в тому, що нитка з поліетилентерефталату (PET) нагрівається до розплавленого стану і пошарово формується задана конструкція шляхом екструзії (PET).

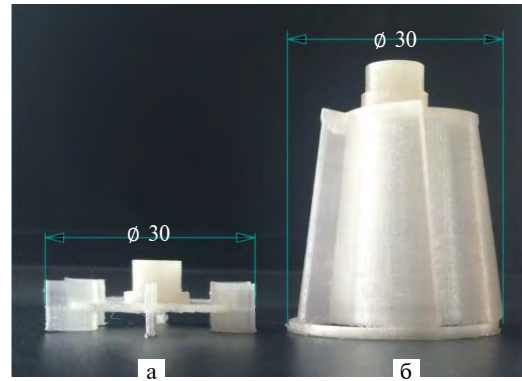


Рисунок 2: Надруковані на 3D-принтері мішалки: (а) турбінна шестилопатева відкрита; (б) V-blade

Дослідження потоків двофазової системи проводились на лабораторній установці (рис. 3).

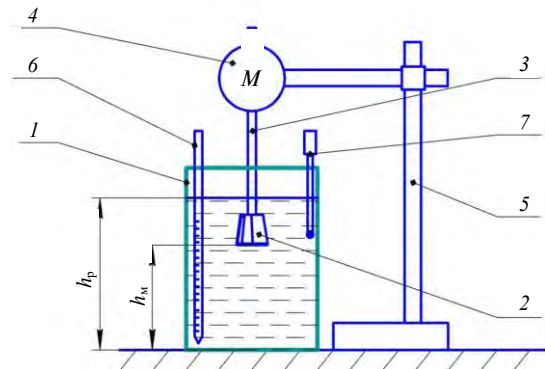


Рисунок 3: Схема експериментальної установки – перемішувального пристрою спеціальної конструкції: 1 – ферментер, 2 – перемішувальний пристрій V-blade, 3 – вал перемішувального пристрою, 4 – електродвигун із регульованою частотою обертання вала, 5 – штатив, 6 – пристрій для вводу трасера, 7 – датчик рН-метра; h_m – висота від дна ємності до мішалки, h_p – висота рідини в ємності

У реактор вводились відмінні від рідини за густиною засоби візуалізації. Як засоби візуалізації було взято контрастні рідини та пластівці полімеру, за густиною близькі до густини біомаси.

Результати

На початку перемішування мішалкою V-blade формуються висхідні потоки з дна ємності, одночасно відбувається відкидання об'ємів рідини по периферії мішалки. При чому чим менші оберти мішалки, тим довше формуються висхідні потоки, але навіть на великій відстані від дна (180 мм) і при малих обертах ($2,03 \text{ c}^{-1}$) спостерігається всмоктування об'ємів рідини в нижній частині та перерозподіл їх у верхній.

На рис. 4 показаний ефект створення вихорів контрастної рідини.

На рис. 5 спостерігається яскраво виражений насосний ефект, який характеризує здатність перемішувального пристрою до інтенсивної гомогенізації вмісту реактора. Цей перемішувальний пристрій забезпечує всмоктування рідини з центральної нижньої частини апарата й перерозподіл їх у верхній частині.

Оцінка часу гомогенізації для різних конструкцій перемішувальних пристроїв проводилася з метою виявлення доступного методу для

валідації ферментерів і порівняльної оцінки двох типів перемішувальних пристроїв.

Гідродинамічні параметри ферментера, такі як розподіл градієнтів швидкості потоків взаємодіючих фаз, насосний ефект мішалки, час циркуляції та час перемішування системи (час гомогенізації), можуть слугувати основою для порівняльної оцінки роботи різних типів реакторів. Тому дослідження (візуальні, якісні, кількісні) мають важливе значення у валідації процесів та обладнання при їх експлуатації.

Час гомогенізації визначається часом, необхідним для досягнення заданого ступеня однорідності з моменту початку перемішування неоднорідного середовища або з моменту подачі в апарат (при працюючій мішалці) компонентів, які відрізняються від наявних у ферментері [7].

Гомогенізація як результат процесу перемішування характеризується зміною поля концентрацій однієї речовини в іншій.

В умовах проведення дослідження був використаний електронний рН-метр, електрод якого знаходився в апріорно визначеній застійній зоні – у “слабкій точці”. Він реєстрував зміни рН за відповідні проміжки часу від початку введення в об'єм робочого середовища рідини кислотного або лужного трасера до сталих значень рН. Цей проміжок часу був нами визначений як час гомогенізації, або час повного змішування.

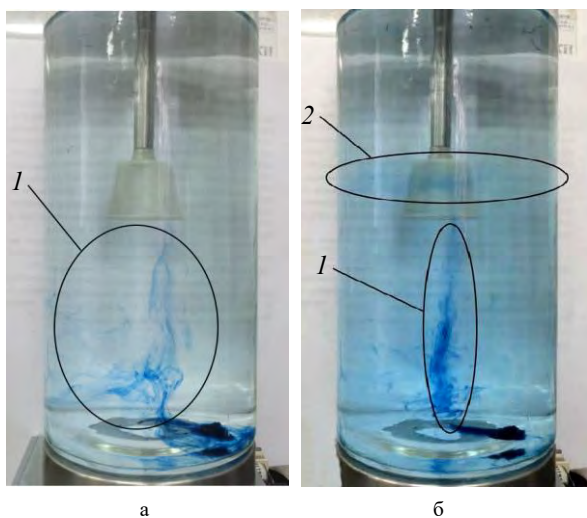


Рисунок 4: Візуалізація потоків, створюваних мішалкою V-blade ($h_m = 120 \text{ мм}$, швидкість обертання – $3,73 \text{ c}^{-1}$): (а) 10 с від початку перемішування: 1 – область формування висхідних потоків; (б) 20 с від початку перемішування: 1 – сформований висхідний потік, 2 – радіальні потоки по периферії мішалки

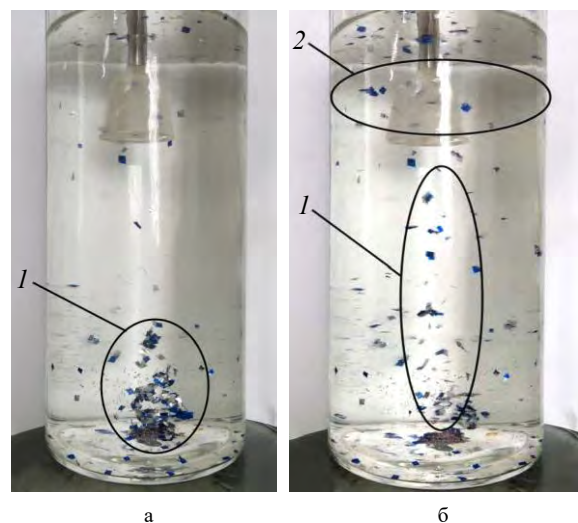


Рисунок 5: Візуалізація потоків, створюваних мішалкою V-blade ($h_m = 180 \text{ мм}$, швидкість обертання – $2,23 \text{ c}^{-1}$): (а) 57 с від початку перемішування: 1 – область формування висхідних потоків; (б) 63 с від початку перемішування: 1 – сформований висхідний потік, 2 – радіальні потоки по периферії мішалки

Обговорення

Результатом проведення дослідження методом оцінки швидкості зміни рН є залежність часу перемішування від висоти розміщення мішалки відносно днища апарата або від відстані відносно перемішувального пристрою. Область з мінімальним часом гомогенізації свідчить про наявність зони з максимальною інтенсивністю перемішування. Методика має низку переваг порівняно з іншими – простота реалізації, точність отриманих даних, безпечність тощо.

У результаті проведених нами досліджень були отримані графічні інтерпретації процесу (рис. 6–8).

Відкрита турбінна мішалка є типовим імпульсом у ферментерах із введенням енергії механічними перемішувальними пристроями. Порівняння цієї конструкції з іншими новітніми конструкціями є методом коректної оцінки створеної гідродинамічної обстановки у ферментері. При цьому візуалізація потоків рідинної фази є перспективним методом оцінки взаємодіючих фаз у ферментері (див. рис. 4, 5). Ця методика оцінювання процесу перемішування не потребує складного оснащення і дає змогу наочно оцінити гідродинаміку ферментера.

Наведені результати дослідження мішалки V-blade (див. рис. 4, 5) наочно демонструють, що вона забезпечує створення циркуляційного контуру за рахунок всмоктування дисперсної фази з центральної нижньої частини апарата і перерозподіл її у верхній частині. Такий всмоктувальний ефект дає змогу унеможливити формування застійних зон і формування джерела контамінації у ферментері.

Порівняння типового перемішувального пристрою – відкритої турбінної мішалки – та мішалки V-blade за різних швидкостей обертання вала перемішувального пристрою (рис. 6–8) показало, що досліджувана мішалка має низку переваг, а саме: потік в осьовому напрямку більш виражений, ніж у турбінній мішалці, при збереженні радіальної і тангенційної складових; висока всмоктувальна здатність при підйомі твердих частинок з дна ємності. Це дає змогу оцінити її як ефективний засіб для попередження утворення застійних зон у ферментері.

Більша ефективність гомогенізації досягнута за низьких швидкостей обертання мішалки, що є суттєвою перевагою такої конструкції мішалки у виробництві біологічних АФІ при використанні еукаріотичних БА.

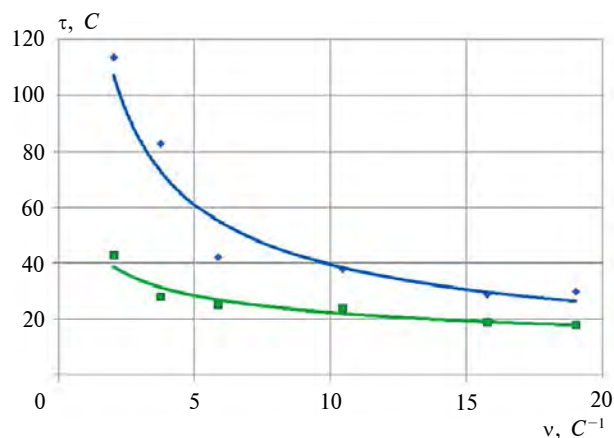


Рисунок 6: Графік залежності часу гомогенізації для мішалок V-blade і турбінної від кількості обертів при h_m 150 мм: \blacklozenge – V-blade, \blacksquare – турбінна

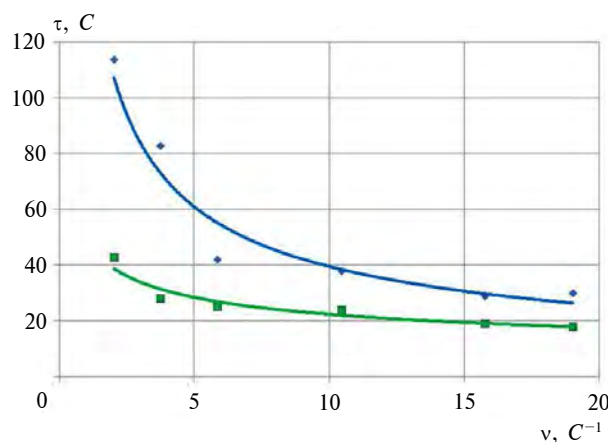


Рисунок 7: Графік залежності часу гомогенізації для мішалок V-blade і турбінної від кількості обертів при h_m 110 мм: \blacklozenge – V-blade, \blacksquare – турбінна

