

Усовершенствование лабораторных методов определения общего микробного числа с использованием хемилюминесцентных реакций в организованных молекулярных системах

***Т.В. Янькова, П.В. Мельников, А.Ю. Александровская, Н.К. Зайцев**

МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова), Российская Федерация, 119571, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

**Адрес для переписки: Янькова Татьяна Вячеславовна. E-mail: yankovatatyana@yandex.ru*

Поступила в редакцию 22 октября 2019 г., после доработки – 5 декабря 2019 г.

Хемилюминесцентный метод определения микроорганизмов, основанный на определении аденозинтрифосфата (АТФ), который содержится в клетках бактерий, в целом состоит из трех стадий: пробоподготовки, устраняющей мешающее влияние матрицы образца, аналитической реакции и обработки полученного сигнала. Данная работа направлена на совершенствование второго этапа анализа – оптимизацию условий проведения хемилюминесцентной реакции. АТФ инициирует хемилюминесценцию люминола, интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации АТФ. Нами были оптимизированы условия проведения данной хемилюминесцентной реакции для определения общего микробного числа (ОМЧ) в водных средах. Для этого проведено сравнение двух хемилюминесцентных реагентов: люминола и его гидрофобного аналога N-октиллюминола, который способен образовывать мицеллы. Переход к хемилюминесцентной системе на основе N-октиллюминола позволил увеличить чувствительность метода в 5.5 раз за счет микроконцентрирования аналита в ядре собственных мицелл. Нами было определено и обсуждено влияние неионогенных поверхностно-активных веществ на хемилюминесцентный способ определения бактерий. При этом выявлено, что добавление неионогенных поверхностно-активных веществ ухудшает аналитический сигнал за счет уменьшения локальной концентрации АТФ в мицеллах. Для аналитических систем, основанных на окислении люминола и N-октиллюминола, определены показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Применение разработанной хемилюминесцентной системы позволило существенно улучшить методику определения ОМЧ с переходом от качественного определения микроорганизмов к количественному измерению в диапазоне от 4×10^5 до 1×10^7 КОЕ/мл. При этом погрешность определения была снижена с 80 до 26 %.

Ключевые слова: хемилюминесценция, мицеллярные системы, люминол, аналог люминола, общее микробное число, поверхностно-активные вещества

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control],], 2020, vol. 24, no. 1, pp. 40-47

DOI: 10.15826/analitika. 2020.24.1.001

Improvements of laboratory methods for determining the microbial count using chemiluminescent reactions in organized molecular systems

***T.V. Yankova, P.V. Melnikov, A.Yu. Alexandrovskaya, N.K. Zaytsev**

MIREA – Russian Technological University, Institute of Fine Chemical Technology 86 Vernadsky Avenue, Moscow, 119571, Russian Federation

**Corresponding author: Tatyana V. Yankova, E-mail: yankovatatyana@yandex.ru*

Submitted 22 October 2019, received in revised form 05 December 2019

The chemiluminescent method for the determination of microorganisms based on the determination of adenosine triphosphate (ATP), which is contained in bacterial cells, generally consists of three stages - sample preparation eliminating the interfering effect of the sample matrix, analytical reaction and processing of the received signal. Current work is aimed at improving the second stage of the analysis - the optimization of the conditions for chemiluminescent reactions. ATP contained in bacteria initiates chemiluminescence of luminol, the intensity of which is directly proportional to the concentration of ATP. We have optimized the conditions for this chemiluminescent reaction to determine the total viable count (TVC) in aqueous media. Two chemiluminescent reagents were compared for this purpose: luminol and its hydrophobic analog N-octyl luminol, which is capable of forming micelles. The introduction of N-octyl luminol-based chemiluminescent system made it possible to increase the sensitivity of the method by a factor of 5.5 due to the microconcentration of the analyte in the nucleus of its own micelles. We have determined and discussed the effect of nonionic surfactants on the chemiluminescent method for determining the bacteria. It was found that the addition of nonionic surfactants degrades the analytical signal by reducing the local concentration of ATP in micelles. The accuracy, correctness, repeatability and intralaboratory precision were determined for the analytical systems based on the oxidation of luminol and N-octyl luminol. The use of the developed chemiluminescent system allowed us to significantly improve the method for the determination of TVC with the transition from the qualitative determination of microorganisms to the quantitative measurement in the range of 4×10^5 to 1×10^7 CFU/ml. At the same time, the error was reduced from 80% down to 26%.

