

# История развития одного научного направления

**В.Д.Бунин**

*EloSystem GbR, Берлин, Германия*

В статье дается краткий исторический очерк развития теоретических основ и приборного обеспечения электрооптического метода изучения бактерий. Изложены возможности применения этого метода в научных исследованиях и биотехнологическом производстве.

**Для цитирования:** Бунин В.Д. История развития одного научного направления. Бактериология. 2019; 4(1): 68–72. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-68-72

## History of one scientific direction development

**V.D.Bunin**

*EloSystem GbR, Berlin, Germany*

The article gives a brief historical sketch of the development of the theoretical foundations and instrumentation of the electro-optic method for studying bacteria. The possibilities of using this method in scientific research and biotechnological production are outlined.

**For citation:** Bunin V.D. History of one scientific direction development. Bacteriology. 2019; 4(1): 68–72. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-68-72

Семидесятые годы XX в. занимают особое место в развитии науки. Именно в это время начался экспоненциальный рост многих научных направлений. Организованный в это время ВНИИ ПМ находился в русле этого процесса. Жизненно необходимо было развитие новых методов контроля получения биопрепаратов, и все новые инициативные предложения после экспертизы активно поддерживались.

Необходимые для этого кадры в это время отбирали в институтах Академии наук. Автор этой статьи входил в состав научно-технической группы, которую В.Н.Брезгунов привел во ВНИИ ПМ из Физического института АН СССР и Института биофизики АН СССР (Пущино). Первоначально все сотрудники входили в лабораторию биохимии. И только в конце 1976 г. эта группа была преобразована в лабораторию физико-химических методов исследования микроорганизмов ВНИИ ПМ под руководством В.Н.Брезгунова. На этом этапе развития при поиске новых направлений исследований внимание привлек электрооптический метод анализа клеточных суспензий. Нельзя сказать, что это было пионерское направление в полном смысле этого слова. Теоретические основы метода начали развиваться с 1875 г., когда лорд Керр открыл электрооптический эффект в суспензии коллоидных частиц. Но, как часто бывает в науке, после открытия эффекта наступило время его забвения, которое длилось до 50-х годов прошлого века. Именно тогда появляется новая группа исследователей в Санкт-Петербургском университете во главе с Н.А.Толстым и лаборатория в Институте коллоидной химии под руководством С.С.Духина в Киеве. Позже к этому направлению присоединяется группа С.Стоилова из Института коллоидной химии,



**Бунин Виктор Дмитриевич** – доктор технических наук, руководитель лаборатории, ведущий научный сотрудник ВНИИ ПМ/ГНЦ ПМБ (1977–2007 гг.).  
Ныне – научный руководитель фирмы EloSystem GbR, Берлин, Германия.  
E-mail: vikbun@inbox.ru

София, группа R.Jennings из Великобритании и группа из Института ИБФМР АН (г. Саратов) во главе с С.Ю.Щеголевым и О.В.Игнатовым.

В развитии электрооптического метода в этих группах исследователей преобладало академическое начало, и основным объектом являлись неорганические суспендированные частицы. Бактериальная электрооптика началась с Института биофизики АН, где этим направлением руководил Ф.И.Мирошников, а одним из его научных сотрудников был В.М.Фомченков. Именно он дал начальную точку роста этого направления, начав экспериментальную работу во ВНИИ ПМ в июле 1976 г. Его первая экспериментальная установка «Луч-2» заработала в лаборатории в конце 1976 г., и тематика электрофизического анализа клеточных суспензий на долгое время стала основным направлением лаборатории физико-химических методов анализа микроорганизмов. Руководителем лаборатории с 1976 г. до 1991 г. был В.Н.Брезгунов, а затем до 2007 г. ею руководила.



Д.Е.Светогоров (слева) и В.Н.Брезгунов на итоговой конференции ВНИИ ПМ.

В развитие теоретических основ метода большой вклад внесли сотрудники лаборатории Д.Е.Светогоров и А.Л.Мазапов. Неизменным генератором идей при постановке микробиологических задач и при их решении являлся А.Г.Волошин, который до сих пор активно работает, уже в ГНЦ ПМ, в этом направлении. Вопросы биофизической направленности применения метода развивали В.М.Фомченков и С.Г.Игнатов. Развитие технического оснащения проходило с помощью С.Н.Андреева, С.В.Ананчева, С.А.Суходольского, Б.П.Каменского, Ю.Ф.Сигаева, А.Б.Есина, Н.В.Швеца.

