

Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика. 2024. Т. 32, № 3
Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Applied Nonlinear Dynamics. 2024;32(3)

Научная статья
УДК 530.182

DOI: 10.18500/0869-6632-003095
EDN: QXBPBF

О взаимосвязи наблюдаемой динамики колориметрического индикатора с нелинейной динамикой исследуемого популяционного роста в случае микробиологических культур

А. В. Сычев✉, Е. Б. Постников

Курский государственный университет, Россия

E-mail: ✉sychev_av@kursksu.ru, postnikov@kursksu.ru,

Поступила в редакцию 21.11.2023, принята к публикации 18.12.2023,

опубликована онлайн 25.03.2024, опубликована 31.05.2024

Аннотация. Резазуриновый тест является одним из наиболее распространенных подходов к изучению роста и метаболической активности микроорганизмов. Он основан на изменении цвета синего индикатора (резазурина) на его розовую восстановленную форму (резоруфин) в результате процесса восстановления, катализируемого метаболической активностью. При этом для количественной характеристики процесса необходимо учитывать тот факт, что регистрируются результаты химического превращения, которые могут отличаться от лежащей в основе кинетики роста популяции. **Цель.** Основной целью данной работы является последовательное моделирование обоих взаимосвязанных нелинейных процессов роста, направленное на получение аналитического решения, зависящего от специфики и параметров биологических и химических составляющих, и его сравнение с кривыми, полученными экспериментально. **Методы.** Изменение концентрации индикатора выведено в предположении логистического роста бактерий, катализирующих рассматриваемую однонаправленную химическую реакцию, и сопоставлено с фотометрически регистрируемой кривой роста для популяции лактобактерий. **Результаты.** Выявлено, что кривая биохимического роста также будет логистической только в случае специально согласованных кинетических параметров и емкости среды. В противном случае для аппроксимации наблюдаемой динамики необходимо использовать другую функциональную форму. **Заключение.** Таким образом, основной вывод состоит в том, что необходимо обратить внимание на важность различия кривых роста, лежащих в основе микробного и наблюдаемого химического роста. Их разница влияет на величину скорости роста популяции, которая является целью подобных тестов, и, следовательно, для регрессии экспериментальных данных необходимо использовать соответствующую функциональную форму.

Ключевые слова: резазурин, резоруфин, клеточная активность, популяционная динамика.

Для цитирования: Сычев А. В., Постников Е. Б. О взаимосвязи наблюдаемой динамики колориметрического индикатора с нелинейной динамикой исследуемого популяционного роста в случае микробиологических культур // Известия вузов. ПНД. 2024. Т. 32, № 3. С. 332–346. DOI: 10.18500/0869-6632-003095. EDN: QXBPBF

Статья опубликована на условиях Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0).

On the relationship between the observed dynamics of a colorimetric indicator and the nonlinear dynamics of the population growth under study in the case of microbial cultures

A. V. Sychev[✉], E. B. Postnikov

Kursk State University, Russia

E-mail: ✉sychev_av@kursksu.ru, postnikov@kursksu.ru,

Received 21.11.2023, accepted 18.12.2023, available online 25.03.2024, published 31.05.2024

Abstract. The resazurin test is one of the most widespread approaches for studying the growth and metabolic activity of microorganisms. It is based on the colour change of the blue indicator, resazurin, to its pink reduced form, resorufin due to the reduction process catalyzed by the metabolic activity. At the same time, the quantitative characterization of the process needs to take into account the fact that one registers the results of the chemical transformation, which can differ from the underlying kinetics of the population growth. *Purpose.* The principal goal of this work is a sequential modelling of both coupled nonlinear growth processes aimed at obtaining the closed-form solution depending on the specificity and parameters of biological and chemical counterparts and its comparison with the curves obtained experimentally. *Methods.* The indicator concentration change is derived under the assumption of the logistic bacterial growth catalyzing the unidirectional chemical reaction considered and compared with the photometrically registered growth curve for a population of lactobacteria. *Results.* It is revealed that the biochemical growth curve will be logistic too only in the case of specially coordinated kinetic parameters and the systems' carrying capacity. Otherwise, another functional form should be used to approximate the observable dynamics. *Conclusion.* Thus, the main conclusion consists of drawing attention to the importance of distinguishing between the underlying microbial and observable chemical growth curves. Their difference affects the value of the population growth rate, which is the target of such tests, and, therefore, the proper functional form should be used for the experimental data regression.

Keywords: resazurin, resorufin, cellular activity, population dynamics.

For citation: Sychev AV, Postnikov EB. On the relationship between the observed dynamics of a colorimetric indicator and the nonlinear dynamics of the population growth under study in the case of microbial cultures. *Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics.* 2024;32(3):332–346. DOI: 10.18500/0869-6632-003095

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0).

Введение

Колориметрические и спектрофотометрические методы, основанные на регистрации изменения цвета (или флуоресценции) индикатора, добавленного в жидкую среду, с культивируемыми в ней микроорганизмами, в настоящее время занимают место среди основных способов характеристики популяционного роста в фундаментальной и прикладной микробиологии [1, 2]. Это связано прежде всего с тем, что такой подход существенно проще, чем визуальный микроскопический подсчет индивидуальных микроорганизмов или колониеобразующих единиц (КОЕ), и является более надежным, чем регистрация мутности среды по ее суммарной оптической плотности (ОП), так как последний подход не различает активно делящиеся, жизнеспособные и нежизнеспособные организмы. Напротив, специально подобранные индикаторы реагируют на фермент-субстратные реакции внутри живой клетки, дыхательную активность и/или другие типы метаболической активности, позволяя решать требуемые задачи по определению популяционной динамики микроорганизмов [3]. Сегодня особое внимание данные методы привлекают в контексте разработки систем дистанционного мониторинга [4], позволяющих проводить автоматизированную запись

и передачу данных о бактериальной контаминации, скрининге отклика на антибактериальные средства и т. п.

Однако при этом следует отметить фундаментальную разницу между определенным ростом популяции микроорганизмов, модельное описание которого строится на основе хорошо разработанных нелинейных дифференциальных уравнений (Ферхюльста, Гомперца и других), верифицированных на основе методов прямого подсчета КОЕ [5–7], и наблюдаемой динамикой, которая обусловлена как биохимическими реакциями, так и зависимостью между количественными параметрами выбранной цветовой шкалы и концентрациями форм индикаторного вещества.