Key words: chemiluminescence, micellar systems, luminol, luminol analogue, total viable count, surfactants

ВВЕДЕНИЕ

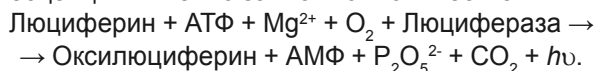
Загрязнение патогенами питьевых и сточных вод и дальнейшая передача инфекционных заболеваний через загрязненную воду представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения во всем мире. Своевременное обнаружение и количественное определение микроорганизмов в воде является ключевым элементом в решении этой проблемы. Основным параметром, характеризующим бактериальное загрязнение, является общее микробное число (ОМЧ). ОМЧ – это количественный показатель, отражающий общее содержание мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды [1].

Существует несколько способов для определения ОМЧ [2]. Для анализа воды обычно используют метод посева культуры на питательную среду [3]. Это связано с его простотой реализации, экономической эффективностью и способностью обнаруживать живые микробные клетки. Данный метод является достаточно точным, однако время измерения составляет порядка 28 часов и требует специфического лабораторного оборудования. Другим чрезвычайно полезным аналитическим методом для мониторинга, количественного определения и характеристики микроорганизмов в водных экосистемах является проточная цитометрия [4-5]. Дорогостоящее оборудование и невозможность проведения анализа на месте отбора проб значительно ограничивают сферу применения метода. Биосенсоры предоставляют многообещающую альтернативу для непосредственного определения патогенных микроорганизмов при мониторинге окружающей среды [6-7]. Биосенсоры – это аналитические устройства, которые объединяют биологический чувствительный элемент с какой-либо формой преобразователя сигнала, способного обеспечивать количественный аналитический сигнал [8]. Основным недостатком данного подхода является нестабильность чувствительного

элемента, приводящая к необходимости частой градуировки сенсора. Микроорганизмы также можно определить с использованием методик, основанных на масс-спектрометрии MC MALDI-TOF [9-10]. Эта система может идентифицировать микробы как на уровне вида, так и на уровне подвида за считанные минуты, однако требует высоких затрат на покупку оборудования. Методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) часто используют в качестве метода быстрого обнаружения патогенов в воде благодаря своей специфичности, чувствительности и применимости ко всем микроорганизмам [11]. Однако этот метод имеет важное ограничение – невозможность количественного определения результатов.

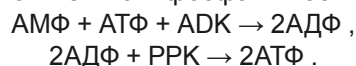
Сейчас большую популярность набирает хемилуминесцентный метод определения микроорганизмов, основанный на определении аденозинтрифосфата (АТФ), который содержится в клетках бактерий. Это экспрессный метод, не требующий дорогостоящего оборудования и сложной пробоподготовки, при этом анализ можно проводить непосредственно на месте отбора проб. В целом процедура состоит из трех стадий – пробоподготовки, которая устраняет мешающее влияние матрицы образца, аналитической реакции и обработки полученного сигнала.

Существует две хемилуминесцентные системы для определения ОМЧ, основанные на реакции ферментативного окисления люциферина и химического окисления люминола. В работах [12-14] использовали хемилуминесцентную реакцию люциферин-люцифераза для определения АТФ бактерий. АТФ катализирует биолуминесценцию люциферазы, при этом интенсивность хемилуминесценции линейно зависит от количества АТФ:



В работе [12] определили АТФ в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-10} М, что отвечает диапазону от 10^3 до 10^4 КОЕ/мл, соответственно. Уменьшение пре-

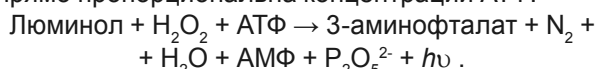
дела определения возможно, например, за счет преобразования аденозинмонофосфата (**АМФ**) и АТФ в аденозиндифосфат (**АДФ**) с помощью аденилаткиназы (**АДК**), а затем перевода АДФ в АТФ под воздействием полифосфаткиназы (**РПК**) [15]:



Таким образом, удается понизить предел определения, однако значительно увеличивается время пробоподготовки (2 часа) и общее время анализа, соответственно.