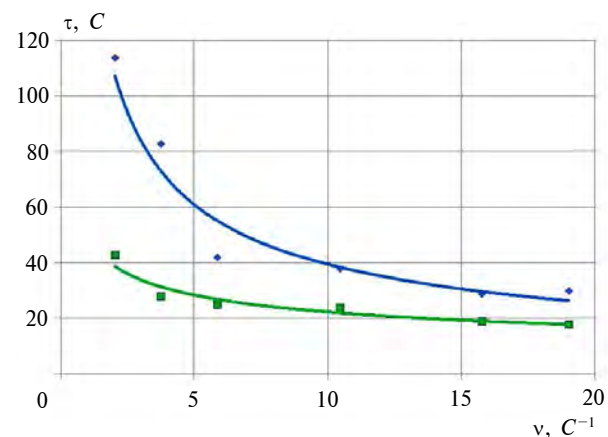


Рисунок 8: Графік залежності часу гомогенізації для мішалок V-blade і турбінної від кількості обертів при h_m 65 мм: \blacklozenge – V-blade, \blacksquare – турбінна

Висновки

Проведення досліджень гідродинаміки та масопередачі на модельних середовищах з метою валідації ферментаційного обладнання для біотехнологічних процесів виробництва АФІ дає змогу отримати надійні результати при оцінці біотехнологій АФІ на стадії культивування в межах критичних параметрів процесу. Доведена можливість використання простої та легко відтворюваної методики для валідації ферментаційного обладнання при оцінці критичних стадій виробництва біологічних лікарських засобів способами культивування клітин або при використанні класичної ферментації.

Показана висока ефективність мішалки V-blade порівняно з відомими типовими конструкціями.

Гідродинамічні параметри ферментера, такі як розподіл градієнтів швидкості потоків взаємодіючих фаз, насосний ефект мішалки, час циркуляції та час перемішування системи (час гомогенізації), можуть слугувати основою для порівняльної оцінки роботи різних типів реакторів. Тому дослідження (візуальні, якісні,

кількісні) мають важливе значення у валідації процесів та обладнання при їх експлуатації.

Цей напрям досліджень і методичні підходи дають змогу ефективно валідувати біотехнології виробництва АФІ біологічних ЛЗ.

Методики візуалізації та оцінки гідродинамічних параметрів процесу з використанням хімічного трасера є досить універсальними і можуть бути використаними як на етапі дослідження, так і у валідаційних процедурах виробничого процесу.

Важливим лімітуючим параметром при культивуванні, як відомо, є напруження зсуву, величина якого пропорційна динамічній в'язкості рідини і швидкості зсуву потоку. Для можливості використання мішалки V-blade необхідно встановити цей параметр, однак експериментально його визначити на разі неможливо. Тому планується проведення комп'ютерного моделювання цього пристрою в середовищі ANSYS, що дасть можливість отримати дані по величині та розподілу швидкостей зсуву потоку залежно від різних режимів роботи перемішувального пристрою та встановити значення напружень зсуву.

References

- [1] Shybetskiy V, Semeniuk S, Kostyk S. Design of construction and hydrodynamic modeling in a roller bioreactor with surface cultivation of cell cultures. *ScienceRise*. 2017;7:53-9. DOI: 10.15587/2313-8416.2017.107176
- [2] Zhao F, Ma T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: Dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng*. 2005;91(4):482-93. DOI: 10.1002/bit.20532
- [3] Chawla M, Bodnar C, Sen A, Kallos M, Behie L. Production of islet-like structures from neonatal porcine pancreatic tissue in suspension bioreactors. *Biotechnol Prog*. 2006;22(2):561-7. DOI: 10.1021/bp050261i
- [4] van der Velden-de Groot C. Microcarrier technology, present status and perspective. *Cytotechnology*. 1995 Jan;18(1-2):51-6. DOI: 10.1007/bf00744319
- [5] Arora M. Cell culture media: A Review. *Mater Methods*. 2013;3:175. DOI: 10.13070/mm.en.3.175
- [6] Eibl R, Eibl D, Pörtner R, Catapano G, Czermak P. *Cell and tissue reaction engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
- [7] Zakomorny D, Kytovy M, Shybetskiy V, Povodzinsky V, Kostyk S. Hydrodynamics of fermenter with multi-shaft stirrer. *ScienceRise*. 2016;5(2):65. DOI: 10.15587/2313-8416.2016.69451

С.М. Семенюк, В.Ю. Шибецкий, В.М. Поводзинский, С.И. Костик

ОЦЕНКА КРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ

Проблематика. Производство лекарственных средств определенного качества, эффективности и безопасности никогда не теряло своей актуальности. Современные системы обеспечения и управления качеством – надлежущая производственная практика – учитывают существование критических стадий и критических параметров процесса. Производство биологических лекарственных средств способами культивирования клеток или при использовании классической ферментации относится к критическим стадиям и нуждается в адекватных методиках валидации процессов культивирования в оригинальных ферментерах и аппаратах, в которые внесены конструкционные изменения.

Цель. Целью исследования является апробация методик оценки гидродинамической обстановки в ферментере с классическим перемешивающим устройством и специфическим перемешивающим устройством V-blade на модельных средах и на различных

имитационных объектах, а также определение зависимости изменения гидродинамических характеристик от основных критических параметров процесса.

Методика реализации. Гидродинамическая обстановка в ферментере характеризуется специфическими параметрами потоков взаимодействующих фаз. Для определения специфики движения потоков предложены методы визуализации и метод выравнивания концентрации трассера – время гомогенизации.

Результаты. Методами визуализации, проведенными при скоростной съемке, были выявлены специфические особенности потоков для различных перемешивающих устройств. Более адекватным и удобным для оценки гидродинамической обстановки в ферментере, при изменении факторов внешнего окружения, оказался метод ввода химического трассера и оценки времени гомогенизации по изменениям pH.

Выводы. Доказана возможность использования простой и легко воспроизводимой методики для валидации ферментационного оборудования при оценке критических стадий производства биологических лекарственных средств способами культивирования клеток или при использовании классической ферментации. Показана высокая эффективность мешалки V-blade по сравнению с обычной конструкцией.

Ключевые слова: биотехнология; надлежащая производственная практика; критическая производственная стадия; ферментер; гидродинамика; мешалка V-blade.

.....
S.M. Semenyuk, V.Yu. Shybetsky, V.M. Povodzinsky, S.I. Kostyk

ASSESSMENT OF CRITICAL PARAMETERS OF THE CULTIVATING PROCESS IN BIOTECHNOLOGY OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

Background. The production of medicines of a certain quality, efficiency, and safety has never lost its relevance. Modern quality assurance and quality management systems – Good manufacturing practice – take into account the existence of critical stages and critical process parameters. The production of biological drugs by cell culture methods or using classical fermentation refers to the critical stages and they need adequate methods of validating the cultivation processes in the original fermenters and equipment to which structural changes have been made.

Objective. The aim of the study is to test the methods for evaluating the hydrodynamic situation in a fermenter with a classic mixer and a specific V-blade mixer, in model environments and on various imitation objects, and to determine the dependence of the change in hydrodynamic characteristics on the main critical parameters of the process.

Methods. The hydrodynamic situation in the fermenter is characterized by specific parameters of the flows of the existing phases. To determine the specificity of the flows, methods of visualization and a method for equalizing the tracer concentration, the homogenization time, are proposed.

Results. The visualization methods carried out during high-speed photography revealed specific flow characteristics for various mixing devices. More adequate and convenient for assessing the hydrodynamic situation in the fermenter, with changing environmental factors, was the introduction of a chemical tracer and an estimate of the homogenization time from the pH changes.

Conclusions. The possibility of using a simple and easily repeatable technique for the validation of fermentation equipment in assessing critical stages in the production of biological medicines by cell culture methods or using classical fermentation has been proved. The high efficiency of the V-blade agitator is shown in comparison with the conventional design.

Keywords: biotechnology; good manufacturing practice; critical production stage; fermenter; hydrodynamics; V-blade mixer.

СУЧАСНІ МЕТОДИ ПЕРЕРОБКИ Й УТИЛІЗАЦІЇ ЗЕРНОВОЇ ПІСЛЯСПИРТОВОЇ БАРДИ

Н.Б. Голуб, М.В. Потапова*

КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: maryana.potapova2@gmail.com

Received 11 March 2018; Accepted 12 May 2018

У всьому світі спиртова промисловість зіштовхнулася із проблемою накопичення відходу виробництва спирту – післяспиртової барди. За рахунок високих показників хімічного та біохімічного споживання кисню, завислих речовин, специфічного кольору та запаху, низького значення рН очищення таких відходів на полях фільтрації чи їх скид у водойми неможливі. Метою нашої роботи є: (1) проведення аналізу існуючих методів переробки зернової післяспиртової барди; (2) окреслення завдань, які необхідно вирішити для її ефективної утилізації; (3) визначення найбільш перспективних та ефективних методів переробки зернової післяспиртової барди. Встановлено, що існуючими методами її переробки є біологічні, фізико-хімічні, а також використання в сільському господарстві як нативної барди, так і продуктів її переробки. До найпростіших методів утилізації зернової післяспиртової барди належить її використання для годування великої рогатої худоби або фертигація, оскільки в барді міститься широкий спектр мінеральних і поживних речовин. Унаслідок утворення великих об'ємів цих відходів та їх швидкого закисання ці методи неефективні. На сьогодні використовуються методи отримання комбікормів з післяспиртової барди її випарюванням, висушуванням та гранулюванням твердої фракції барди. Оскільки барда має високу вологість, одержання з неї комбікормів є нерентабельним. Аеробне очищення післяспиртової барди виправдовує себе лише за використання розділення твердої та рідкої фракцій, при подальшій переробці рідкої фракції. Також способом підвищення ефективності аеробного очищення є використання комплексу мезофільних і термофільних аеробних бактерій, що ускладнює процес її утилізації. На теперішній час досліджуються методи анаеробної переробки післяспиртової барди з одержанням біогазу. Проблемою є низьке значення рН, що інгібує процес метаногенезу. Тому дослідження в напрямі стабілізації рН і технології проведення процесу ферментації є актуальною задачею для переробки барди. За рахунок утворення енергоносія та перетворення відходу на високоякісне добриво (продукти анаеробного зброджування) цей метод є ефективним та економічно вигідним.

Ключові слова: післяспиртова барда; утилізація; переробка; фертигація; сушка; аеробне зброджування; кормові дріжджі; анаеробне зброджування; біогаз.