Известные методы, устанавливающие подобное соответствие, в основном оперируют эмпирическими зависимостями, как правило, базирующимися на подборе концентраций реагентов таким образом, чтобы наблюдалась линейная корреляция между микроскопическим счетом КОЕ или же определением ОП и фотометрической кривой при фильтрации изображения в выбранном узком интервале длин волн, приблизительно соответствующих интересующему цвету индикатора [8]. Может быть также использовано соответствие изменения цвета индикатора времени порога детектирования присутствия микроорганизмов, стартующих рост и размножение с различной начальной концентрацией [9], изменение величины главных компонентов в заданном цветовом пространстве [10] или корреляция, установленная путем машинного обучения [11, 12]. Число же работ, посвященных соответствующему анализу на основе математических моделей, оперирующих связанными динамическими системами, весьма ограничено.

Простая кинетическая модель, комбинирующая линейные кинетические уравнения со связанными параметрами для роста популяции и изменения оптической плотности, была рассмотрена в работе [13]. Существенно более сложная система, учитывающая редукцию питательной среды, выявляемую колориметрическим анализом, и соответствующий рост биомассы на основе эмпирически подобранных уравнений и параметров, использовалась в численной модели биореактора в работе [14]. В работе [15] было показано на основе эксперимента, что различное начальное разведение микобактериальной культуры может приводит к изменению типа дифференциального уравнения, описывающего динамику флуоресценции индикаторной среды в ходе популяционного роста, с модели Ферхюльста на модель Гомперца, и предложено качественное объяснение за счет различного соотношения кинетических констант популяционной динамики и фотохимической кинетики. Ряд кинетических моделей, связывающих доступный для регистрации цветовой отклик индикатора резазурина с процессами биохимической кинетики, приведен в обзоре [16].

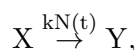
Таким образом, основной целью данной работы является построение последовательности моделей от популяционного роста бактериальной культуры до регистрируемой динамики цвета индикатора, в качестве которого выступает резазурин (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксид, известный также под коммерческим названием Alamar Blue), который при взаимодействии с митохондриальными и цитоплазматическими редуктазами живой клетки восстанавливается в розовый резорурфин (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он) с дальнейшей возможной трансформацией в бесцветный дигидрорезорурфин (7-гидрокси-1,2-дигидро-3Н-феноксазин-3-он). Данный индикатор является одним из основных реагентов в современных микробиологических исследованиях жизнеспособности клеточных культур [2, 17]. Для его восстановительной реакции хорошо исследована химическая кинетика [18, 19]. Кроме того, для данной реакции в настоящее время установлено соответствие концентрационных зависимостей, полученных путем спектрального анализа, колориметрическим и фотометрическим характеристикам [20]. Использование лактобактерий в качестве модельной культуры основывается на детальном исследовании соответствующей динамики популяционного роста с помощью широкого набора классических нелинейных дифференциальных уравнений на основе метода подсчета КОЭ [6].

1. Модель связанной популяционной и химической кинетики

Кинетика реакции восстановления резазурина, катализируемой реагентом R , идет согласно схеме [18, 19]



где X — резазурин, Y — резорурфин, Z — дигидрорезорурфин, являющийся нефлуоресцентным прозрачным веществом. Этот второй обратимый этап, как правило, не используется для теста жизнедеятельности микроорганизмов, поэтому если пренебречь переходом резорурфина в дигидрорезорурфин и рассматривать только реакцию первого порядка, катализируемую числом микроорганизмов $N(t)$ с коэффициентом пропорциональности (скоростью необратимой химической реакции) k ,



то для концентраций (x и y соответственно) имеем

$$\frac{dx}{dt} = -kN(t)x, \quad (2)$$

$$\frac{dy}{dt} = kN(t)x, \quad (3)$$

с начальными условиями $x(0) = x_0$, $y(0) = 0$ и законом сохранения $x + y = x_0$, где x_0 — начальная концентрация резазурина; начальная концентрация резорурфина в рассматриваемом случае равна нулю.

Из интегрирования (2) по методу разделения переменных следует, что

$$\ln \left(\frac{x}{x_0} \right) = -k \int_0^t N(t) dt. \quad (4)$$

Таким образом, искомого решения — кинетическая кривая роста концентрации индикатора — может являться нетривиальной функцией времени в зависимости от временной эволюции численности микроорганизмов и имеет вид

$$y(t) = x_0 \left(1 - e^{-k \int_0^t N(t) dt} \right). \quad (5)$$

Заметим, что решение (5) зависит от времени даже в том случае, когда популяция является постоянной по численности, но жизнеспособной, то есть $N = N_s = \text{const}$, и концентрация регистрируемого резорурфина растет, экспоненциально приближаясь к стационару как

$$y(t) = x_0 \left(1 - e^{-kN_s t} \right). \quad (6)$$

Таким образом, тривиальный факт наличия временной зависимости изменения концентрации индикатора от времени не свидетельствует о наличии роста микробиологической культуры и говорит лишь о ее жизнеспособности. При этом известно существенное для практических фармакологических приложений наблюдение [21] о различии минимальной ингибирующей концентрации лекарства (МИК) (концентрации, приводящей к гибели патогенных микроорганизмов) и стационарной концентрации, при которой скорости роста гибели организмов сравниваются,

что приводит к возникновению стационарной, но жизнеспособной популяции. Временная зависимость, отраженная в решении (6), говорит о том, что оба случая (стационарная концентрация лекарства и концентрация, существенно не достигающая МИК) ведут к изменению показаний индикатора и более точный вывод должен базироваться не на факте их роста, а на более точном анализе соответственной функциональной зависимости (см. далее). Специфический вариант такого поведения был также отмечен в работе [15], где кривая роста микобактерий туберкулеза на определенном временном интервале складывалась из последовательности участков кривых вида (6), причем только их начальные и конечные точки укладываются на классическую кривую роста микроорганизмов Ферхюльста. Такое поведение привело к интерпретации роста микобактериальной культуры как синхронизированных моментов делений, между которыми численность колоний не меняется, как и следует из (6).