Для стабилизации АТФ проводят его экстракцию бензалконием хлоридом (**БАХ**) [16], однако последний ингибирует люциферазу, понижая эффективность биолюминесценции. Введение в аналитическую систему липосом позволяет связать БАХ, тем самым препятствуя ингибированию хемиллюминесцентной реакции [16]. Переход к организованным молекулярным системам на основе липосом позволил улучшить пределы обнаружения на порядок.

В работе [17] для хемиллюминесцентного определения ОМЧ используют реакцию люминола с пероксидом водорода. АТФ инициирует хемиллюминесценцию люминола, интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации АТФ:



По кинетике данной реакции можно определить принадлежность микроорганизмов к бактериям, грибам или дрожжам [18]. В ряду грибы – дрожжи – бактерии время выхода интенсивности хемиллюминесценции на максимум увеличивается. Изменение кинетики реакции связано с морфологией и особенностями биохимических систем их клеток. Однако за счет большой погрешности анализа (~80 %) количественное определение ОМЧ данным способом невозможно.

В работе [19] для точного определения ОМЧ в речных водах усовершенствовали пробоподготовку. Для устранения влияния химического состава воды, микропланктона и микровзвесей проводят измерение хемиллюминесценции раствора после тонкой фильтрации и после ультрафильтрации через трековые мембраны. Таким образом, удалось полностью исключить влияние матрицы на хемиллюминесцентную реакцию, что уменьшило погрешность анализа.

Ранее в своих работах мы исследовали хемиллюминесцентную реакцию окисления люминола и его аналогов в мицеллярных средах. Мицеллярная среда может дать дополнительную возможность для исследования механизма хемиллюминесцентных реакций за счёт эффекта микроконцентрирования и разделения субстрата и промежуточных продуктов, а также для управления хемиллюминесцентными реакциями, прежде всего с целью повышения их чувствительности и расширения круга анализируемых объектов, например, для уменьшения влияния аналитической матрицы или совмещения компонентов с ограниченной взаимной растворимостью. Так как

люминол в мицеллярном растворе локализуется в водной фазе [20], для того, чтобы гарантировать локализацию хемиллюминесцентного субстрата в мицеллярной фазе, нами разработана методика синтеза N-октиллюминола – гидрофобного аналога люминола [21]. При этом N-октиллюминол способен образовывать собственные мицеллы, а добавление неионогенного поверхностно-активного вещества (**НПАВ**) к хемиллюминесцентной системе приводит к повышению эффективности хемиллюминесценции [22].

Данная работа направлена на совершенствование второго этапа аналитической методики – оптимизацию условий проведения хемиллюминесцентной реакции. Для этого исследовали интенсивность хемиллюминесцентных реакций люминола и N-октиллюминола при взаимодействии с бактериями *E. coli* в присутствии и отсутствии НПАВ (Тритон X100) с целью уменьшения погрешности анализа существующей методики определения ОМЧ [18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

N-октиллюминол $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ синтезировали по методике, описанной в [21]. Люминол $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$, 98.8 % (Applichem, США), натрия гидроксид NaOH, «х.ч.» (ЛенРеактив), пероксид водорода H_2O_2 , 42.5 % (МосХимТорг, Россия), Тритон X-100 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{10}$, «ч.д.а.» (Sigma-Aldrich), гипохлоран-3 NaClO, 3.25 % (Omega dent), пептон мясной (ПанЭко, Россия), дрожжевой экстракт (ПанЭко, Россия), глюкоза (декстроза) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, «ч.д.а.» (ПанЭко, Россия), хлорид натрия NaCl, «ч.д.а.» (ПанЭко, Россия) использовали без дополнительной очистки. Деионизированную воду получали пропусканием воды через систему очистки воды Аквалаб AL Double (АО «НПК Медиана-Фильтр», РФ). Качество воды контролировали с помощью кондуктометра «Эксперт-002» (ООО «Эконикс-Эксперт», РФ) с датчиком наливного типа. Удельная электропроводность использованной деионизированной воды составляла менее 1 мкСм/см.

Культивирование: состав сред, тип организмов

Для нашего эксперимента была выбрана чистая культура факультативно-анаэробных бактерий *Escherichia coli DH5-Alpha (E. coli)*. Использованный штамм *E. coli* являлся непатогенным. Бактерии *Escherichia coli DH5-Alpha* были выбраны в качестве модельной системы, однако данная методика подходит для определения всех микроорганизмов, т.к. они содержат в себе АТФ, которая инициирует хемиллюминесцентную реакцию люминола.