Вступ

Найбільшими виробниками етанолу в світі є США та Бразилія (перше та друге місця відповідно), Європа, Китай і Канада [1]. З розвитком спиртової промисловості, що спричинений широким застосуванням спирту як біопалива, виникла проблема утилізації відходів [1].

Найгостріше проблема стоїть з утилізацією основного відходу виробництва – післяспиртової барди (ПСБ), яка в натуральному вигляді не має попиту на ринку, оскільки не підлягає довготривалому зберіганню (розвиток гнилісних процесів), а також потребує значних витрат на доставку споживачу.

В Україні спиртові заводи, що входять до структури державного підприємства “Укрспирт”, на відміну від світових лідерів, з 2012 по 2015 рр. зменшили виробництво етилового спирту зі 182

до 110 тис. м³. Навіть за умови такого виробництва утворюються великі об'єми післяспиртової барди – 1,3–1,7 млн м³ [2, 3].

Попит на барду має сезонний характер, оскільки в сирому вигляді її використовують переважно як корм для свійської худоби, а в літній період року природної їжі для копитних тварин вистачає, тому барда накопичується в спеціальних сховищах і на полях фільтрації, що спричиняє забруднення атмосферного повітря та ґрунтів. Ще одним мінусом використання зернової сирої барди як корму для тварин є високі витрати на транспортування у результаті високого вмісту води (90–95 %) і великих відстаней між фермами та спиртовими заводами [4].

За рахунок великого виходу барди – 12–15 дм³ на 1 дм³ спирту – та високих показників забруднень (біохімічне споживання кисню – БСК 35–60 г/дм³, хімічне споживання кисню – ХСК

60–120г/дм³) без ефективного та коректного очищення скид ПСБ має значний негативний вплив на навколишнє середовище [5].

На початку ХХ ст. основним методом утилізації барди було очищення її на полях фільтрації, що суттєво погіршувало стан повітря внаслідок виділення неприємних запахів та утворення великої кількості СО₂, що на пряму пов'язано з проблемою парникового ефекту [6–8].

Технологія отримання етанолу типова, тому сировиною для виробництва харчового, технічного та паливного етанолу слугують різноманітні рослинні матеріали. Найбільш широко використовують крохмалевмісну сировину – зерно (жито, пшениця, кукурудза, ячмінь, овес, просо) та картоплю, також використовуються цукровмісні матеріали – меляса, дефектний цукровий буряк. Залежно від сировини характеристики та склад барди різняться [9].

Для зернової барди, крім високих концентрацій органічних забруднень, характерний специфічний запах, що свідчить про наявність сірковмісних сполук (індол, скатол). Також вона містить у своєму складі мінеральні речовини – фосфати, нітрати, сульфати, Са, К – і сполуки, що мають токсичну дію на різні мікроорганізми, деякі з них є ксенобіотиками [10, 11]. У барді було виявлено важкі метали, такі як Cr, Cu, Ni, Zn, що теж мають негативний вплив на навколишнє середовище [12, 13].

Зважаючи на сказане вище, на сьогодні актуальною проблемою є пошук раціональних технологій переробки барди.

Метою нашої роботи є:

- 1) проведення аналізу існуючих методів переробки зернової післяспиртової барди;
- 2) окреслення завдань, які необхідно вирішити для її ефективного утилізації;
- 3) визначення найбільш перспективних та ефективних методів переробки зернової післяспиртової барди.

Переробка й утилізація барди

Як зазначалося вище, вихід зернової барди становить 1200–1500 % від обсягу виробленого спирту. Її характеристики залежно від виду зернової культури наведено в табл. 1.

Такий склад післяспиртової барди дає змогу використовувати її в сільському господарстві для поливу (додаючи до чистої води), як корм для тварин, для отримання протеїну [14, 15].

На цей час відомі такі методи утилізації зернової барди, як добрива (фертигація) та корми для сільськогосподарських тварин і риб.

Переробку зернової ПСБ здійснюють такими способами:

- виробництво корисних у сільському господарстві продуктів: кормові дріжджі, біогумус, лаккази;
- фізико-хімічні: ультрафільтрація, зворотний осмос, отримання сухої барди за використання випарних станцій [16];
- біологічні методи: аеробне, анаеробне збродування.

Показано [15], що ПСБ за рахунок широкого спектра мінеральних і поживних речовин може бути використана як рідке добриво – фертигація. В дослідженні [17] було встановлено, що за концентрації сирової барди в розчині 33 % спостерігається найвищий приріст врожаю баштану. Для зернових сільськогосподарських культур концентрація барди для досягнення максимального виходу врожаю має бути нижчою – 20–30 % [17]. З ростом концентрації барди спостерігалась її токсична дія на рослини.

У низці досліджень використовувалась уже зброджена барда для поливу [18–20]. Показник БСК збродженої барди становить 500 мг/дм³, але під час її використання на полях спостерігається виділення неприємного запаху. Тому рекомендується розбавляти її в 5 разів [20]. Тут виникає проблема дозування ПСБ для поливу.

Сира барда має широкий спектр вітамінів: А, D, Е, вітаміни групи В, фолієва кислота (В₉), біотин (Н), каротиноїди; амінокислоти: лизин, метіонін, цистин, триптофан; макроелементи: кальцій, фосфор, азот; мікроелементи: залізо, цинк, манган, мідь; характеризується високою кормовою цінністю, тому її можна використовувати як корм для тварин у необробленому вигляді [14]. Але через її схильність до швидкого прокисання та утворення плісняви згодувати худобі її потрібно одразу після утворення [20]. Також унаслідок низького вмісту сухих речовин (5–10 %) ефективність використання ПСБ у сільському господарстві є невисокою. Тому для підвищення її кормової цінності використовують такі технологічні прийоми: підвищення концентрації сухих речовин у барді – приготування суслу з вмістом 19,0–20,0 % СР і повернення фільтрату барди на стадію приготування замісу. Але багаторазове використання фільтрату барди на стадії приготування замісів знижувало рН субстрату, в результаті чого відбувалась інактивація ферментів, що своєю чергою призводило до зниження виходу спирту та погіршення його якості [21, 22].

Барду можна використовувати як живильне середовище для вирощування кормових дріжджів.

Таблиця 1: Склад післяспиртової зернової барди (сирої) [9, 14]

Барда	pH	ХСК*, г O ₂ /дм ³	БСК**, г O ₂ /дм ³	Nзаг, г/дм ³	Pзаг, г/дм ³	Са, % від СР***	Лізин, % від СР	Цистин, % від СР	Метіонін, % від СР
Кукурудзяна	3,3–4	59	43	5,46	2,28	0,17	0,71	0,20	0,28
Ячмінна	3,7–4,1	97	83	6,00	8,00	0,24	0,49	0,15	0,26
Пшенична	4,6	50	26	1,50	1,70	0,18	0,83	0,33	0,43

*хімічне споживання кисню; **біохімічне споживання кисню; ***суха речовина.

Субстратом для дріжджів роду *Candida* та інших може бути як сира барда, так і її фільтрат [24]. Але оскільки такі виробництва не утилізують всієї барди, що утворюється в процесі одержання спирту [25], а під час культивування дріжджів утворюється культуральна рідина, яка теж потребує очищення, то проблема утилізації висококонцентрованих стічних вод не вирішується [20, 26].

Під час дослідження утилізації ПСБ з отриманням лаккази (ферменту, що застосовується в біотехнології, харчовій та пивоварній промисловості) встановлено, що за такої технології використовується малий об'єм цього відходу, і це також не вирішує екологічної проблеми спиртового виробництва. Більше того, оскільки для отримання лаккази ПСБ є лише харчовою добавкою до основного субстрату, то вона має бути попередньо анаеробно зброджена [27].

Для вермикомпостування зернової барди використовується лише її тверда фаза. Щоб підвищити якість компосту, до щільного осаду барди додають органічні добавки: гній, подрібнені залишки рослин [28].

Найпоширенішою технологією отримання сухої барди є схеми з випарними станціями та сушкою, в результаті утворюється високобілковий комбікорм, який отримують випарюванням, висушуванням та гранулюванням твердої фракції барди (DDGS – Dried Distillers Grains with Solubles) [24, 29]. Ці схеми характеризуються дороговиною та високими енерговитратами.

Перспективні результати отримані за переробки барди з допомогою ультрафільтрації та зворотного осмосу. Рідка фракція може використовуватися як замітник технологічної води в процесі виробництва етанолу, тверда – як корм у необробленій або сушеній формі. Головними недоліками цих методів є: високі інвестиційні та експлуатаційні витрати (наприклад, швидке забруднення мембран, що тягне за собою значні й постійні витрати на їх заміну), низька продуктивність, додаткові витрати енергії на підсушування твердої фракції – кеку [20, 30].

Біологічні методи переробки зернової ПСБ. Біологічні методи переробки зернової ПСБ наведено на рисунку.

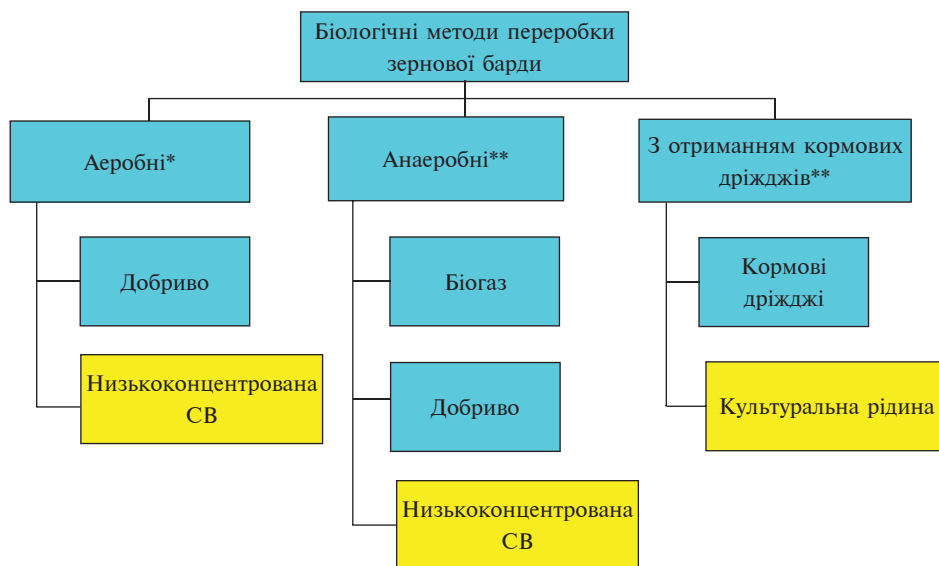


Рисунок: Біологічні методи переробки зернової ПСБ: ■ – відходи, що потребують переробки; ■ – продукти, що можуть бути використані в агропромисловому секторі, СВ – стічна вода, * – фугат барди, ** – як фугат, так і сира барда

Було досліджено низку анаеробних і аеробних процесів для очищення висококонцентрованих стоків, що являє собою зернова барда спиртових заводів. Оскільки типовим є співвідношення ХСК/БСК = 1,8–1,9, то це свідчить про придатність післяспиртової барди до біологічного очищення [16].