Второй фактор, который необходимо принять во внимание: выход кривой роста индикаторного вещества на стационар не обязательно означает выход на стационар роста микробиологической культуры, так как это может происходить просто вследствие исчерпания количества индикатора. В частности, это можно наглядно продемонстрировать, подставив в уравнение (5) функцию неограниченного роста популяции $N(t) = N_0 \exp(rt)$ с начальным значением N_0 и константой размножения r , что дает исключительно быстро (двойная экспонента) выходящую на стационар кривую роста индикатора

$$y(t) = x_0 \left(1 - e^{-kN_0[e^{rt}-1]} \right). \quad (7)$$

Поэтому рассмотрим теперь в деталях более реалистичный случай роста численности микроорганизмов, который удовлетворяет классическому уравнению логистического роста — уравнению Ферхюльста

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{K} \right) \quad (8)$$

с начальной численностью $N(0) = N_0$, константой популяционного роста r , емкостью среды K , и имеет решение

$$N(t) = \frac{N_0 e^{rt}}{\frac{N_0}{K} (e^{rt} - 1) + 1} \equiv \frac{K e^{rt}}{e^{rt} + (K/N_0 - 1)}. \quad (9)$$

Подставляя логистическую функцию (9) в решение для концентрации субстрата (4), приходим к интегралу

$$\int_0^t N(t) dt = \int_0^t \frac{N_0 e^{rt}}{\frac{N_0}{K} (e^{rt} - 1) + 1} dt,$$

который берется в аналитической форме, и получаем

$$\ln \left(\frac{x}{x_0} \right) = -\frac{kK}{r} \ln \left[\frac{e^{rt} + (K/N_0 - 1)}{K/N_0} \right].$$

В результате решения для временной эволюции концентраций резазурина и резорурфина имеют вид

$$x = x_0 \left[\frac{K/N_0}{e^{rt} + (K/N_0 - 1)} \right]^{\frac{kK}{r}} \quad (10)$$

и

$$y = x_0 \left(1 - \left[\frac{K/N_0}{e^{rt} + (K/N_0 - 1)} \right]^{\frac{kK}{r}} \right) \quad (11)$$

соответственно.

Очевидно, что ни одно из них не является логистической функцией, хотя выражение (10) можно рассматривать как решение нелинейного уравнения Ричардса [22] для обратного времени,

$$\frac{dx}{dt} = -x_0 k K \left(\frac{x}{x_0} \right) \left(1 - \left(\frac{x}{x_0} \right)^{\frac{r}{kK}} \left[1 - \frac{N_0}{K} \right] \right), \quad (12)$$

известное также как уравнение обобщенного логистического роста.

Сомножитель в квадратных скобках можно выразить через x исходя из (10):

$$\frac{dx}{dt} = -x_0 k N_0 \left(\frac{x}{x_0} \right)^{\frac{kK}{r} + 1} e^{rt} \equiv -x_0 k N_0 \left(\frac{x}{x_0} \right)^{\frac{r}{kK} + 1} e^{rt}.$$

Оставшийся экспоненциальный множитель опять можно выразить из (10), и, в силу закона сохранения $x + y = x_0$, решение (11), соответствующее кривой роста концентрации резорфуфина, удовлетворяет уравнению

$$\frac{dy}{dt} = x_0 k K \left(1 - \frac{y}{x_0} \right) \left(1 - \left(1 - \frac{y}{x_0} \right)^{\frac{r}{kK}} \left[1 - \frac{N_0}{K} \right] \right). \quad (13)$$

Однако кривая роста концентрации индикатора (11) допускает частный случай для комбинации параметров $kK/r = 1$, при котором рассматриваемая функция принимает вид

$$y_V = x_0 \frac{[e^{rt} - 1]}{[e^{rt} - 1] + [(K/N_0 + 1) - 1]}. \quad (14)$$

Сравнение формул (9) и (14) показывает, что они имеют аналогичную дробно-рациональную структуру с заменой экспоненциальной функции времени в (9) на сдвинутую экспоненциальную в (14), а также сдвинутыми на ту же единицу отношениями конечной и начальной численности популяций. Первый сдвиг естественным образом следует из того, что в начальный момент резорфуфина, в отличие от микроорганизмов, в системе нет, и решение для его концентрации обязано быть сдвинуто в ноль. Сдвиг асимптотического стационара, по сути, следствие того же различия. К данному выводу о редукции обобщенного логистического роста к стандартному можно прийти и непосредственно подставив $kK/r = 1$ в уравнение (13), которое действительно принимает форму уравнения Ферхюльста для переменной $1 - y$, записанного для обратного времени (в силу симметричности логистической кривой относительно точки перегиба и асимптотик по времени формальное направление времени не влияет на характерную форму логистической кривой).

Так как экспоненциальная функция является достаточно быстро растущей, то для времен, заметно превышающих обратную величину характерной константы роста микроорганизмов ($t \gg r^{-1}$), вычитаемой единицей можно пренебречь, то есть получить именно логистическую функцию Ферхюльста

$$\tilde{y}_V = x_0 \frac{e^{rt}}{e^{rt} + [(K/N_0 + 1) - 1]}, \quad (15)$$

растущую с той же константой размножения, что исследуемая популяция, но выходящую на значение насыщения, соответствующее максимальной концентрации индикатора, резорфуфина, при его полной конверсии из резазурина. Учитывая связь между константой роста r и временем удвоения популяции $T_d = \ln(2)r^{-1}$, видно, что регрессия при помощи функции логистического роста применима как минимум после нескольких характерных времен деления.

Рис. 1 иллюстрирует данные выводы, показывая, что в специальном случае $kK/r = 1$ кривая роста концентрации резорфуфина практически неотличима от кривой популяционного роста после примерно пяти циклов клеточного деления и может быть адекватно использована для

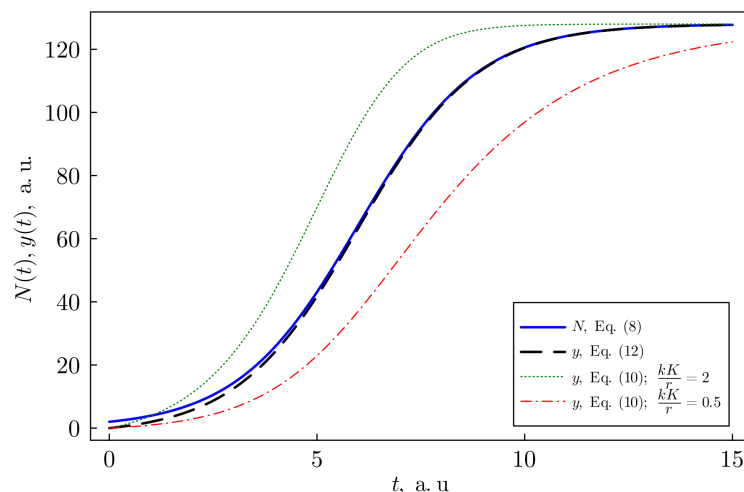


Рис. 1. Иллюстрация сравнения хода кинетических кривых популяционного роста и роста регистрируемой концентрации резазурина при различных значениях контролирующего параметра kK/r . Начальные условия $N_0 = 2$, $y(0) = 0$; асимптотические стационарные значения согласованы по величине для наглядности: $K = x_0 = 128$, константа роста $r = \ln(2)$ выбрана таким образом, что характерное время удвоения популяции соответствует единице времени $T_d = 1$