Культивирование бактерий проводили в течении трех суток при 28 °С в жидкой микробиологической среде состава, г/л: пептон – 4.0, дрожжевой экстракт – 2.5, глюкоза – 1.0, хлорид натрия – 1.0 [23].

Прирост биомассы в жидкой среде оценивали с использованием классических микробиологических методов: спектрофотометрический – по величине оптической плотности при длине волны 660 нм на спектрофотометре Эксперт-003 (ООО «Эконикс-Эксперт», РФ); оптический подсчет клеток проводили в камере Горяева при увеличении 1200.

Перед приготовлением анализируемых растворов, бактерии трижды отмывали от питательной среды раствором 0.9 % NaCl. Растворы (в 0.9 % NaCl) с различной концентрацией клеток *E. coli* готовили последовательным разбавлением.

Методика измерения

Для детектирования хемилюминесценции использовали экспериментальный образец хемилюминометра, ООО «Эконикс-Эксперт», РФ, снабженный 4 датчиками (кремниевые твердотельные фотоэлектронные умножители), работающими в режиме счета числа квантов и расположенными в разных положениях относительно измерительной ячейки. При измерении их показания суммировались. Введение реагентов в ячейку производили после установления фоновой интенсивности света, не превышающей 100 квант/с [21].

0.5 мл раствора *E. coli* помещали в ячейку, представляющую собою прозрачную стеклянную пробирку в фотоприемной камере хемилюминометра, и одновременно с началом регистрации данных вносили 1.5 мл щелочного раствора субстрата (2×10^{-3} моль/л люминола (2×10^{-3} моль/л N-октиллюминола), 0.1 моль/л гидроксида натрия, пероксид водорода) путем прокалывания резиновой мембраны шприцевой иглой. При проведении экспериментов в мицеллярных растворах навеску Тритон X100 вносили в щелочной раствор люминола (N-октиллюминола). Результат измерений регистрировали в виде кинетической кривой хемилюминесценции в координатах

«Интенсивность (в условных единицах) – время» с разрешением 0.2 с [21]. Максимальное значение интенсивности I_{\max} определяли по высоте пика на кинетической кривой хемилюминесценции, интегральную интенсивность I – путем интегрирования полученной кинетической зависимости.

ОБСУЖДЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения оптимальной концентрации НПАВ (Тритон X100), была получена зависимость интенсивности хемилюминесцентной реакции окисления N-октиллюминола (0.002 М) пероксидом водорода в присутствии гипохлорит-иона (4×10^{-4} моль/л) от концентрации Тритон X-100 (рис. 1). Максимальная интенсивность хемилюминесценции наблюдается при концентрации 3×10^{-4} моль/л, поэтому все дальнейшие измерения проводили при данном содержании НПАВ. Т.к. люминол локализуется вне мицелл [20], влияние НПАВ распространяется только на инициатор хемилюминесцентной системы. Поэтому в рамках данной работы зависимость интенсивности хемилюминесцентной реакции люминола от концентрации Тритон X100 не рассматривается.

Для оптимизации состава хемилюминесцентной системы исследовали зависимость интенсивности реакции окисления люминола (2×10^{-3} моль/л) пероксидом водорода в присутствии *E. coli* (1×10^7 КОЕ/мл) от концентрации пероксида водорода (рис. 2). При содержании пероксида водорода 0.3 % наблюдается максимальная величина I_{\max} , и данная концентрация была выбрана нами в качестве оптимальной.

Далее исследовали максимальную интенсивность I_{\max} (рис. 3, а) и интегральную интенсивность I (рис. 3, б) хемилюминесцентных систем люминола и его гидрофобного аналога N-октиллюминола при взаимодействии с *E. coli* в присутствии и отсутствии НПАВ (Тритон X100). При переходе от люминола к N-октиллюминолу в отсутствие НПАВ наблюдает-