Аеробні технології. Аеробна технологія переробки барди вперше згадується в 1965 р. Р. Смітом [31]. Як субстрат використовували рідку фракцію кукурудзяної барди з рН 3,8–4,5. Як інокулянт використовували посівний матеріал з ґрунту після інкубування його з бардою протягом одного тижня на зворотному шейкері за кімнатної температури та значення рН 7,2. Досліджували вплив концентрації інокулянту та значення рН на зниження хімічного споживання кисню (ХСК) та завислих речовин (ЗР). Оптимальним виявилось співвідношення інокулянт:субстрат = 1:9, значення рН – 7,1–7,8, за яких відбувалося зниження ХСК на 60,7 %, ЗР – на 45,0 % (за вихідних концентрацій 57,6 г $O_2/дм^3$, 39 г/дм³ відповідно). У дослідженні процесу зниження ХСК і ЗР у проточному режимі аеробного очищення було виявлено, що на виході реактора ці показники залишаються досить високими. Також було досліджено можливість очищення барди на аеробному фільтрі, але такий метод є непридатним для розробки технології, оскільки вже на 5-ту добу відбувається обростання загрузки реактора через значний приріст біомаси. Зниження ХСК – 50 % [31].

У дослідженнях [31, 32] рекомендовано здійснювати аеробне зброджування рідкої фракції барди після відділення твердої фракції. Це спричинено високими значеннями забруднень (ХСК, ЗР) сирової барди.

У дослідженні [33] проводили аеробне зброджування пшеничної барди – як її фільтрату, так і сирової – з використанням мезо- і термофільних бактерій роду *Vacillus*. Зброджування здійснювали за постійного рН 6,5 і температури 45 °С. В обох випадках рН корегували додаванням розчинів H_2SO_4 і $NaOH$ у концентрації 2 моль/дм³. Результати показали, що за використання цих бактерій відділення твердої фракції барди є зайвим, оскільки це мало незначний вплив на зниження ХСК – ступінь видалення ХСК становив 88,25 % для сирової барди і 92,85 % для фільтрату.

Отже, в процесі досліджень було встановлено, що для таких висококонцентрованих відходів, як післяспиртова зернова барда, аеробне очищення без розділення фаз ефективніше у разі вико-

ристання комплексу мезофільних і термофільних аеробних бактерій. Але за таких умов виникає проблема контролю температури, що коливається в широких межах протягом усього процесу і потребує додаткових енергетичних витрат [34, 35].

Аеробне очищення відходів з високим вмістом органічної речовини, таких як післяспиртова барда, спричиняє такі процеси:

- спухання активного мулу;
- нездатність системи до зниження високого БСК або ХСК, що потребує високовартісних комплексних рішень;
- високий рівень приросту біомаси;
- висока експлуатаційна та енергетична вартість [36].

У разі аеробної біодеградації органічних речовин післяспиртової барди відсутнє утворення біогазу – джерела електричної та теплової енергії, що є важливим фактором підвищення енергоефективності процесу [37, 37].

Крім того, співвідношення БСК:N:P = 100:2,4:0,3 свідчить про те, що анаеробні методи очищення, особливо на перших стадіях, будуть більш ефективними, ніж аеробні [39].

Аналіз світового досвіду свідчить, що зернова післяспиртова барда має найбільші перспективи як сировина для отримання білоквмісної кормової добавки та біогазу. Обидва продукти користуються попитом на ринку і здатні забезпечити рентабельність мікробіологічної переробки післяспиртової барди [30].

Анаеробні технології. Єдиним варіантом очищення сирової післяспиртової барди до 1980-х рр. було очищення на полях фільтрації. На цей час у багатьох країнах світу майже всі виробники спиртової галузі здійснюють переробку зернової післяспиртової барди з використанням анаеробного зброджування (в основному її фільтрату) – метаногенезу з отриманням енергоносія – метану [9, 40–42].

Анаеробний метод переробки післяспиртової барди є загальноприйнятою практикою і здійснюється в різних за конструкцією реакторах: біореактор з іммобілізованою плівкою, UASB-реактор, реактор із псевдозрідженим шаром (AFB-реактор), анаеробний реактор періодичної дії; також використовуються різні анаеробні системи: одно- та двофазова анаеробна очистка, ставковий спосіб фільтрації, звичайні анаеробні системи (анаеробний реактор із безперервним перемішуванням – метантенк) [43–48].

У ході вивчення анаеробного зброджування нативної барди було встановлено, що до її складу входять речовини, які не піддаються розкладу

в процесі обробки анаеробним мулом (наприклад, феноли) і можуть бути причиною низького виходу метану та дестабілізації процесу, тому необхідно проводити попередню обробку барди. Для видалення стійких сполук із промислових стічних вод використовують фотоокиснення, хімічну коагуляцію, осадження, фільтрацію, знезараження, адсорбцію, попередню ферментацію тощо [49, 50].

У [49] методом попередньої обробки барди було озонування, в процесі якого сполуки, що важко піддаються розкладу, перетворюються на більш прості молекули з нижчою молекулярною масою, які легко використовуються як поживні речовини анаеробними популяціями [49, 51, 52]. Визначено, що вихід метану із сирої барди становить $0,25 \text{ дм}^3 \text{ CH}_4/\text{г ХСК}$, а з попередньо озонованої – $0,284 \text{ дм}^3 \text{ CH}_4/\text{г ХСК}$ [49]. Основними недоліками цього методу є необхідність використання складного і дорогавартісного обладнання та потреба в додаткових витратах енергії.

У табл. 2 наведено вихід метану залежно від параметрів ферментації ПСБ.

У дослідженні складу післяспиртової барди показано, що суха речовина барди на 50–56 % представлена ЗР, що містять переважно протеїн і клітковину, які уповільнюють процес анаеробного розкладу [53]. Прискорити розклад можливо преацидифікуванням, що являє собою витримання барди протягом декількох діб для забезпечення спонтанного розвитку кислотогенних мікроорганізмів [30].

Подальше зброджування в дослідженні [56] проводили після розділення твердої та рідкої фаз барди: фугат зброджували в анаеробних умовах у проточному UASB-реакторі за температури $50 \text{ }^\circ\text{C}$, значення рН становило 6,5–7,2 (вихід біогазу після 4,5 місяців експлуатації лабораторної установки $9 \text{ м}^3/\text{м}^3$ фугату, вміст CH_4 у біогазі – 59 %, після 6 місяців – $14,6 \text{ м}^3/\text{м}^3$ фугату, вміст CH_4 у біогазі – 65 %), кек висушували на роторно-дисковій сушарці з отриманням кормового продукту [56].

Суттєвими недоліками цього методу є: громіздкість технологічної схеми, складність експлуатації, необхідність доочистки зброженого фугату, великі додаткові енерго-, тепло- та ресурсовитрати на фракційне розділення барди й отримання сухого кормового продукту.

У дослідженні [40] зброджування зернової післяспиртової барди проводили в мезофільному режимі. Для нейтралізації рН нативної барди використовували частину зброженої. Оскільки зброжена барда характеризується дефіцитом фосфору, то для підвищення ефективності анаеробного процесу в середовище вводили необхідну кількість суперфосфату. Було отримано такі результати: видалення ХСК за початкового значення $94\text{--}112 \text{ г O}_2/\text{дм}^3$ на анаеробному етапі переробки барди – 52,13–53,95 %, БСК – 69,36–71,37 %, летких жирних кислот – 3,5–5,0 %. Склад отриманого біогазу: 47,0–48,1 % CO_2 , 1,9–2,0 H_2S , 50,0–51,0 % CH_4 . У зброженій барді виявили високу концентрацію сульфідів, тобто має місце конверсія сульфатів у сульфідів в процесі зброджування, що свідчить про високу активність сульфатредуючих бактерій, які знижують активність метаногенів, результатом чого є низький вміст метану в біогазі.

Ще одним способом утилізації зернової післяспиртової барди є її зброджування з відпрацьованим активним мулом (АМ) біологічної станції очистки стічної води спиртзаводу [57]. Було визначено, що оптимальне співвідношення барда:АМ – 15:85 % за об'ємом. У дослідженні [55] використовували барду з анаеробним АМ із очисних споруд міста. Процес проводили за температури $48 \text{ }^\circ\text{C}$, рН 7 підтримували додаванням NaHCO_3 . Вихід біогазу становив $10,84 \text{ м}^3/\text{м}^3$ барди.

Для обох випадків характерна проблема підтримання оптимальних значень рН і температури, що значно впливає на швидкість перебігу процесу та рівень виходу біогазу.

Останні публікації показують, що одним із перспективних методів анаеробного зброджування

Таблиця 2: Вихід біогазу залежності від умов анаеробного зброджування та виду барди [53–55]

Вид барди	Тип реактора	ХСК _{вих} , г $\text{O}_2/\text{дм}^3$	ЧГУ***, діб	Навантаження за ХСК, г ХСК/дм ³ за добу	t, °C	Ефективність видалення ХСК, %	Вихід біогазу, дм ³ /г ХСК	Посилання
Кукурудзяна*	CRST	50,8	30	9,05	33±2	83	0,26	[53]
Ячмінна**	UFB	21,4	0,18	115	54±1	78	0,27	[54]
Пшенична*	CRST	91	9,25	11,6	44±1	90	0,23	[55]

*сира барда; **фільтрат; ***час гідралічного утримання.

барди є її зброджування з відходами тваринницьких комплексів і птахоферм [58–61]. Так, у роботі [58] коров'ячий гній використовували як посівний матеріал. Процес проводили за температури 35 °С, рН субстрату підтримували на рівні 6,8–7,4 поступовим додаванням розчину CaCO₃ перед загрузкою до реактора, співвідношення БСК:N:P підтримували на рівні 100:2,5:0,5 додаванням діамонію фосфату та сечовини, що є ефективним для анаеробного зброджування. Максимальне спостережуване видалення БСК становило 93 %.

У дослідженні [62] проводили сумісне зброджування барди та коров'ячого гною. Температура процесу – 35 °С, рН підтримували на рівні 7,02–7,04, співвідношення гній:барда – 7:1. Максимальне видалення ХСК – 79,72 % – спостерігали на 30-й день, максимальний вихід біогазу спостерігали на 88-й день.

У процесах коферментації з коров'ячим гноєм відбувається більш повна переробка ПСБ, ніж під час анаеробного зброджування сирі барди чи барди, інокульованої активним мулом очисних споруд у реакторі постійного перемішування. Але тут також існує проблема закисання субстрату на початкових стадіях процесу, низький вихід біогазу та низький вміст у ньому метану через невідповідність співвідношення C:N = 30:1. Також використовуються неорганічні сполуки для підтримання значення рН, що призводить до забруднення води неорганічними речовинами.

Нами пропонується [63] сумісне зброджування барди з пташиним послідом. За рахунок того, що птахи погано засвоюють енергію рослинних кормів і більша її частина переходить у послід, останній є перспективним субстратом для використання як відновлюваного джерела енергії у виробництві біогазу, тобто під час анаеробного зброджування [64, 65].