Всего по вопросам применения электрооптического метода для решения задач мониторинга биотехнологических процессов, биодетекции микроорганизмов и вирусов было опубликовано более 130 работ, в том числе в журналах с высоким рейтингом.

Аппаратная база электрооптических исследований непрерывно совершенствовалась. Первым прибором для практических исследований был ДЭФ-1, далее – ДЭФ-2. Наконец, с появлением персональных компьютеров, появляется и серия приборов ELBIC, представители которой

до сих пор успешно работают в ИБФРМ РАН и ГНЦ ПМБ (рис. 1).

Однако путь развития аппаратной базы оказался тернистым. После разработки основ метода должен был начаться этап его широкого практического применения. И действительно, в 1983 г. прибор для электрофизического анализа попал в перечень работ ОКБ БП (Йошкар-Ола) с очень хорошим финансированием и должен был выпускаться серийно. Но все изменило постановление ЦК КПСС о реорганизации Министерства приборостроения. Новая тематика из реформируемого министерства и перекраивание бюджета обрушили планы ОКБ. Работа по электрооптическому анализатору была отложена, а потом и вовсе исключена из перечня разработок. После этого осталась надежда только на собственные силы.

Наступили сложные 1990-е годы. Методом проб и ошибок был найден первый производственный заказчик на электрооптический прибор определения жизнеспособности клеток после лиофильной сушки. Им оказалась Ставропольская биофабрика в лице начальника производства В.Заерко. Именно этот опыт внедрения и годовая эксплуатация прибора оказались решающими факторами. Они подтвердили, что электрооптический метод анализа может использоваться не только в исследовательских лабораториях с академическим интересом, но и для мониторинга реальных биотехнологических процессов.

В конце 1990-х начался новый этап развития электрооптики. Совместно с ИБФРМ РАН в рамках исследовательских проектов Международного научно-технического центра был выполнен ряд международных проектов по методу быстрой биодетекции модельных вакцинных штаммов в жидких образцах. Были разработаны опытные образцы прибора для реализации метода. Направление исследования поверхностных взаимодействий на долгое время стало главной тематикой лаборатории в ИБФМР в Саратове – научном партнере ГНЦ ПМ. Было выполнено несколько проектов по развитию методов обнаружения фагов и кинетики их взаимодействия с клетками.

В 2001 г. был подготовлен проект по электрооптическому мониторингу процессов культивирования клеток в фармацевтических производствах, который профинансировало Министерство науки Германии по европейской программе



Рис. 1. Прибор ДЭФ-2, прибор ELBIC, электрооптическая ячейка прибора ELBIC.



Рис. 2. Измерительная система анализатора EloTrace 3.0, собственно анализатор EloTrace и фото системы пробоподготовки.

«Futur». Итогом этой работы явилась разработка полностью автоматизированного прибора EloTrace, который получил инновационный приз Германии в 2005 г. Сейчас приборы этого типа используются на ряде фармацевтических и биотехнологических предприятий Европы и России при производстве биопрепаратов для сельского хозяйства, при мониторинге процессов культивирования, при масштабировании и оптимизации процессов с новыми штаммами микроорганизмов (рис. 2).

Чем же привлекает электрооптический метод анализа клеток и поверхностных взаимодействий? Это полностью автоматизированный процесс измерений, который позволяет получать профили процессов культивирования клеток по набору электрофизических и морфометрических параметров суспендированных клеток. Это также одиночные измерения жизнеспособности клеток, определение кинетики взаимодействия клеток с разнообразными агентами, включающие в себя моноклональные антитела, вирусы, разработанные методики обнаружения агентов с низкой концентрацией в исследуемых образцах. При этом простота процесса измерений и отсутствие расходных материалов сочетаются с возможностью определения как привычных параметров (абсолютной концентрации клеток, их жизнеспособности, среднего размера клеток), так и достаточно сложных интегральных характеристик клеточной популяции: показатели оптимизации процессов, ключевые точки метаболизма (Metabolic switch), профили валидации процессов культивирования и многое другое.