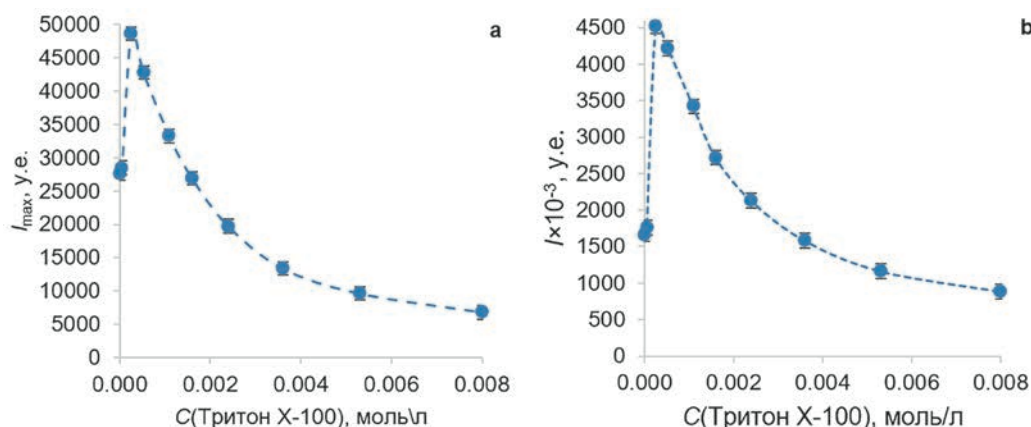


Рис. 1. Зависимость (а) максимальной интенсивности I_{\max} и (б) интегральной интенсивности I хемилюминесцентной реакции окисления N-октиллюминола (2×10^{-3} моль/л) пероксидом водорода в присутствии гипохлорит-иона (4×10^{-4} моль/л) от концентрации НПАВ (Тритон X-100).

Fig. 1. Dependence of the maximum intensity I_{\max} (а) and the integrated intensity I (б) of the chemiluminescent oxidation reaction of N-octiluminol (2×10^{-3} mol/l) by hydrogen peroxide in the presence of hypochlorite ion (4×10^{-4} mol/l) on the concentration of nonionic surfactants (Triton X-100).

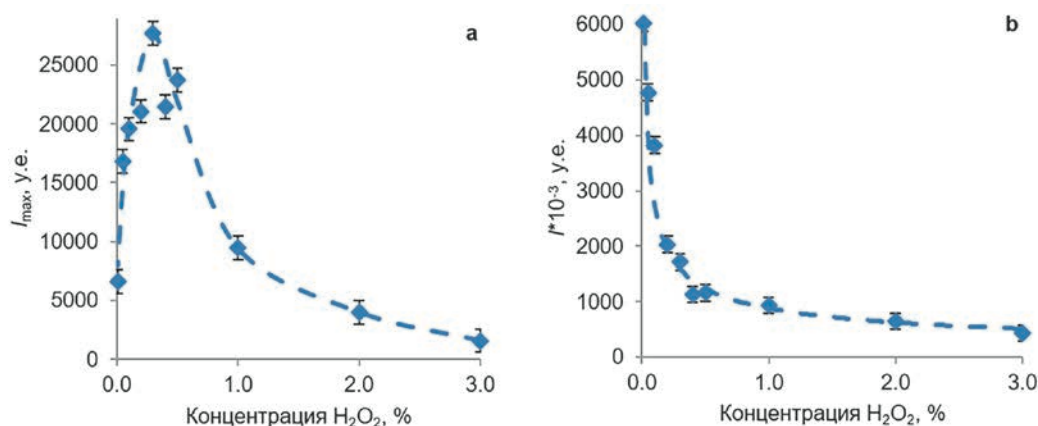


Рис. 2. Зависимость (а) максимальной интенсивности I_{\max} и (б) интегральной интенсивности I хемилюминесцентной реакции окисления люминола (2×10^{-3} моль/л) пероксидом водорода в присутствии *E. coli* (1×10^7 КОЕ/мл) от концентрации пероксида водорода.

Fig. 2. Dependence of the maximum intensity I_{\max} (a) and the integrated intensity I (b) of the chemiluminescent oxidation reaction of luminol (2×10^{-3} mol/l) by hydrogen peroxide in the presence of *E. coli* (1×10^7 CFU/ml) on the concentration of hydrogen peroxide.