Послід має значення рН більше 6,5, тому може бути використаний як косубстрат, який не тільки нейтралізує кислоту в реакторі, а й дає необхідні елементи живлення для розвитку асоціації мікроорганізмів. При цьому досягається необхідне співвідношення C:N (30:1).

Процес поводи́ли в мезофільному режимі – $t = 40 \pm 2$ °С. За рахунок введення посліду рівень рН у середовищі реактора становив $7 \pm 0,5$. Розведення косубстратів до вологості 90 % проводили виробничою стічною водою. Встановлено, що найпродуктивнішим для одержання біогазу співвідношенням за сухою речовиною стічна вода:ПСБ:послід було 0,2:1:7, вихід біогазу становив 265 см³/г сухої органічної речовини (СОР) із вмістом метану 72 ± 2 % [63].

Виходячи з наведеного вище, можна стверджувати, що актуальними задачами подальших досліджень у цьому напрямі для створення ефективної технології переробки післяспиртової барди є розробка технологічних рішень стабілізації рН без додавання неорганічних речовин, проведення процесу метаногенезу для отримання біогазу з високим виходом метану та підвищення швидкості утилізації ПСБ.

Висновки

На фоні проблем забруднення навколишнього середовища та розвитку безвідходних технологій спиртова промисловість є об'єктом агропромислового комплексу, що утворює великий об'єм відходів. Сьогодні відомі багато методів переробки основного відходу спиртового виробництва – післяспиртової барди, але аналізуючи існуючі технології, можна зробити такі висновки.

За рахунок утворення великого об'єму ПСБ (12–15 дм³ на 1 дм³ спирту) прості методи її утилізації, такі як очищення на полях фільтрації, використання як корму для ВРХ у сирому вигляді, фертигація, не вирішують проблеми в повному обсязі.

Оскільки барда має досить високу вологість (90–95 %), то використання фізико-хімічних методів, а саме сушіння з отриманням сухого корму DDGS, потребує дороговартісного обладнання та великих енерговитрат. Вирощування кормової біомаси дріжджів, методи аеробного й анаеробного зброджування теж мають низку недоліків (утворення культуральної рідини, спухання активного мулу, нездатність системи до зниження високого БСК або ХСК, що потребує високовартісних комплексних рішень тощо).

Вирощування кормової біомаси дріжджів на ПСБ потребує встановлення додаткових споруд для очищення культуральної рідини. Для ефективної утилізації ПСБ методом анаеробного зброджування необхідно проводити її попередню обробку (розділення рідкої та твердої фаз, озонування тощо), забезпечувати введення додаткових речовин для стабілізації рН та елементів живлення, що підвищує вартість процесу.

Показано, що перспективним методом утилізації ПСБ є анаеробне зброджування. Використання коферментації сирі барди з пташиним послідом дає змогу: збалансувати елементи живлення, привести значення рН до необхідних для процесу метаногенезу, досягти потрібного співвідношення C:N. За умов коферментації досягається вихід біогазу 265 см³/г СОР із вмістом метану 72 ± 2 %.

Далі ми плануємо розробку математичної моделі для управління технологічним процесом одержання біогазу з післяспиртової зернової барди залежно від умов середовища та співвідношення ПСБ:послід.

References

- [1] Afdc.energy.gov. Alternative Fuels Data Center: Maps and Data - Global Ethanol Production [Internet]. Afdc.energy.gov; 2012 [updated 2016 March, cited 2018 February 3]. Available from: <https://www.afdc.energy.gov/data/10331>
- [2] "Ukrspirit" in 2014 reduced the production of alcohol by 20% [Internet]. Informational Agency Interfax-Ukraine [updated 2015 Jan 22; cited 2017 Oct 12]. Available from: <http://interfax.com.ua/news/economic/246107.html>
- [3] Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine [Internet]. Ukrspirit – a tender offer Bleskun S.V.; 2015 Dec [cited 2017 Jun 6]. Available from: <http://minagro.gov.ua/system/files/%D0%91%D0%BB%D0%B5%D1%81%D0%BA%D1%83%D0%BD%20%D0%A1%D0%B5%D1%80%D0%B3%D1%96%D0%B9%20%D0%92%D0%B0%D0%BB%D0%B5%D1%80%D1%96%D0%B9%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%87.pdf>
- [4] Kuznetsov IN, Ruchaj NS. Obtaining protein-containing fodder additive for complex processing of distillery spent wash. *Agriculture – Problems and Perspectives*. 2012;18:156-65.
- [5] Moraes B, Zaiat M, Bonomi A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renew Sustain Energy Rev*. 2015;44:888-903. DOI: 10.1016/j.rser.2015.01.023
- [6] Kumar V, Wati L, Fitz Gibbon F, Nigan P. Bioremediation and decolorization of anaerobically digested distillery spentwash. *Biotech Lett*. 1997;19:311-3.
- [7] Kumar S, Sahay SS, Sinha MK. Bioassay of distillery effluent on Common Guppy, *Lebistes reticulatus* (Peter). *Bull Environ Contam Toxicol*. 1995;54:309-16. DOI: 10.1007/BF00197446
- [8] Galdos M, Cavalett O, Seabra J, Nogueira L, Bonomi A. Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions. *Appl Energy*. 2013;104:576-82. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.11.002
- [9] Wilkie A, Riedesel K, Owens J. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*. 2000;19(2):63-102. DOI: 10.1016/S0961-9534(00)00017-9
- [10] Pandey R, Malhotra S, Tankhiwale A, Pande S, Pathe P, Kaul S. Treatment of biologically treated distillery effluent - A case study. *Int J Environ Studies*. 2003;60(3):263-75. DOI: 10.1080/00207230290024270
- [11] Sharma S, Sharma A, Singh P, Soni P, Sharma S, Sharma P, et al. Impact of distillery soil leachate on haematology of swiss albino mice (*Mus musculus*). *Bull Environ Contam Toxicol*. 2007;79(3):273-7. DOI: 10.1007/s00128-007-9225-4
- [12] Strickland RC, Griffith RL, Beck MJ, Watson JR. Conversion of hardwoods to ethanol: The Tennessee Valley Authority approach. In: *Energy from Biomass and Wastes XI*. Chicago, IL: Institute of Gas Technology; 1988. p. 981-96.
- [13] Eremektar G, Tunay O, Orhon D, Gonenc E. The pollution profile of alcohol distilleries treating beet sugar molasses. *Water Sci Technol*. 1995;32(12):181-8.
- [14] Khyzhnyak MI, Ts'on' NI. Distillery spent wash as a valuable feed additive and organic fertilizer in agriculture. *Fisheries Science of Ukraine*. 2010;2:122-30.
- [15] Hillel D, Hatfield JL, Powlson DS, Rosenzweig C, Scow KM, Singer MJ, et al. *Encyclopedia of soils in the environment* (4 volumes). Amsterdam: Hardbound: Elsevier Academic Press; 2005. 2119 p.
- [16] Krzywonos M, Cibis E, Miśkiewicz T, Ryznar-Luty A. Utilization and biodegradation of starch stillage (distillery wastewater). *Electron J Biotechnol*. 2009;12(1):1-9. DOI: 10.2225/vol12-issue1-fulltext-5
- [17] Chidankumar CS, Chandraju S, Nagendraswamy R. Impact of distillery spentwash irrigation on the yields of top vegetables (creepers). *World Appl Sci J*. 2009;6(9):1270-73.
- [18] Ramanand NJ, Dhananjay BS, Sachin DN, Vasimshah AK, Sanjay BA. Impact of distillery spent wash irrigation on agricultural soil. In: Stake K, Lin GF, Park N, editors. *Advances in Geosciences*. Vol. 23. Hydrological Sciences. Singapore: World Scientific Publishing Company; 2010. P. 341-54.
- [19] Rajesh K, Verma C. Utilization of distillery waste water in fertigation: A beneficial use. *Int J Res Chem Environ*. 2014 Oct;4:1-9.
- [20] Parivesh B, East AN. *Management of distillery wastewater*. Delhi: M/s. Vinayak Press; 2001. 20 p.
- [21] Marinchenko VO, Karputina MV, Icaienko VM. Influence of technological methods on the efficiency of waste application of alcohol production. *Food Industry*. 2003;2:11-2.
- [22] Polygalina GV. *Technochemical control of alcohol and alcoholic beverages production*. Mocsow: Kolos; 1999. 336 p.
- [23] Carioca JOB, Arora HL, Khan AS. Technological and socio-economic aspects of cassava based autonomous minidistilleries in Brazil. *Biomass*. 1981 Oct;1(2):99-114. DOI: 10.1016/0144-4565(81)90019-6
- [24] Androsov AL, Elizarov IA, Tretyakov AA. Industrial technologies of distillery spent wash processing. *Herald TSTU*. 2010;16(4):954-63.