Fig. 1. An illustration comparing the kinetic curves for population growth and the growth of the recorded resazurin concentration at different values of the control parameter kK/r . Initial conditions are $N_0 = 2$, $y(0) = 0$; the asymptotic stationary values are matched in magnitude for clarity: $K = x_0 = 128$, the growth constant $r = \ln(2)$ is chosen in such a way that the characteristic time of population doubling corresponds to the time unit $T_d = 1$

характеризации процесса (в принципе, учитывая достаточно малое расхождение кривых и то, что реальные экспериментальные данные имеют определенную погрешность, для их регрессии может быть использована логистическая кривая и после примерно трех циклов деления). На практике данное соответствие кривой конверсии резазурина популяционной кривой, определенной непосредственным подсчетом числа бактериальных колоний, было выявлено для резазуринового теста для стандартных клеточных культур [23] и в сравнении с альтернативными методами контроля метаболической активности жизнеспособных штаммов *M. tuberculosis* [24]. Однако отмечается, что данное наблюдение требует соблюдения определенных условий для концентраций культуры и реагентов, что подтверждает сделанный вывод о необходимости согласования параметров.

При $kK/r > 1$ быстрая конверсия резазурина в резорурфин приводит к выходу регистрируемой кривой на насыщение гораздо раньше, чем происходит стабилизация популяционного роста, так как фактически в системе не остается реагента. Напротив, при $kK/r < 1$ наблюдается упомянутый выше (см. уравнение (6)) эффект того, что стабилизированная жизнеспособная популяция продолжает осуществлять дыхательную активность, что приводит к восстановлению еще остающегося в системе резазурина в резорурфин, концентрация которого растет с течением времени.

2. Анализ экспериментальных данных на основе популяционно-химической модели

2.1. Материалы и методы эксперимента. В качестве микробиологических объектов была выбрана микробная масса живого антагонистически активного штамма лактобактерий (*Lactobacillus plantarum* 8P-A3 или *Lactobacillus fermentum* 90T-C4) с добавлением компонентов защитной среды высушивания (желатин, сахароза, молоко) (АО НПО «Микроген», Москва, Россия). Данные компоненты также обеспечивают растущую культуру питательными веществами при разведении суспензии водой. Вследствие этого дополнительной питательной среды не применялось. Сухие лактобактерии (КОЕ не менее $1 \cdot 10^{10}$ в 15 г лиофилизата) разводили в 250 мл

дистиллированной воды, после чего выдерживали при непрерывном перемешивании в течение 30 минут для равномерного распределения микроорганизмов во всем объеме. Затем была приготовлена серия из 11 образцов суспензий лактобактерий, каждый объемом по 10 мл от исходной концентрации до разбавления в 11 раз. К каждому из растворов добавляли по 1 мл разбавленного раствора резазурина. В качестве контроля использовали 10 мл прокипяченной дистиллированной воды с эквивалентным количеством красителя.

Приготовление основного раствора индикатора (натриевой соли резазурина): дистиллированную воду кипятили в течение 5 минут и затем охлаждали до $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, после чего добавляли (0.055 ± 0.001) г натриевой соли резазурина (Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA), содержание красителя более 75%). Смесь тщательно перемешивали до полного растворения красителя. Раствор резазурина разбавляли 1 : 3 с дистиллированной водой. Концентрация резазурина в рабочем растворе составляла 0.00067 моль/л.

Для получения фотометрических кривых в течение 72 часов использовали портативный микробиологический анализатор (ПМА) [25] (Патент RU 2 779 840 C1) с периодичностью регистрации данных — каждые 15 мин. Анализ, представленный в работе [20], свидетельствует о существовании линейной зависимости между концентрацией резорурфина и регистрируемой освещенностью фотоэлементов в режиме до перехода на этап конверсии резорурфина в дигидрорезорурфин. Таким образом, показания прибора отражают изменение количества продукта химической реакции y .

2.2. Результаты и их обсуждение. Рис. 2, *a* показывает пример изменения цвета индикатора в ряду лунок микробиологического планшета для одного момента времени после начала измерений при условии различной начальной концентрации лактобактерий. Видно, что данный интервал начальных разведений за 72 часа хода процесса приводит к полному варианту колориметрических реакций (1): от практически неизменного синего цвета контроля через порозовение до полностью прозрачного раствора, свидетельствующего о полной конверсии в дигидрорезорурфин. В связи с этим отметим, что в рамках модели, ограниченной необратимым переходом резазурина в резорурфин, варианты кинетики быстрого обесцвечивания (разведения более чем $(1/7)$) детально не анализируются.

На рис. 2, *b* для каждой из ячеек планшета зеленые и малиновые маркеры отображают показания ПМА, нормированные на величину освещенности в начальный момент времени для коррекции ее вариабельности по площади планшета. В силу примененной нормировки $y(0)/y_0 = 1$, в то время как отсутствие резорурфина в системе представляет собой его нулевую концентрацию, фитирование данных решением уравнения Ферхюльста должно осуществляться со сдвигом на константу d , то есть

$$\frac{y}{y_0} = \frac{K - d}{1 + e^{-r'(t-t_m)}} + d, \quad (16)$$

где t_m — момент времени, соответствующий половинному росту.

Заметим, что модель логистического роста (16) по определению требует ненулевого (для $y/y_0 - d$) начального значения, так как кинетика Ферхюльста является автокаталитической. Кроме того, из рис. 2, *b* видно, что для ряда ячеек планшета детектируется определенное падение освещенности в течение первых часов после начала эксперимента, связанное с испарением жидкости, конденсирующейся на верхней крышке планшета, что снижает прозрачность последней. Вследствие этого, при проведении нелинейной регрессии с целевой функцией (16), параметр d также подлежит определению, чтобы принять во внимание эффект нормировки с учетом конденсата. Нелинейная регрессия с использованием функции (11) также проводится с аддитивным введением сдвига кривой на постоянную величину.