Электрооптический метод анализа суспендированных клеток является комбинацией целого ряда методов и технологий. Если рассматривать клетку как объект наблюдения, то мы имеем дело с несколькими последовательными стадиями процесса измерений. Электрическое поле является зондирующим воздействием, вызывающим появление на границах клеточных структур с разными электрическими свойствами индуцированных зарядов. Частота их появления совпадает с частотой электрического поля. Но одно замечательное свойство взаимодействия поля с индуцированными зарядами является принципиально важным. Поле создает заряды, и оно с ними взаимодействует. Появляется сила воздействия, пропорциональная квадрату поля. Как результат, возникают колебания клеток вокруг центра тяжести с двойной частотой электрического поля и постоянная действующая сила ориентирующего воздействия. Именно вторая компонента приводит к изменению ориентации клеток в

пространстве, которую можно количественно измерить оптически. Детали появления электрооптического эффекта пояснены на рисунке 3.

От величины индуцированных зарядов легко перейти к определению электрофизических параметров клеточных структур, что позволяет найти удельную электропроводность цитоплазмы, мембраны и клеточной поверхности. Эти параметры напрямую связаны с ионными потоками в клеточной цитоплазме и их движением через клеточную мембрану. При этом клетки не разрушаются и сохраняют все свои функциональные характеристики. Казалось бы, что такая смесь физических эффектов затруднит интерпретацию экспериментальных данных из-за многостадийности процессов. На практике все оказалось существенно проще. Изменяемые изменения оптических свойств суспензии при воздействии поля с частотой в диапазоне 400–600 кГц оказались прямо пропорциональны суммарной концентрации произведений концентрации низкомолекулярных ионов, умноженной на их подвижность. Это свойство электрооптического анализа позволяет проводить измерение электрофизических свойств по прямым измерени-

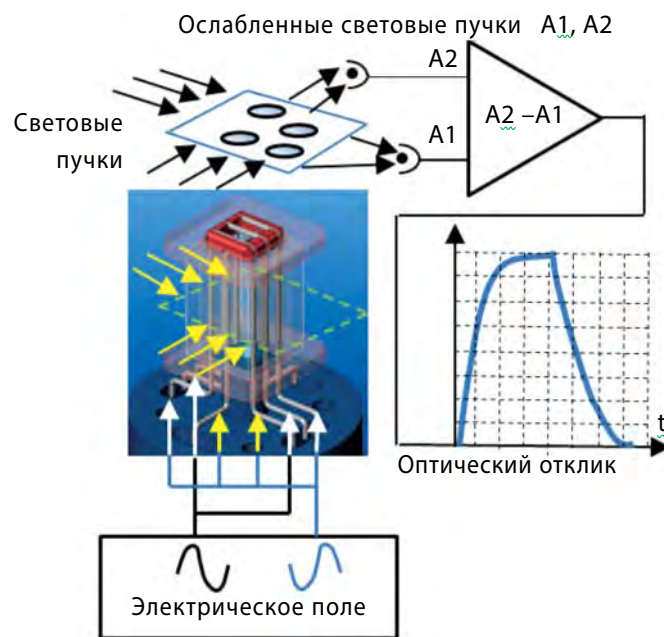


Рис. 3. Воздействие на клетки электрического поля, их ориентация и изменение оптических свойств суспензии во взаимноперпендикулярных направлениях.