ся повышение максимальной интенсивности I_{\max} в 2.5 раза и интегральной интенсивности I в 5.5 раз. Данный эффект наблюдается из-за микроконцентрирования АТФ в собственных мицеллах N-октиллюминола, что вызывает дополнительную стабилизацию АТФ, аналогично механизму, описанному в работе [14]. Добавление НП АВ незначительно уменьшает максимальную интенсивность I_{\max} и интегральную интенсивность I хемилюминесценции люминола. За счет разделения реагентов (АТФ в мицеллярной фазе [14], люминол в водной [20]) протекание реакции затрудняется, что вызывает понижение интенсивности хемилюминесценции. В случае N-октиллюминола введение НП АВ вызывает значительное понижение максимальной интенсивности I_{\max} и интегральной интенсивности I .

Добавление НП АВ вызывает увеличение количества мицелл, что в свою очередь уменьшает локальную концентрацию АТФ в них, за счёт чего понижается интенсивность хемилюминесцентной реакции.

Для аналитических систем, основанных на окислении люминола и N-октиллюминола, определены по РМГ 61-2010 ГСИ [24] показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности для улучшенной методики определения ОМЧ (табл. 1). Погрешность анализа в случае хемилюминесцентной реакции окисления люминола не превышает 15 % в диапазоне концентраций *E. coli* от 8×10^5 до 1×10^7 КОЕ/мл, для N-октиллюминола не выше 26 % в диапазоне концентраций *E. coli* от 4×10^5 до 1×10^7 КОЕ/мл.

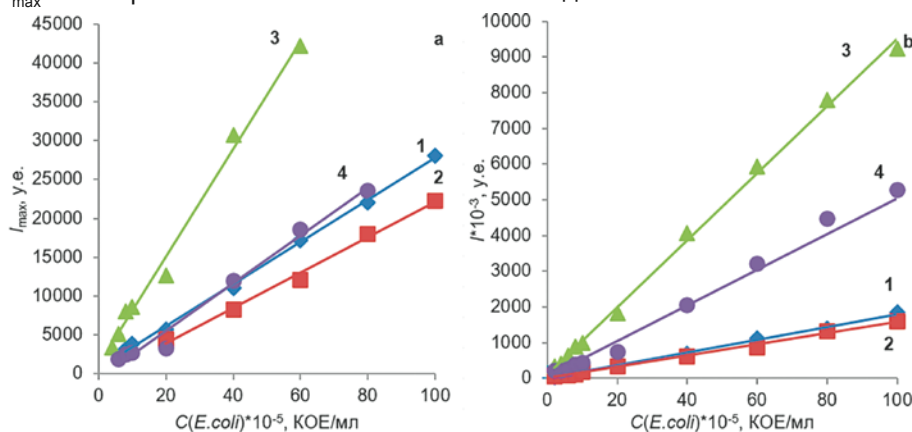


Рис. 3. Зависимость максимальной интенсивности I_{\max} (а) и интегральной интенсивности I (б) от концентрации *E. coli* для хемилюминесцентной реакции окисления пероксидом водорода люминола (2×10^{-3} моль/л) в отсутствие (1) и присутствии (2) НП АВ (Тритон X100) и N-октиллюминола (2×10^{-3} моль/л) в отсутствие (3) и присутствии (4) НП АВ (Тритон X100).

Fig. 3. Dependence of the maximum intensity I_{\max} (a) and the integrated intensity I (b) on the *E. coli* concentration for the hydrogen peroxide chemiluminescent oxidation reaction with luminol (2×10^{-3} mol / L) in the absence (1) and presence (2) of nonionic surfactants (Triton X100) and with N-octyluminol (2×10^{-3} mol / L) in the absence (3) and presence (4) of nonionic surfactants (Triton X100).

Таблица 1

Оценка показателей точности, правильности, повторяемости, воспроизводимости и внутрилабораторной прецизионности для улучшенной методики определения ОМЧ

Table 1

Evaluation of accuracy, correctness, repeatability, reproducibility and intralaboratory precision for the improved method of determining TVC

Субстрат	Параметр измерения	S_r , %	σ_r , %	r_n , %	S_{Rn} , %	S_{Rn} , %	σ_{Rn} , %	R_n , %	$\pm\delta$, %
Люминол	I_{\max}	7.44	7.44	20.6	6.39	7.57	7.57	21.0	14.8
	I	3.31	3.31	9.19	6.13	6.40	6.40	17.7	12.5
N-октиллюминол	I_{\max}	10.6	10.6	29.3	11.9	13.2	13.2	36.6	25.9
	I	5.30	5.30	14.7	11.2	11.6	11.6	32.2	22.8