Кроме того, видно, что, начиная с разведения $(1/10)$, характер роста сигнала претерпевает изменения, что связано со вторым шагом реакции (1). Поэтому для последующей регрессии

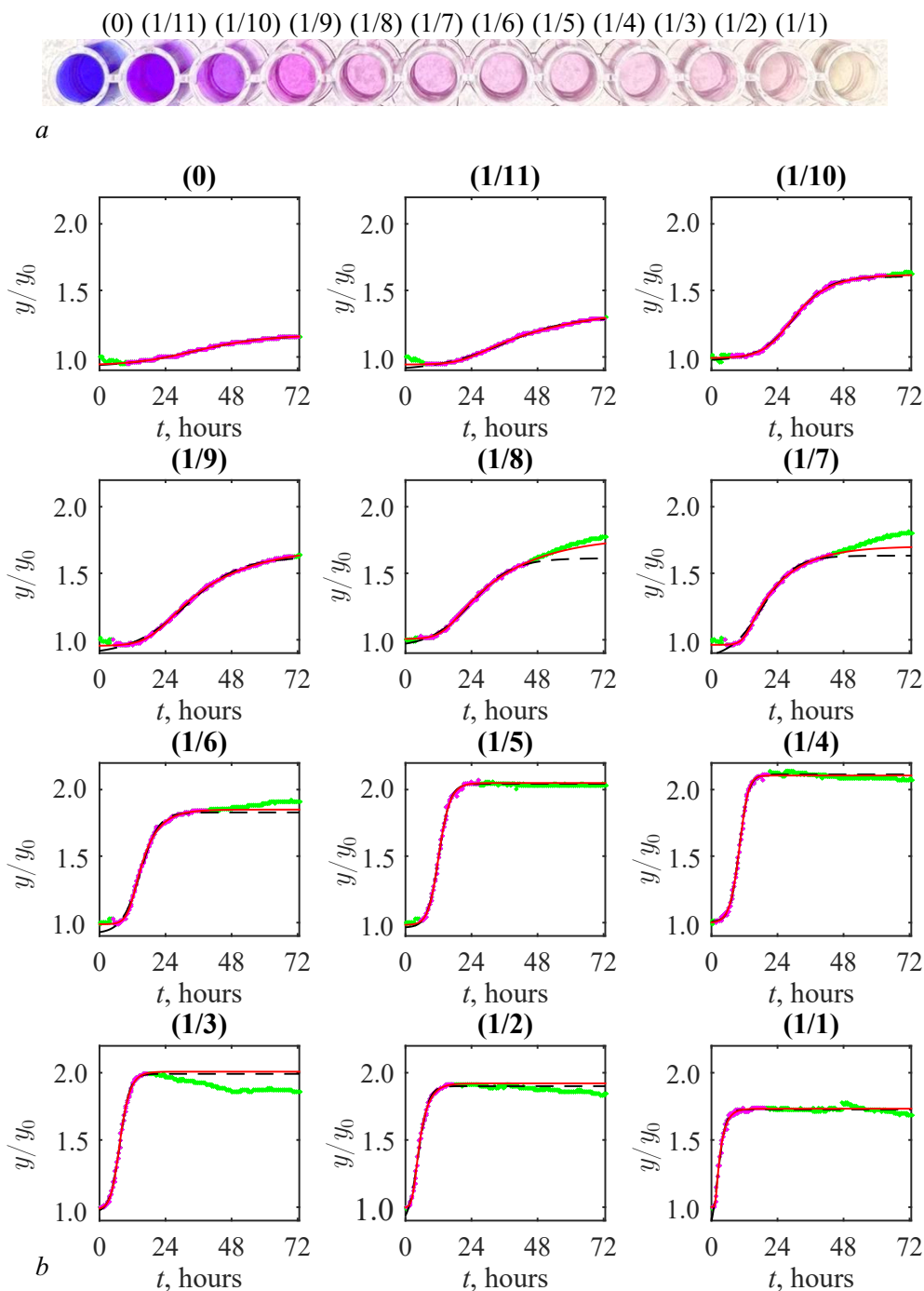


Рис. 2. *a* — Фотография лунок микробиологического планшета, сделанная через 72 часа после начала эксперимента; над каждой из лунок подписано относительное начальное разведение в долях от $4 \cdot 10^8$ КОЕ; обозначение (0) соответствует резазуриновому контролю без добавления культуры. *b* — Фотометрические данные, полученные с помощью ПМА, нормированные на начальную освещенность (малиновые (использованные для последующего фитирования) и зеленые маркеры); фиты данных логистической кривой (черная штриховая линия) и решением уравнения популяционно-химической модели (сплошная красная линия) (цвет онлайн)

Fig. 2. *a* — A photo of microbiology plate wells taken 72 h after the start of the experiment; the relative initial dilutions in fractions of $4 \cdot 10^8$ COU are designated above each well; designation (0) corresponds to the resazurin control without culture addition. *b* — Photometric data obtained with PMA normalized to the initial illumination (magenta (used for the subsequent fitting) and green markers); data fitted by a logistic curve (black dashed line) and by solving the population-chemistry model equation (solid red line) (color online)

использована только часть данных, отвечающая активному переходному процессу (соответствующие им маркеры выделены малиновым цветом).

Из полученных экспериментальных данных (см. рис. 2, *b* для субпанели (0)) можно заметить, что контрольный раствор показывает небольшой рост. Это можно объяснить массопереносом метаболитов лактобактерий или лиофилизирующих веществ раствора, часть которых могла попасть в лунку с чистым резазурином через конденсат, образовавшийся на поверхности крышки планшета. Их следовые количества могут приводить к реакции восстановления резазурина, в особенности при условии воздействия света, регулярно освещающего планшет во время регистрации фотометрических данных [26, 27]. Однако этот рост концентрации резорурфина достаточно незначителен, и даже через длительное время после начала эксперимента колориметрические характеристики раствора не имеют существенного изменения, и он остается синим. Такая интерпретация поддерживается наблюдением за динамикой отклика самого разбавленного раствора лактобактерий (1/11), который демонстрирует практически эквивалентный рост до момента, когда бактерии вступают в активную фазу роста (примерно через 65 часов) и их количества достаточно для увеличения заметной динамики жизнедеятельности. Данное сравнение будет обсуждено ниже.

Разведения (1/10) и (1/9) показывают практически идеальное наложение экспериментальных значений на кривую химической кинетики восстановления резазурина и кривую роста, соответствующую решению уравнения Ферхюльста в пределах разрешения графика, и выход на стационарное значение к моменту окончания эксперимента. Переход резазурина в резорурфин в данных случаях наглядно виден по насыщенному розовому цвету на фотографиях соответствующих ячеек (см. рис. 2, *a*) на момент выхода кривых на насыщение (см. рис. 2, *b*).