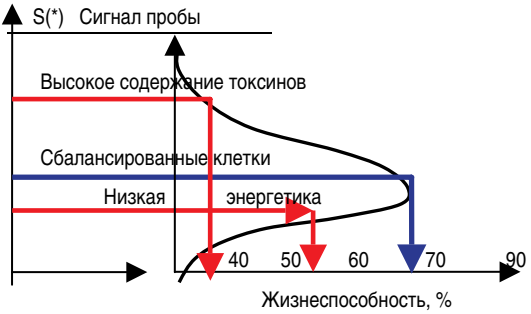
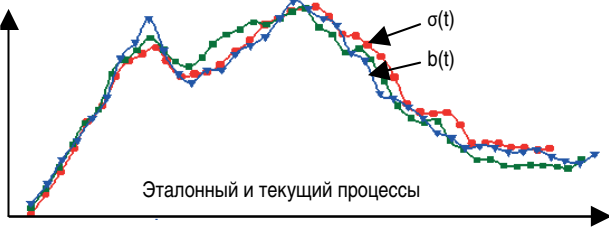
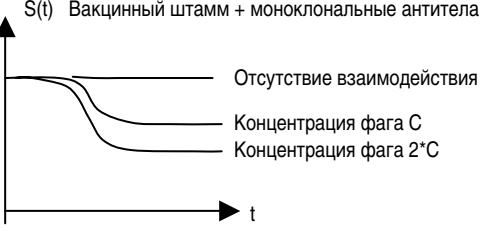
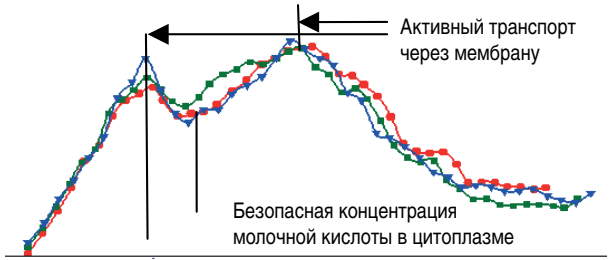
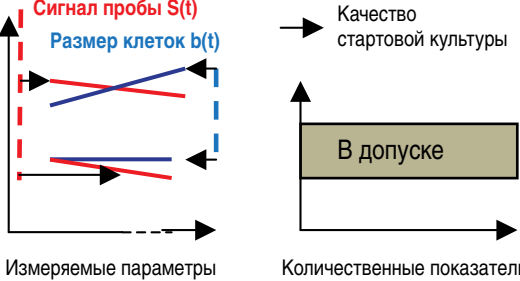


ям электрооптического сигнала на указанных частотах электрического поля. Более сложный процесс анализа поверхностной электропроводности клеток использует сопоставительный анализ частотных зависимостей электрооптических измерений. Определение активности транспорта через мембрану осуществляется по набору сигналов на разных частотах.

На наших глазах электрооптика клеточных суспензий прошла путь от примитивных представлений о «большой информативности результатов измерений» с множеством детских болезней пробных экспериментов до совершенного метода мониторинга биотехнологических процессов.

Путь науки тернист и извилист. Развитие электрооптического метода не явилось исключением. Наряду с позитив-

ным движением возникали ложные ответвления исследований. Оказались избыточными диполофоретические измерения, так как они не приносили радикально новых данных. Было разработано математически сложное решение обратных задач восстановления распределения размеров клеток, но оно оказалось неинформативным. Форма распределения размеров клеток по размерам оказалась удивительно стабильной для различных стадий процесса периодического культивирования, а вот определение по релаксационным кривым среднего размера клеток и вариабельность этого параметра нашли широкое применение при мониторинге клеточного метаболизма. Кроме этого, отсутствие понимания многопараметрических свойств электрооптического сигнала приводило к появлению артефактов. Их пытались объ-

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Определение абсолютной концентрации клеток в профиле культивирования и одиночных пробах</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Измерение оптической плотности суспензии <math>D_0</math></li> <li>2. Определение среднего размера клеток <math>b</math> по релаксационной кривой электрооптического сигнала <math>S(t)</math></li> <li>3. Расчет усредненного сечения рассеяния клеток <math>A</math> (b) по сигналу <math>S(t)</math>.</li> <li>4. Определение абсолютной концентрации клеток <math>C = D_0 * A</math> (b)</li> </ol> | <p>Определение относительного числа жизнеспособных клеток в образцах</p>                                                              |
| <p>Относительная погрешность <math>&lt;\pm 2\%</math></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <p>Относительная погрешность <math>&lt; \pm 3\%</math></p>                                                                                                                                                               |
| <p>Валидация процесса культивирования по стандартным профилям электропроводности <math>\sigma(t)</math> и среднего размера клеток <math>b(t)</math></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <p>Обнаружение специфических реакций связывания меток и неспецифического связывания вирусов макрофагов с клеточной поверхностью</p>  |
| <p>Относительная погрешность <math>&lt;\pm 3\%</math></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <p>Относительная погрешность <math>&lt;\pm 5\%</math></p>                                                                                                                                                                |
| <p>Определение положения metabolic switch, фаз споруляции активного транспорта, переключения периодического культивирования в непрерывный управляемыми воздействиями и оптимального времени культивирования штаммов</p>  <p><i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20205</p>                                                                                                                                                                                      | <p>Предсказание качества стартовой культуры</p>                                                                                      |
| <p>Точное определение особых точек и времени управляемого воздействия на процесс</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Выбор решения об использовании культуры в коридоре <math>&lt;\pm 5\%</math></p>                                                                                                                                       |