- [25] Rimaryeva L, Lozanskaya T, Khudyakova N. Fodder yeasts on the basis of distillery spent wash. *Compound Feeds*. 2013;7:41-2.
- [26] Sheehan GJ, Greenfield PF. Utilisation, treatment and disposal of distillery wastewater. *Water Res.* 1980;14:257-77.
- [27] Singh A, Bajar S, Bishnoi N, Singh N. Laccase production by *Aspergillus heteromorphus* using distillery spent wash and lignocellulosic biomass. *J Hazardous Mater.* 2010;176(1-3):1079-82. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.120
- [28] Kuznetsov EV, Shchekoldin YaA. Method for utilization of distillery spent wash for agricultural purposes and a system for its implementation [Internet]. *Freepatent.ru*. 2009 [cited 6 June 2017]. Available from: <http://www.freepatent.ru/patents/2371426>
- [29] Thakur IS. *Industrial biotechnology: Problems and remedies*. New Delhi: IK International Publishing House; 2006. 336 p.
- [30] Kuznetsov IN, Ruchaj NS. Analysis of world experience in the technology of processing distillery spent wash. *Proceedings of the BSTU. Ser. 4. Chemistry and Technology of Organic Substances and Biotechnology*. 2010;1(4):294-301.
- [31] Smith RE, Fargey TR. Studies on the biological stabilization of thin stillage. I. Aerobic fermentation. *Canadian J Microbiol.* 1965;11:561-71. DOI: 10.1139/m65-073
- [32] Bezuneh T. The role of microorganisms in distillery wastewater treatment: A review. *J Bioremed Biodegrad.* 2016;07(06). DOI: 10.4172/2155-6199.1000375.
- [33] Krzywonos M, Cibis E, Ryznar-Luty A, Miśkiewicz T, Borowiak D. Aerobic biodegradation of wheat stillage (distillery wastewater) at an elevated temperature – Effect of solids separation. *Biochem Eng J.* 2010;49(1):1-6. DOI: 10.1016/j.bej.2009.11.003
- [34] Krzywonos M, Cibis E, Miśkiewicz T, Kent C. Effect of temperature on the efficiency of the thermo- and mesophilic aerobic batch biodegradation of high-strength distillery wastewater (potato stillage). *Biores Technol.* 2008;99(16):7816-24. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.01.063
- [35] Lutosławski K., Ryznar-Luty A., Cibis E, Krzywonos M, Miskiewicz T. Biodegradation of beet molasses vinasse by a mixed culture of micro organisms: Effect of aeration conditions and pH control. *J Environ Sci.* 2011;23(11):1823-30. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60579-7
- [36] Jiménez A, Borja R, Martín A. Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. *Process Biochem.* 2003;38(9):1275-84. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00325-4
- [37] Brik MT, Golubev VN, Chagarovskii AP. *Membrane technology in the food industry*. Kyiv: Urozhaj; 1991. 224 p.
- [38] Gelfand ED. The production of biogas is a promising direction for the utilization of the distillery spent wash. *Manufacture of Alcohol Liqueur & Vodka Products*. 2012; 4:24-25.
- [39] Lata K, Kansal A, Balakrishnan M, Rajeshwari K, Kishore V. Assessment of biomethanation potential of selected industrial organic effluents in India. *Resour Conserv Recycl.* 2002;35(3):147-61. DOI: 10.1016/S0921-3449(01)00112-4
- [40] Pathe P, Rao N, Kharwade M, Lakhe S, Kaul S. Performance evaluation of a full scale effluent treatment plant for distillery spent wash. *Int J Environ Stud.* 2002;59(4):415-438. DOI: 10.1080/00207230212743
- [41] Sheehan G, Greenfield P. Utilisation, treatment and disposal of distillery wastewater. *Water Res.* 1980;14(3):257-77. DOI: 10.1016/0043-1354(80)90097-4.
- [42] Koshel M, Dudnik A, Karanov Yu, Liptus V, Dobrylovsky B. Disposal of distillery spent wash and wastewater treatment with protein feed and biogas. *Propozutsiya* [Internet]. 2002 [cited 10 May 2018];11:19. Available from: <http://propozitsiya.com/ua/utilizaciya-pislyaspirtovoyi-bardi-i-ochishchennya-stokiv-z-oderzhannyam-bilkovogo-kormu-y-biogazu>
- [43] Rana R, Singh P, Kandari V, Singh R, Dobhal R, Gupta S. A review on characterization and bioremediation of pharmaceutical industries' wastewater: an Indian perspective. *Appl Water Sci.* 2014;7(1):1-12. DOI: 10.1007/s13201-014-0225-3
- [44] Gujer W, Zehnder AJB. Review paper-anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors. *Water Sci Technol.* 1983;15:1-120. DOI: 10.2166/wst.1983.0161
- [45] Mohana S, Acharya B, Madamwar D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *J Hazard Mater.* 2009;163(1):12-25. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.079
- [46] Lalov IG, Krysteva MA, Phelouzat JL. Improvement of biogas production from vinasse via covalently immobilized methanogens. *Biores Technol.* 2001;79:83-5.
- [47] Pérez-García M, Romero-García LI, Rodríguez-Cano R, Sales-Márquez D. Effect of the pH influent conditions in fixed film reactors for anaerobic thermophilic treatment of wine-distillery wastewater. *Water Sci Technol.* 2005; 51: 183-9.
- [48] Van Lier JB, Tilche A, Ahring BK. New perspectives in anaerobic digestion. *Water Sci Technol.* 2001; 43: 1-18.
- [49] Siles J, García-García I, Martín A, Martín M. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. *J Hazard Mater.* 2011;188(1-3):247-53. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.096
- [50] Lafi W, Al-Qodah Z. Combined advanced oxidation and biological treatment processes for the removal of pesticides from aqueous solutions. *J Hazard Mater.* 2006;137(1):489-97. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.02.027
- [51] Malato S, Blanco J, Fernández-Alba A, Agüera A. Solar photocatalytic mineralization of commercial pesticides: Acrinathrin. *Chemosphere.* 2000;40(4):403-9. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00267-2
- [52] Martín M, Raposo F, Borja R, Martín A. Kinetic study of the anaerobic digestion of vinasse pretreated with ozone, ozone plus ultraviolet light, and ozone plus ultraviolet light in the presence of titanium dioxide. *Process Biochem.* 2002;37(7):699-706. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00260-6.

- [53] Eskicioglu C, Kennedy K, Marin J, Strehler B. Anaerobic digestion of whole stillage from dry-grind corn ethanol plant under mesophilic and thermophilic conditions. *Biores Technol.* 2011;102(2):1079-86. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.08.061
- [54] Kida K, Sonoda Y. Influence of mineral nutrients on high performance during anaerobic treatment of distillery wastewater from barley-shochu making. *J Ferment Bioeng.* 1993;75(3):235-7. DOI: 10.1016/0922-338X(93)90125-R
- [55] Hutnan M, Hornak M, Bodik I, Hlavacka V. Anaerobic treatment of wheat stillage. *Chem Biochem Eng Q.* 2003;17(3):233-41.
- [56] Kuznetsov IN, Ruchaj NS, Lembovich AI. Change in the composition of the distillery spent wash in anaerobic and enzymatic treatment. *Proc BSTU. Ser 4: Chemistry and Technology of Organic Substances and Biotechnology.* 2011;19:289-95.
- [57] Dyganova RYa, Belyaeva RYa. Experimental determination of the optimal composition of a complex substrate for anaerobic digestion in the alcohol industry. *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.* 2014;16(6):1737-40.
- [58] Venkatasamy G, Aruna S. Treatment of distillery spent wash in upflow anaerobic contact filter. *Indian J Appl Res.* 2013;3(7):199-200.
- [59] Deshmukh HV. Economic feasibility and pollution abatement study of biogas production process utilizing admixture of ipomoea carnea and distillery waste. *J Environ Res Develop.* 2012;7(2):633-42.
- [60] Shukla Bhalerao VP, Tejomyee S. Comparative study of biogas production from different food wastes. *J Environ Res Develop.* 2010;4(4):958-63.
- [61] Babel S, Sae-Tang J, Pechoraply A. Anaerobic co-digestion of sewage and brewery sludge for biogas production and land applications. *Int J Environ Sci Tech.* 2009;6(1):131-40. DOI: 10.1007/BF03326067
- [62] Mise SR, Saranadgoudar R, Lamkhade R. Treatment of distillery spent wash by anaerobic digestion process. *Int J Res Eng Technol.* 2013;11:310-3.
- [63] Golub NB, Potapova MV. Ratio of cosubstrates influence on the output of biogas upon utilization of distillery spent wash. *Vidnovluvana Energetika.* 2017;2:90-7.
- [64] Stepanov DV, Tkachenko CJ, Ranskij AP. Assessment of the possibility of obtaining energy from organic waste taking into account the technogenic loading on the environment. *Scientific Works of VNTU.* 2012;1:1-7.
- [65] Kuris YuV, Tkachenko SI, Semenenko NV. Ways of biogas utilizing. *Energoberezhenie. Energetika. Energoaudit.* 2010;7:20-30.

Н.Б. Голуб, М.В. Потапова

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ И УТИЛИЗАЦИИ ЗЕРНОВОЙ ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЫ

Во всем мире спиртовая промышленность столкнулась с проблемой накопления отхода производства спирта – послеспиртовой барды. За счет высоких показателей химического и биохимического потребления кислорода, взвешенных веществ, специфического цвета и запаха, низкого значения pH очистка таких отходов на полях фильтрации или их сброс в водоемы невозможны. Целью нашей работы является: (1) проведение анализа существующих методов переработки зерновой послеспиртовой барды; (2) определение задач, которые необходимо решить для ее эффективной утилизации; (3) определение наиболее перспективных и эффективных методов переработки зерновой послеспиртовой барды. Установлено, что существующими методами ее переработки являются биологические, физико-химические, а также использование в сельском хозяйстве как нативной барды, так и продуктов ее переработки. К простейшим методам утилизации зерновой послеспиртовой барды относится ее использование для кормления крупного рогатого скота или фертигация, поскольку в барде присутствует широкий спектр минеральных и питательных веществ. За счет образования больших объемов этих отходов и их быстрого закисания данные методы неэффективны. На сегодня используются методы получения комбикормов из послеспиртовой барды путем ее выпаривания, высушивания и гранулирования твердой фракции барды. Поскольку барда имеет высокую влажность, то получение из нее комбикормов является нерентабельным. Аэробная очистка послеспиртовой барды оправдывает себя только при использовании разделения твердой и жидкой фракций, при последующей переработке жидкой фракции. Также способом повышения эффективности аэробной очистки является использование комплекса мезофильных и термофильных аэробных бактерий, что затрудняет процесс ее утилизации. В настоящее время исследуются методы анаэробной переработки послеспиртовой барды с получением биогаза. Проблемой является низкое значение pH, которое ингибирует процесс метаногенеза. Поэтому исследования в направлении стабилизации pH и технологии проведения процесса ферментации являются актуальной задачей переработки барды. За счет образования энергоносителя и переобразования отхода в высококачественное удобрение (продукты анаэробного сбраживания) данный метод является эффективным и экономически выгодным.

Ключевые слова: послеспиртовая барда; утилизация; переработка; фертигация; сушка; аэробное сбраживание; кормовые дрожжи; анаэробное сбраживание; биогаз.

N.B. Golub, M.V. Potapova

MODERN METHODS OF PROCESSING AND UTILIZATION OF GRAIN DISTILLERY SPENT WASH

Across the world, the alcohol industry has faced the problem of accumulation of waste alcohol production distillery spent wash. Due to high chemical and biochemical oxygen demand, suspended solids, specific color and odor, low pH, disposal of such waste in the filtration fields or discharge into the reservoir is impossible. The purpose of this article is: (1) analysis of existing methods for processing grain distillery spent wash; (2) definition of tasks that need to be solved for its effective utilization; (3) determination of the most promising and effective methods for processing the grain distillery spent wash. It is established that the existing methods of its processing are biological and physico-chemical and the use in agriculture of both raw distillery spent wash and products of its processing. The simplest methods of utilization of the grain distillery spent wash are its use for feeding cattle or fertigation, since a wide range of mineral and nutrient substances is present in the distillery spent wash. Due to the formation of large volumes of these wastes and their rapid souring, these

methods are ineffective. Today, methods are used for obtaining mixed fodders from distillery spent wash by evaporating, drying and granulating the solid fraction of the spent wash. Since the distillery spent wash has a high humidity, the production of mixed fodder from it is unprofitable. Aerobic treatment of the distillery spent wash justifies itself only when using the separation of solid and liquid fractions, during the subsequent processing of the liquid fraction. Another way to increase the effectiveness of aerobic treatment is to use a complex of mesophilic and thermophilic aerobic bacteria, which complicates the process of distillery spent wash utilization. At present time, the methods of anaerobic digestion of the distillery spent wash with the production of biogas are being investigated. The problem is a low pH, which inhibits the process of methanogenesis. Therefore, research in the direction of pH stabilization and the technology of conducting the fermentation process is an urgent task of processing distillery spent wash. Due to the formation of an energy carrier and the waste transformation into high-quality fertilizer (anaerobic digestion products), this method is effective and economically viable.