С другой стороны, (1/8), (1/7) и (1/6) ложатся на логистическую кривую только до определенного момента. Последняя (равно как и функция (11)) демонстрирует насыщение, в то время как фотометрические данные показывают возникновение новой фазы более быстрого роста. Он соответствует быстрому просветлению среды в ячейках за счет реакции восстановления резорурфина до дигидрорезорурфина, что приводит к значительному разбавлению среды прозрачным продуктом. Это также наглядно заметно на рис. 2, *a*.

Наконец, в лунках (1/5)–(1/1) выход на насыщение фотометрического сигнала проходит настолько быстро, что двухэтапность процесса не просматривается. Фактически при таких количествах катализаторов (метаболитов жизнедеятельности лактобактерий) реакции восстановления идут параллельно, и происходит быстрое просветление раствора. Более того, при начальных разведениях (1/4)–(1/2) видно уменьшение фотометрического сигнала вместо его стационарности. Это связано с помутнением среды и уменьшением интенсивности светопропускания раствора из-за появления большого количества лактобактерий, то есть с прямым изменением оптической плотности, не связанным уже с химическими индикаторными процессами (среда остается прозрачной).

В пределах разрешения графиков рис. 2, *b* кривая (16) и сдвинутая кривая (11) хорошо фитуют данные, но при этом видно, что значения насыщения существенно (примерно в полтора раза) выше, чем для случая порозовевших ячеек. Однако данные случаи находятся за пределами области применения модели, оперирующей только с одной необратимой реакцией, и далее не будут рассматриваться.

Следует отметить, что видимое разрешение на графиках рис. 2, *b* достаточно грубое и детальное обсуждение вопроса о воспроизведении сигмоидальных кривых роста фотометрических кривых решением модельных уравнений требует представления данных более чувствительных к типу кинетических кривых. Данный анализ представлен на рис. 3. Он основан на линеаризации кривой, заданной функцией (16) в полулогарифмическом представлении

$$-\ln \left(\frac{K - d}{y/y_0 - d} - 1 \right) = r't_m - r't, \quad (17)$$

где сдвиг получившейся прямой $r't_m$ определяется начальными условиями, а наклон r' задает скорость роста, соответствующую логистическому уравнению.

Рис. 3 демонстрирует соответствующий вид данных и их аппроксимаций (на интервале регрессии) для тех лунок, для которых не наблюдается быстрого обесцвечивания за счет второго этапа реакции. В данном представлении существенная приближенность регрессии логистической функцией (16) становится явно заметной: даже в центральной области наилучшего приближения маркеры, соответствующие экспериментальным данным, расположены волнообразно вокруг фитующей прямой. На начальном же и конечном участках интервала отклонения пути расположения маркеров от прямой становятся весьма существенными. При этом сплошные линии, отвечающие решению (11), принимающему во внимание оба процесса — популяционного роста и химической реакции индикатора — аккуратно проходят по существенно нелинейной кривой расположения экспериментальных данных.

Следует отметить, что даже сходный одинаковый средний наклон аппроксимирующих линейных участков не свидетельствует об одинаковой скорости популяционного роста, определенного двумя методами, хотя и приводит к одинаковым качественным заключениям. Прежде всего, следует обратить внимание на кривые (0) и (1/11), для которых величина наклонов, во-первых, меньше, чем для прочих, а во-вторых, она практически совпадает для контроля и наибольшего разведения. Это свидетельствует о том, что выдвинутое выше предположение, что повышение фотометрического сигнала для этих ячеек связано не с размножением лактобактерий, а с возможными побочными химическими реакциями. Дополнительный аргумент состоит в том, что для случая (1/11) в конечные моменты времени ($t > 65$ ч) начинается отклонение от прямой вверх, связанное с превышением численностью лактобактерий порога нечувствительности и соответственным влиянием на конверсию резазурина метаболических процессов в жизнеспособных клетках. Дальнейшие зависимости соответствуют ситуации, когда индикаторную реакцию катализируют именно метаболические процессы при росте популяции микроорганизмов, а не сопутствующие вещества в растворе, что видно по тому, что три зависимости — для начальных разведений (1/10), (1/8), (1/7) — проявляют приблизительно одинаковую характерную скорость роста, определяемую близким наклоном прямолинейных участков в полулогарифмических координатах. Параллельный же сдвиг между ними отвечает различным начальным условиям, что полностью соответствует

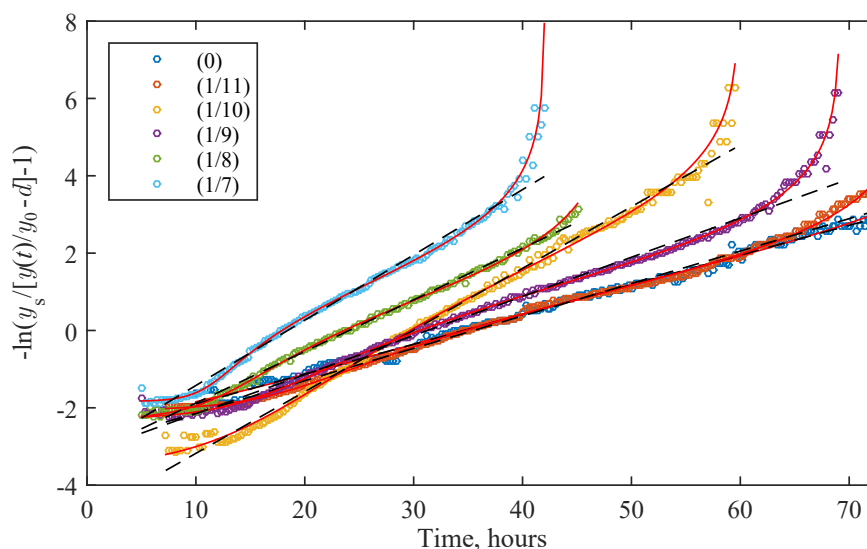


Рис. 3. Экспериментальные данные (точки); химическая кинетика резазурина (сплошная линия); уравнение Ферхюльста (прерывистая линия) (цвет онлайн)

Fig. 3. Experimental data (circles); chemical kinetics of resazurin (solid line); Verhulst equation (dashed line) (color online)

обсуждаемым кинетическим моделям. Меньший наклон для разведения (1/10) может быть связан с индивидуальными особенностями той части культуры, которая попала в данную ячейку (по соответствующему графику на рис. 2, *b* также видна специфика более медленного роста, все еще не приводящего за 72 ч к началу перехода к дигидрорезорурфиновому этапу реакции).