яснить с использованием экзотических предположений. А в сущности, это было изменение основных конечных параметров из-за неконтролируемых параметров процесса измерений электропроводности и температуры суспензии, апертуры приемника и множества других причин.

Несомненной удачей была разработка метода измерений оптического сигнала с искусственно созданными аппаратно-программными фильтрами. Это позволило снизить минимальную концентрацию клеток в образцах до нескольких сотен миллилитров или получать данные со сверхнизким уровнем шумов. Непревзойденными оказались параметры разработанной системы автоматической пробоподготовки испытуемых образцов с обессоливанием образцов за 2–3 минуты на 3–4 порядка.

Наиболее интересные приложения электрооптического анализа клеток и клеточных взаимодействий были сведены в таблице.

Электрооптический анализ суспендированных клеток прошел динамичный путь от развития метода до множества прикладных применений на базе серийно выпускаемых автоматизированных приборов, что происходит нечасто. В этом большая заслуга руководства института ВНИИ ПМ, далее ГНЦ ПМ и энтузиазма разработчиков этого метода, аппаратуры и программного обеспечения.

## Литература

1. Стоилов С, Шилов ВН, Духин СС, Соколов С, Петканчин И. Электрооптика коллоидов. Киев: Наукова думка; 1977.
2. Мирошиков АИ, Фомченков ВМ, Иванов АЮ. Электрофизический анализ и разделение клеток. М.: Наука; 1986.
3. Брезгунов ВН, Бунин ВД, Попов ВГ, Иванов НВ, . Анализ изменений электрофизических и морфометрических параметров в период роста и споруляции у *Bac. thuringiensis*. Микробиология. 1984;53(3):381-386.
4. Брезгунов ВН, Бунин ЗД, Швец НВ, Волошин АГ, Светогоров ДЕ, Щепкина АН. Определение электрооптическим методом числа неповрежденных бактериальных клеток после экстремальных воздействий. Микробиология. 1985;54(4):616-620.
5. Shchyogolev S, Khlebtsov N, Bunin V, Sirota A. Inverse problems of spectroturbidimetry of biological disperse systems with random and ordered particles orientation Proc. SPIE 2082, 167-176, 1994.
6. Игнатов СГ, Волошин АГ, Бунин ВД, Дятлов ИА. Электрооптический анализ в микробиологии. Серпухов: ФГУН ГНЦ ПМБ; 2007, 159 с.
7. Волошин АГ, Бунин ВД, Веревкин ВВ, Игнатов СГ. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий. Бактериология. 2017;2(4):46-49.
8. Bunin VD. Electrooptical analysis of a suspension of cells and its structure, Enciclopedia of Surface and Colloid Science. NY: Dekker Publ., 2002, pp. 2032-2043.
9. Angersbach A, Bunin V, Ignatov O. Electrooptical analysis of bacterial cells. In: Molecular and Colloidal Electro-optics. Stoylov and Stoimenova (eds.). Chapter 13. London, New York: Taylor&Francis, Boca Raton, 2006, p. 307-326.
10. Bunin VD, Ignatov OV, Guliy OI, Voloshin AG, Dykman LA, O'Neil D, Ivnitski D. Studies of *Listeria monocytogenes*-antibody binding using electro-orientation. Biosens Bioelectron. 2004;19(2):1759-1761.
11. Guliy O, Bunin V, Korzheneviche V, Ignatov O. Electrooptical analysis of Microbial Cell Suspension for Determination of Antibiotic Resistance. Cell Biochem Biophys. 2016 Dec;74(4):537-544. DOI: 10.1007/s12013-016-0762-5
12. Guliy OI, Kanevskiy MV, Fomin AS, Staroverov SA, Volkov AA, Bunin VD. Transmissible gastroenteritis virus detection by an electrooptical sensor. Applied Microbiology, 2018