Keywords: distillery spent wash; utilization; processing; fertigation; drying; aerobic digestion; fodder yeast; anaerobic digestion; biogas.

ДЕЯКІ ВАЖЛИВІ ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РЯДУ МІНЕРАЛЬНИХ ВОД, ЯКІ ШИРОКО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ В ПОБУТІ

Ю.Ю. Петруша¹, О.Ф. Рильський^{1*}, П.І. Гвоздяк²

¹Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна

²Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАНУ, Київ, Україна

*Corresponding author: rylsky@ukr.net

Received 5 March 2018; Accepted 11 May 2018

Проблематика. Якість води є одним із найважливіших факторів, що мають визначальний вплив на організм людини.

Мета. Дослідження низки фізико-хімічних важливих показників мінеральної води, які визначають її вплив на організм людини.

Методика реалізації. Вивчали основні критерії, що стосуються якості питної води: рН, окисно-відновний потенціал (ОВП), загальну твердість, загальне мікробне число. Також важливе значення має показник загальної токсичності води, який визначається методом біотестування та надає об'єктивну оцінку впливу досліджуваного зразка на організми.

Результати. Отримані результати свідчать, що рН досліджуваної води знаходиться в межах, встановлених існуючими нормативами для питної води. Всі зразки мають слабколужну реакцію рН (7,1–8,39). Загальна твердість води знаходиться в межах 1,5–7 ммоль.екв/дм³ та відповідає даним виробника і встановленим існуючим нормативам. Винятком є вода марки “Smarty Family”, жорсткість якої трохи нижча показника, зазначеного на етикетці. Всі вивчені проби дитячої мінеральної води мали значення показників схожості та енергії проростання, вищі за контроль (дистильована вода). Це вказує на відсутність загальної токсичності та на збалансованість вмісту солей у досліджуваному зразку. Значення цих показників у зразках мінеральної природної столової та мінеральної природної лікувально-столової води нижчі, ніж у контролі. Виняток становить вода “Миргородська лагідна”, показники якої майже не відрізняються від контролю. Що стосується показника ОВП, жодна марка води не відповідає величинам ОВП біологічних рідин організму людини, зокрема й дитини. Більшість зразків мінеральних природних столових і мінеральних лікувально-столових вод (за винятком води марок “Поляна квасова” та “Боржомі”) мають підвищений вміст мікроорганізмів та не відповідають встановленим нормативам для фасованої води.

Висновки. Досліджувані мінеральні природні столові та мінеральні природні лікувально-столові води можуть вживатись за призначенням, але за мікробіологічним показником та ОВП потребують подальшого контролю.

Ключові слова: вода; окисно-відновний потенціал; загальна твердість; рН; мікробне число.

Вступ

Добре відомо, що вода є розчинником і транспортером продуктів обміну, поживних, біологічно активних та інших речовин у клітинах живих істот, а для багатьох організмів – ще й середовищем існування. Всі біохімічні процеси будь-яких організмів – рослин, тварин, мікроорганізмів – відбуваються за участю води, що виступає як субстратом, так і метаболітом [1].

Забезпечення населення якісною питною водою є однією з нагальних проблем. За офіційними даними, у світі 80 % хвороб населення пов'язується із вживанням недоброякісної питної води [2, 3]. Вода як універсальний розчинник здатна розчинити різноманітні речови-

ни, кисень, мінерали, з якими вона контактує, накопичувати поряд із корисними небажані або надлишкові для організму людини концентрації розчинених речовин органічного походження, іонів важких металів тощо. Це стає особливо актуальним із посиленням техногенного забруднення довкілля.

Тому для нормального функціонування організму необхідно постійно поповнювати воду, що виділяється. В процесі життєдіяльності організм людини втрачає багато солей та мікроелементів, і саме мінеральні води можуть стати адекватним джерелом їх поповнення. Постійний системний контроль якості питної води всіх призначень також є дуже важливим фактором нормального функціонування організму людини.

В Україні Наказом Міністерства охорони здоров'я № 400 від 12.05.2010 р. затверджено Державні санітарні норми та правила “Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною” (ДСанПіН 2.2.4-171-10) [4]. 1 січня 2020 р. наберуть чинності нормативні вимоги до низки нових показників якості питної води, зокрема до загального органічного вуглецю, і з цього моменту якість питної води для українців контролюватиметься за 76 показниками. При цьому сьогодні більшість лабораторій аналізу якості питної води України не має обладнання та кваліфікованого персоналу для проведення аналізів якості води за новими показниками.

Останнім часом зростає інтерес до вивчення окисно-відновного потенціалу (ОВП) води, який пропонується включити до переліку критеріїв якості питної води. Дослідженнями доведено, що вживання питної води з від'ємним значенням ОВП покращує стан крові [5]. Оптимальне значення окисно-відновного потенціалу води має наближатися до ОВП біологічних рідин організму людини: крові, плазми, сироватки: від -50 до -100 мВ [6]. Якщо в організм поступає вода з високим значенням ОВП, вона відбирає електрони від клітинних мембран, органел, ферментів тощо, які зазнають окисної деструкції, та при регулярному вживанні може призводити до погіршення стану здоров'я [7]. Тому для щоденного вживання рекомендовано застосовувати воду з профілактичним рівнем ОВП від -100 до $+30$ мВ [8].

З огляду на це, метою нашої роботи було дослідження низки фізико-хімічних важливих показників мінеральної води, які визначають її вплив на організм людини.

Матеріали і методи

Для дослідження було відібрано 4 марки негазованої дитячої мінеральної води (“Малиш”, “Малютко”, “Моршинська спортік”, “Smarty Family”), 3 марки мінеральної природної столової води (“Миргородська лагідна”, “Моршинська”, “Buvette”) та 2 марки мінеральної природної лікувально-столової води (“Поляна квасова”, “Боржомі”), що широко представлені на ринку України, зокрема в м. Запоріжжі.

Визначення рН води проводили на рН-метрі-мілівольтметрі рН-150МА, використовуючи скляний комбінований електрод ЕСК-10301 [9].

Визначення загальної токсичності води здійснювали методом біотестування, який базується на вивченні характеристик проростання

насіння (схожості та енергії проростання), що знаходиться в чашках Петрі з фільтрувальним папером, зволоженим водою. За контроль брали дистильовану воду, оскільки водопровідна питна вода може містити цілий комплекс мікроконцентрацій токсичних речовин. Тест-об'єктом слугував овес посівний, який є універсальною індикаторною культурою. Насіння вівса посівного пророщували в термостаті за температури $25-27$ °С. Через 3 доби визначали схожість насіння та енергію проростання. Токсичність води визначали за такою шкалою: $0-20$ % пригнічення ростових процесів – відсутність або низький ступінь токсичності; $20,1-40$ % – середній рівень токсичності; $40,1-60$ % – токсичність вище середнього рівня; $60,1-80$ % – висока токсичність; $80,1-100$ % – максимальна токсичність [9].

Встановлення загальної твердості води проводили методом комплексонометричного титрування [9].

Визначення ОВП питних мінеральних вод проводили за допомогою ОВП-метра (Ezodo MP-103).

Загальне мікробне число визначали в 1 см³ води за кількістю колоній, що виростили на 3,5%-му м'ясо-пептонному агарі за температури 37 °С протягом 24 год [10]. Також проводили фарбування за Грамом для визначення грам-негативних і грам-позитивних бактерій.

Статистичну обробку результатів проводили методом обчислення середньої арифметичної помилки, середнього квадратичного відхилення. Вірогідність відмінностей між середніми величинами оцінювали за критерієм Ст'юдента [11].

Результати

Фасовані мінеральні води залежно від загальної мінералізації, наявності специфічних біологічно активних компонентів та сполук поділяються на такі: мінеральні природні столові, мінеральні розведені столові, мінеральні природні лікувально-столові та мінеральні розведені лікувально-столові.

Усі досліджувані марки води мають строк зберігання 1 рік за температури $5-20$ °С. Згідно з даними виробника, досліджувана вода характеризується вмістом макро- і мікроелементів, концентрації яких відповідають значенням, встановленим чинними вимогами ДСанПіН 2.2.4-171-10 “Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною” [4]. Цю досліджувану воду слід віднести до фізіологічно повноцінних, оскільки у своєму складі вона

містить основні іони, які є показником повноцінності мінерального складу води.

Відомо, що якість води, яка надходить до рослин, тварин і людини, значною мірою залежить від величини рН. З урахуванням того, що рН більшості внутрішніх середовищ (плазма крові, лімфа, міжклітинна та внутрішньосуглобова рідини) організму людини знаходиться в межах 7,26–7,45 та є одним із найбільш стабільних параметрів гомеостазу, рН оптимальної води має бути близьким до зазначених меж, тобто бути слабколужним. Отримані нами результати зведено в табл. 1.

Таблиця 1: Показники рН досліджуваних мінеральних вод

Марка води	рН
“Малиш”	7,49
“Малятко”	7,31
“Smarty Family”	7,87
“Моршинська спортік”	7,11
“Миргородська лагідна”	8,27
“Моршинська”	7,10
“Поляна квасова”	8,39
“Buvette”	8,00
“Боржомі”	8,34

Таблиця 2: Результати визначення загальної токсичності мінеральних вод

Марка води	Схожість		Енергія проростання	
	%	Відносно контролю, %	%	Відносно контролю, %
“Малиш”	85	21,43	65	18,20
“Малятко”	90	28,57*	80	45,45*
“Smarty Family”	90	28,57*	80	45,45*
“Моршинська спортік”	95	35,78*	80	45,45*
“Миргородська лагідна”	88	0*	76	–5,00
“Моршинська”	60	–31,81*	56	–30,00*
“Поляна квасова”	0	–100*	0	–100*
“Buvette”	50	–40,90*	40	–50,00*
“Боржомі”	40	–54,55*	12	–85,00*
Контроль	88	–	80	–

* $P < 0,05$ відносно контролю. Контроль (дистильована вода) покладається за нуль.

Таблиця 3: Результати визначення загальної твердості мінеральних вод

Марка води	Загальна твердість, ммоль-екв/дм ³
“Малиш”	2,8
“Малятко”	2,2
“Smarty Family”	4,8
“Моршинська спортік”	1,2
“Миргородська лагідна”	4,16
“Моршинська”	2,04
“Поляна квасова”	4,16
“Боржомі”	4,12
“Buvette”	3,1

Також зараз набуває важливого значення показник загальної токсичності води, який включено до комплексного підходу дослідження, розробленого в Інституті колоїдної хімії та хімії води НАН України, та до критеріїв дослідження стану води водних об’єктів і який визначається методом біотестування [12]. Використання біотестів уможливорює одержання об’єктивної оцінки впливу досліджуваного зразка на організми. Біотести виявляють токсичні властивості водного середовища, диференціюють різні марки фасованих вод за ступенем їх ризику для організму людини. Результати визначення загальної токсичності мінеральних вод наведено в табл. 2.