Однако величина скорости популяционного роста сама по себе различна по данным модели Ферхюльста и более полной популяционно-химической модели. Модель Ферхюльста дает $r' = (0.15 \pm 0.018) \text{ ч}^{-1}$, в то время как модель (11) дает значения $r_{(1/10)} = 0.21 \text{ ч}^{-1}$, $r_{(1/8)} = 0.33 \text{ ч}^{-1}$, $r_{(1/7)} = 0.67 \text{ ч}^{-1}$ при степенных показателях $(kK/r)_{(1/10)} = 0.52$, $(kK/r)_{(1/8)} = 0.13$ и $(kK/r)_{(1/7)} = 0.11$. Таким образом, можно видеть, что эти показатели существенно отличаются от единицы, то есть модель, учитывающая факт регистрации химического процесса, а не размножения микроорганизмов непосредственно, неэквивалентна решению уравнения Ферхюльста, несмотря на сходство динамики в области точки перегиба фиксируемой кривой роста (но существенное различие на этапах начала и конца роста индикаторной кривой конверсии резазурина в резорурфин).

Различие в скоростях популяционного роста для различных начальных разведений может быть обусловлено рядом факторов. Одним из них является различная концентрация питательной среды, которая добавлялась вместе с культурой и разводилась в той же пропорции, то есть концентрация в расчете на объем ячейки планшета различалась, возрастая от ячейки (1/10) до (1/7). Более существенным фактором является возможная зависимость от начальной концентрации лактобактерий в силу влияния последней на продолжительность лаг-фазы динамики роста [28]. Современные исследования [29, 30] аргументируют существование необходимости учета эффекта кворума, следствием которого является меньшая характерная скорость роста культуры за счет продления лаг-фазы при малых концентрациях колониеобразующих единиц, что соответствует увеличению констант от $r_{(1/10)}$ до $r_{(1/7)}$.

Вместе с тем значения этих констант соответствуют интервалу величин, найденных в ряде известных работ, обращавшихся к непосредственному подсчету колониеобразующих единиц лактобактерий или же оптической плотности их взвеси, предварительно откалиброванной на значения при прямом подсчете. Для температурного интервала 20...30°C, соответствующего нашему эксперименту, параметр роста варьируется в интервале 0.30...0.65 ч^{-1} [31, 32] в зависимости от условий среды роста, что соответствует $r_{(1/8)}$ и $r_{(1/7)} = 0.67$ с учетом экспериментальной погрешности. Величина $r_{(1/10)}$ находится ниже этого интервала, но с учетом отмеченного выше эффекта снижения скорости роста при больших начальных разведениях и вариабельности роста в целом рассогласование не является критичным. Вместе с тем применение модели Ферхюльста дает существенно заниженное значение, что свидетельствует в пользу релевантности именно модифицированного подхода.

Таким образом, разработка более детальных моделей, учитывающих многообразие популяционных, биофизических и химических процессов, открывает перспективы для более ясного понимания всего комплекса взаимосвязанных процессов, обуславливающих видимый индикаторный отклик на рост культуры микроорганизмов.

Заключение

Таким образом, основной вывод данной работы заключается в привлечении внимания к необходимости при использовании индикаторных сред четко разделять наблюдаемую кинетику измерения регистрируемого сигнала и истинную кинетику популяционного роста. Несмотря на то, что получаемые данные могут быть аппроксимированы классическими сигмоидальными кривыми (такими как зависимости Ферхюльста, Гомперца и т. п.), как минимум часть параметров

данных кривых, в особенности характерная константа роста, может не соответствовать реальной скорости роста микроорганизмов в силу того, что процесс включает в себя не только увеличение концентрации последних, но и непосредственно химическую реакцию трансформации реагента. В особенности это существенно для случая быстрорастущих культур, для которых скорости обоих процессов сопоставимы. Результатом этого является необходимость оперировать моделью, включающей одновременно в себя нелинейность системы и нестационарность ее параметров.

В данной работе путем последовательного применения описанной методологии получены зависимости решений типа Гомперца (двойная экспоненциальная зависимость) и Ричардса (обобщенный логистический рост) как кинетические кривых, соответствующих экспоненциальному и простому логистическому росту популяции в индикаторной среде. При этом зависимость обобщенного логистического роста может быть на достаточно протяженном интервале времени редуцирована к логистическому росту при надлежащем выборе соотношения между кинетическими константами размножения популяции, химической реакцией индикатора и емкостью среды. Возможность подобного согласования объясняет известную эмпирически прямую пропорциональность между концентрацией резорфина и количеством колониеобразующих единиц при резазуриновом тесте микобактериальных культур и обосновывает рекомендации по строгому соблюдению условий проведения данного теста специфичных для различных видов и штаммов микобактерий. Отклонение же от полученного безразмерного критерия приводит к необходимости использования более общей функциональной зависимости, что продемонстрировано на практическом примере обработки данных по тестированию роста быстрорастущей культуры лактобактерий.

References

1. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. In: Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
2. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and Resazurin. In: Gilbert DF, Friedrich O, editors. Cell Viability Assays: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press; 2017. P. 1–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1.
3. Kim D-M, Yoo S-M. Colorimetric systems for the detection of bacterial contamination: Strategy and applications. Biosensors. 2022;12(7):532. DOI: 10.3390/bios12070532.
4. Zhang X, Jiang X, Hao Z, Qu K. Advances in online methods for monitoring microbial growth. Biosensors and Bioelectronics. 2019;126:433–447. DOI: 10.1016/j.bios.2018.10.035.
5. Monod J. The growth of bacterial cultures. Annual Review of Microbiology. 1949;3:371–394. DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.
6. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology. 1990;56(6):1875–1881. DOI: 10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990.
7. Peleg M, Corradini MG. Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011;51(10):917–945. DOI: 10.1080/10408398.2011.570463.
8. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. Journal of Immunological Methods. 1986;94(1–2):57–63. DOI: 10.1016/0022-1759(86)90215-2.
9. Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Applied and Environmental Microbiology. 1991;57(8):2351–2359. DOI: 10.1128/aem.57.8.2351-2359.1991.
10. Lonsdale CL, Taba B, Queralto N, Lukaszewski RA, Martino RA, Rhodes PA, Lim SH. The

- use of colorimetric sensor arrays to discriminate between pathogenic bacteria. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e62726. DOI: 10.1371/journal.pone.0062726.
11. Worth RM, Espina L. ScanGrow: Deep learning-based live tracking of bacterial growth in broth. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:900596. DOI: 10.3389/fmicb.2022.900596.
 12. Thanasirikul C, Patumvan A, Lipsky D, Bovonsombut S, Singjai P, Boonchieng E, Chitov T. Rapid assessment and prediction of microbiological quality of raw milk using machine learning based on RGB-colourimetric resazurin assay. *International Dairy Journal*. 2023;146:105750. DOI: 10.1016/j.idairyj.2023.105750.
 13. Lindstrom JE, Barry RP, Braddock JF. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998;30(2):231–239. DOI: 10.1016/S0038-0717(97)00113-2.
 14. Gómez-Acata RV, Neria-González MI, Aguilar-López R. Robust software sensor design for the state estimation in a sulfate-reducing bioreactor. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2016;50(1):67–75. DOI: 10.1134/S0040579516010036.
 15. Lavrova AI, Dogonadze MZ, Sychev AV, Manicheva OA, Postnikov EB. Ensemble density-dependent synchronization of mycobacterial growth: BACTEC MGIT 960 fluorescence-based analysis and mathematical modelling of coupled biophysical and chemical processes. *AIMS Microbiology*. 2022;8(2):208–226. DOI: 10.3934/microbiol.2022017.
 16. Njoku DI, Guo Q, Dai W, Chen JL, Mao G, Sun Q, Sun H, Peng Y-K. The multipurpose application of resazurin in micro-analytical techniques: Trends from the microbial, catalysis and single molecule detection assays. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023;167:117288. DOI: 10.1016/j.trac.2023.117288.
 17. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*. 2012;12(9):12347–12360. DOI: 10.3390/s120912347.
 18. Candeias LP, MacFarlane DPS, McWhinnie SLW, Maidwell NL, Roeschlaub CA, Sammes PG, Whittlesey R. The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 1998;(11):2333–2334. DOI: 10.1039/A806431H.
 19. Chen JL, Steele TWJ, Stuckey DC. Modeling and application of a rapid fluorescence-based assay for biotoxicity in anaerobic digestion. *Environmental Science & Technology*. 2015;49(22):13463–13471. DOI: 10.1021/acs.est.5b03050.
 20. Sychev AV, Lavrova AI, Dogonadze MZ, Postnikov EB. Establishing compliance between spectral, colourimetric and photometric indicators in Resazurin reduction test. *Bioengineering*. 2023;10(8):962. DOI: 10.3390/bioengineering10080962.
 21. Mouton JW, Vinks AA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics. *Clinical Pharmacokinetics*. 2005;44(2):201–210. DOI: 10.2165/00003088-200544020-00005.
 22. Richards FJ. A flexible growth function for empirical use. *Journal of Experimental Botany*. 1959;10(2):290–301. DOI: 10.1093/jxb/10.2.290.
 23. AlamarBlue[®] Assay [Internet]. U.S. Patent No. 5,501,959. PI-DAL1025/1100Rev 1.0. 2008. 27 p. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TlAlamarBlueRev1.1.pdf.
 24. Von Groll A, Martin A, Portaels F, da Silva PEA, Palomino JC. Growth kinetics of *Mycobacterium tuberculosis* measured by quantitative resazurin reduction assay: a tool for fitness studies. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41(2):300–303. DOI: 10.1590/S1517-83822010000200006.
 25. Sychev AV, Belenkov RN, Ukolov DN, Budaev AV, Lavrova AI, Postnikov EB. Revealing kinetics of chemical transitions in colorimetric indicators of microorganisms growth based on photometric data from a portable microbiological analyser. In: *Proc. SPIE*. Vol. 12194. *Computational Biophysics and Nanobiophotonics*. SPIE; 2022. P. 121940Z. DOI: 10.1117/12.2625794.

26. Neufeld BH, Tapia JB, Lutzke A, Reynolds MM. Small molecule interferences in Resazurin and MTT-based metabolic assays in the absence of cells. *Analytical Chemistry*. 2018;90(11):6867–6876. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b01043.
27. Fukushima RS, Weimer PJ, Kunz DA. Photocatalytic interaction of Resazurin N-oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture media. *Anaerobe*. 2002;8(1):29–34. DOI: 10.1006/anae.2001.0405.
28. Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 1994;23(3–4):277–294. DOI: 10.1016/0168-1605(94)90157-0.
29. Rickett LM, Pullen N, Hartley M, Zipfel C, Kamoun S, Baranyi J, Morris RJ. Incorporating prior knowledge improves detection of differences in bacterial growth rate. *BMC Systems Biology*. 2015;9:60. DOI: 10.1186/s12918-015-0204-9.
30. Atolia E, Cesar S, Arjes HA, Rajendram M, Shi H, Knapp BD, Khare S, Aranda-Díaz A, Lenski RE, Huang KC. Environmental and physiological factors affecting high-throughput measurements of bacterial growth. *MBio*. 2020;11(5):e01378-20. DOI: 10.1128/mBio.01378-20.
31. Giraud E, Lelong B, Raimbault M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991;36(1):96–99. DOI: 10.1007/BF00164706.
32. da Silva APR, Longhi DA, Dalcanton F, de Aragão GMF. Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2018;61: e18160159. DOI: 10.1590/1678-4324-2018160159.



Сычев Александр Владимирович — родился в Железногорске Курской области (1996). Окончил с отличием магистратуру естественно-географического факультета Курского государственного университета по направлению «Химия» (2020). С 2020 года — аспирант кафедры физики и нанотехнологий. Область научных интересов — биофизика, электронная и оптическая микроскопия, физика жидкости, физическая химия.

Россия, 305000 Курск, Радищева, 33
 Курский государственный университет
 E-mail: sychev_av@kursksu.ru
 ORCID: 0000-0002-6116-6915
 AuthorID (eLibrary.Ru): 1163621



Постников Евгений Борисович — родился в Курске (1977). Окончил Курский государственный педагогический университет (1998). Защитил диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук (2000) и доктора физико-математических наук (2011). Заведующий отделом теоретической физики НИЦ физики конденсированного состояния и профессор кафедры физики и нанотехнологий Курского государственного университета. Область научных интересов — математическое моделирование в биофизике, транспортные процессы в сложных средах, физика жидкости.

Россия, 305000 Курск, Радищева, 33
 Курский государственный университет
 E-mail: postnikov@kursksu.ru
 ORCID: 0000-0001-7904-1881
 AuthorID (eLibrary.Ru): 137444