Як відомо, твердість води визначається вмістом катіонів кальцію та магнію. Результати дослідження загальної твердості мінеральних вод наведено в табл. 3.

Результати дослідження ОВП відібраних марок мінеральних вод наведено в табл. 4.

Результати мікробіологічного дослідження мінеральних природних столових і мінеральних природних лікувально-столових вод наведено в табл. 5.

Таблиця 4: Результати визначення окисно-відновного потенціалу мінеральних вод

Марка води	Окисно-відновний потенціал, мВ
“Малиш”	+160,5
“Малятко”	+183,3
“Smarty Family”	+153,4
“Моршинська спортік”	+187,7
“Миргородська лагідна”	+160,5
“Моршинська”	+180,0
“Поляна квасова”	+198,1
“Buvette”	+168,1
“Боржомі”	+197,1

Таблиця 5: Результати мікробіологічного аналізу води

Марка води	КУО*/см ³	Характеристика мікроорганізмів
“Миргородська лагідна”	3050 ± 295	Грамнегативні бактерії паличкоподібної форми, колонії бежевого кольору
“Моршинська”	2876,6 ± 167,5	Грамнегативні бактерії паличкоподібної форми, колонії бежевого кольору Грампозитивні бактерії паличкоподібної форми, колонії білого кольору
“Поляна квасова”	23,75 ± 1,5	Грампозитивні бактерії, сарцини, колонії жовтого кольору Граммнегативні бактерії паличкоподібної форми, колонії бежевого кольору Граммнегативні бактерії паличкоподібної форми, колонії блідо-рожевого кольору
“Buvette”	386 ± 26,3	Грампозитивні бактерії кулеподібної форми Грампозитивні бактерії паличкоподібної форми
“Боржомі”	32,5 ± 2,8	Граммнегативні бактерії паличкоподібної форми, колонії бежевого кольору Грампозитивні бактерії, тетракоки, колонії жовтого кольору

*КУО – колонієутворювальні одиниці.

Обговорення

Усі зразки мають слабколужну реакцію (7,1–8,39) та знаходяться в межах, встановлених існуючими нормативами для питної води (6,5–8,5).

Серед досліджених зразків дитячих мінеральних вод найменші показники схожості та енергії проростання виявилися у воді марки “Малиш”, але всі вивчені проби мали значення показників, вищі за контроль (дистильована вода). Це вказує на відсутність загальної токсичності та на збалансованість вмісту солей у досліджуваних зразках. Показники схожості та енергії проростання у зразках мінеральних природних столових та мінеральних природних лікувально-столових вод нижчі, ніж у контролі. Виняток становить вода “Миргородська лагідна”, показники якої майже не відрізняються від контролю. Отримані дані свідчать про необхідність більш глибокого вивчення якості цих марок води.

Загальна твердість досліджуваних вод знаходиться в інтервалах існуючих нормативів для питної води (1,5–7 ммоль-екв/дм³) та відповідає даним виробника. Виняток становить вода марки “Smarty Family”, яка, за нашими даними, має твердість 4,8 ммоль-екв/дм³, що трохи нижче показника, зазначеного на етикетці (5,3 ммоль-екв/дм³).

Для досліджуваних нами вод середнє значення ОВП становило +175,96 мВ. Для порівняння, ОВП води централізованого водопостачання у м. Києві [6] знаходиться в межах від +350 до +450 мВ, а більшості фасованих вод – від +200 до +400 мВ. Цими ж авторами вияв-

лено також тенденцію до вищих значень ОВП серед газованих вод і напоїв порівняно із негазованими. Таким чином, наведений вище порівняльний аналіз свідчить, що показник ОВП досліджуваних вод зіставний з таким для фасованих мінеральних вод.

Встановлено, що більшість зразків мають значно підвищений вміст мікроорганізмів та не відповідають встановленим нормативам для фасованої води (колонієутворювальних одиниць на сантиметр кубічний не більше 20) [4], що може вказувати навіть на фальсифікацію зазначених марок фасованої води.

Висновки

Згідно з державними нормами досліджувана дитяча вода може бути рекомендована для дитячого харчування, а також як основа для приготування напоїв і як додатковий засіб при прийомі ліків. Досліджувані мінеральні природні столові та мінеральні природні лікувально-столові води також можуть вживатись за призначенням, але за мікробіологічним показником деякі з них потребують подальшого контролю. Однак за значенням показника ОВП жодна марка води не відповідає величинам ОВП біологічних рідин організму людини, в тому числі й дитини. Тому необхідно проводити подальші дослідження стосовно впливу ОВП питної води на організм людини, які дають змогу оцінити необхідність введення ОВП як одного з основних показників якості питної води. В подальшому планується проводити дослідження водних розчинів лікарських трав із найбільш дослідженим і відомим складом біологічно активних речовин.

References

- [1] Gvozdyak PI. Biochemistry of water as a promising scientific direction. Bulletin of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2006;9:21-3.
- [2] Bystrykh VV. Hygienic assessment of the influence of drinking water on the health of the population. Hygiene and Sanitation. 1998;6:20-2.
- [3] Goncharuk VV, Pshinko GH, Rudenko AO, Pleteneva TV, Syroeshkin AV, Uspenskaya EP, et al. Genetically safe drinking water. Requirements and methods of quality control. J Water Chem Technol. 2018;1:32-41.
- [4] Hygienic requirements for drinking water intended for human consumption: State sanitary rules and regulations 2.2.4-171-10: Ministry of Health of Ukraine; 2010. Order № 400.
- [5] Matsiyevska O. Influence of redox potential of different water quality on the human blood. Technological Audit and Production Reserves. 2017; 1/3:34-8.
- [6] Peresichny M, Fedorova D. Electroactivated water in human nutrition. Goods and Markets. 2013;1:70-86.
- [7] Khubutiya MSh, Evseev AK, Kolesnikov VA, Goldin MM, Davydov AD, Volkov AG, et al. Measurements of the potential of a platinum electrode in blood, plasma and serum. Electrochemicals. 2010;46(5):569-73.
- [8] Grishchuk V, Ashbakh D. Water for children. Ecology of Man and the Environment. New Methods and Means of Recovery. Minsk 2014. p. 10-20.
- [9] Fedorova AI, Nikolskaya AN. Workshop on ecology and environment protection. Moscow: Vldos; 2001. 288 p.
- [10] Kovaleva OO. Methodical instructions for independent work and practical classes in the discipline "Sanitary-hygienic bases of water supply and drainage" (for students of the 6th year of full-time education of specialty 8.17020201 – Labor protection (by branches)). Kharkiv; 2015. 55 p.
- [11] Lakin GF. Biometrics: A manual for biological specialties of high schools. Moscow: High School; 1990. 352 p.
- [12] Drinking water: Requirements and methods of quality control. Kyiv: MinEconomyDevelopment of Ukraine; 2014. 30 p. SSTU 7525:2014.

Ю.Ю. Петруша, А.Ф. Рыльский, П.И. Гвоздяк

НЕКОТОРЫЕ ВАЖНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЯДА МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД, КОТОРЫЕ ШИРОКО ИСПОЛЬЗУЮТСЯ В БЫТУ

Проблематика. Качество воды является одним из важнейших факторов, которые имеют определяющее влияние на организм человека.

Цель. Исследование ряда физико-химических важных показателей минеральной воды, которые определяют ее влияние на организм человека.

Методика реализации. Изучали основные критерии, которые относятся к качеству питьевой воды: окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), pH, общую жесткость, общее микробное число. Также важное значение имеет показатель общей токсичности воды, который определяется методом биотестирования и дает объективную оценку влияния исследуемого образца на организмы.

Результаты. Полученные результаты свидетельствуют, что pH исследуемой воды находится в пределах, установленных существующими нормативами для питьевой воды. Все образцы имеют слабощелочную реакцию pH (7,1–8,39). Общая жесткость воды находится в пределах 1,5–7 ммоль·экв/дм³ и соответствует данным производителя и установленным существующим нормативам. Исключение составляет вода марки "Smarty Family", которая имеет жесткость чуть ниже показателя, указанного на этикетке. Все изученные пробы детской минеральной воды имели значения показателей всхожести и энергии прорастания выше контроля (дистиллированная вода). Это указывает на отсутствие общей токсичности и на сбалансированность содержания солей в исследуемых образцах. Значение этих показателей в образцах минеральной природной столовой и минеральной природной лечебно-столовой воды ниже, чем в контроле. Исключение составляет вода "Миргородская лагидна", показатели которой почти не отличаются от контроля. Что касается показателя ОВП, ни одна марка воды не соответствует величинам ОВП биологических жидкостей организма человека, в частности и ребенка. Большинство образцов минеральных природных столовых и минеральных природных лечебно-столовых вод (исключая воду марок "Поляна квасова" и "Боржоми") имеют повышенное содержание микроорганизмов и не соответствуют установленным нормативам для бутилированной воды.

Выводы. Исследуемые минеральные природные столовые и минеральные природные лечебно-столовые воды могут употребляться по назначению, но по микробиологическому показателю и ОВП нуждаются в дальнейшем контроле.

Ключевые слова: вода; окислительно-восстановительный потенциал; общая жесткость; pH; микробное число.

Yu.Yu. Petrusha, O.F. Rylsky, P.I. Gvozdyak

SOME OF THE IMPORTANT PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF A NUMBER OF MINERAL WATERS WIDELY USED IN EVERYDAY LIFE

Background. Water quality is one of the most important factors that have a decisive influence on the human body.

Objective. The aim of the paper is the research of important physical and chemical properties of mineral water determining its influence on the human body.

Methods. Main criteria relating to drinking water quality are studied: redox potential (ROP), pH, total hardness, total microbial count. The indicator of overall water toxicity should be taken into account as well determined by bioassay and provides an objective assessment of the influence of the sample on the organisms.

Results. The obtained results indicate that the pH of the water under investigation is within the limits established by the existing norms for drinking water. All samples have a weak alkaline reaction pH (7.1–8.39). Total water hardness is within 1.5–7 mmol·ekv/dm³ and corresponds to the data set by the manufacturer and the existing regulations. The exception is the water of the brand "Smarty Family". Its hardness is a little bit below the index indicated on the label. All studied samples of mineral water for children had similarity values and germination energy higher than control (distilled water). This indicates a lack of general toxicity and balance of salt content in the samples. The values of these indices in samples of mineral natural dining and mineral natural medical dining water are lower than in the control. The exception is water "Myrgorodska Lagidna", which indicators are almost the same as control. As to the ROP indicator value, no water brand corresponds to the ROP values of the human body biological fluids, in particular the children's biological fluids. Most samples of natural mineral dining and natural mineral medical-dining water (except water brands "Polyana Kvasova" and "Borjomi") have a high content of microorganisms and don't meet the standards for bottled water.

Conclusions. Investigated mineral natural dining and mineral natural medical dining water can be used in the line functions, but on a microbiological index and ROP needs further control.

Keywords: water; redox potential; total hardness; pH; microbial number.