Таблица 2

Хемилюминесцентное определение *E. coli* в модельном растворе методом «Введено-найдено» ($n = 5$, $P = 0.95$)

Table 2

Chemiluminescent determination of *E. coli* in the model solution by the "added-found" method ($n = 5$, $P = 0.95$)

Реагент	Введено $C(E. coli)$, КОЕ/мл	Найдено $C(E. coli)$, КОЕ/мл	S_r	δ , %
N-октиллюминол	71×10^4	$(75 \pm 11) \times 10^4$	60×10^3	15.5
	250×10^4	$(249 \pm 13) \times 10^4$	102×10^3	5.2
	600×10^4	$(598 \pm 39) \times 10^4$	300×10^3	6.5
Люминол	62×10^4	$(60 \pm 4) \times 10^4$	18×10^3	6.5
	410×10^4	$(408 \pm 41) \times 10^4$	315×10^3	10.0
	880×10^4	$(910 \pm 81) \times 10^4$	398×10^3	8.9

Таблица 3

Сравнение характеристик методики [18] и настоящей работы

Table 3

Comparison of the characteristics of the method [18] and the present work

Показатель	Патент [18]	Настоящая работа
Тип анализа	Качественный	Количественный
Единицы измерения	У.е. (Наличие/отсутствие загрязнения)	КОЕ/мл
Соотношение сигнал/шум	24	135
δ , %	80	26

Погрешность методики, определенная по методу «Введено-найдено» (табл. 2), не превышает 10 % и 16 % для люминола и N-октиллюминола, соответственно. Погрешность в условиях внутрилабораторной прецизионности больше, чем погрешность методики, определенная по методу «Введено-найдено», т.к. она учитывает множество факторов, влияющих на качество анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе оптимизированы условия проведения хемилюминесцентного анализа для определения ОМЧ с применением реакции окисления люминола и его аналога. Определена оптимальная концентрация пероксида водорода (0.3 %). Исследованы два хемилюминесцентных реагента: люминол и его поверхностно-активный аналог N-октиллюминол. Переход к N-октиллюминолу увеличивает аналитический сигнал в 5.5 раз за счет микроконцентрирования аналита в ядре соб-

ственных мицелл. Выявлено, что добавление НПАВ уменьшает аналитический сигнал. Применение разработанной хемилюминесцентной системы на основе N-октиллюминола позволило существенно улучшить существующую методику определения ОМЧ [18] с переходом от качественного определения микроорганизмов, погрешность которого составляет порядка 80 %, к количественному измерению со следующими метрологическими характеристиками: погрешность анализа не выше 26 % в диапазоне концентраций *E. coli* от 4×10^5 до 1×10^7 КОЕ/мл (табл. 3).

Мы полагаем, что применение предложенной аналитической системы с пробоподготовкой, описанной в работе [19], позволяющей практически полностью избежать влияния матрицы образца на результат определения, сделает улучшенную методику пригодной для анализа широкого круга реальных объектов. Валидации предложенного подхода будут посвящены наши дальнейшие исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают большую благодарность к.х.н. Сафонову Алексею Владимировичу за помощь в данном исследовании.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Alexey Vladimirovich Safonov, Ph.D. for the help in this study.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание, том 2 – Москва. 2015. С. 624-636.
2. Bonadonna L., Briancesco R., La Rosa G. Innovative analytical methods for monitoring microbiological and virological water quality // *Microchemical Journal*. 2019. V. 150. P. 104-160.
3. Bushon R.N., Likirdopulos Ch.A., Brady A.M.G. Comparison of immunomagnetic separation/adenosine triphosphate rapid method to traditional culture-based method for E.coli and enterococci enumeration in wastewater // *Water Research*. 2009. V. 43. P. 4940–4946.
4. Hammes F., Egli T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications // *Anal Bioanal Chem*. 2010. V. 397. P. 1083–1095.
5. Kennedy D., Wilkinson M.G. Application of Flow Cytometry to the Detection of Pathogenic Bacteria // *Curr. Issues Mol. Biol*. 2017. V. 23. P. 21-38.
6. Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of pseudomonas aeruginosa using phage as highly specific recognition agent / H. Yue [et al.] // *Biosens. Bioelectron*. 2017. V. 94. P. 429-432.
7. Chen S., Cheng F. Biosensors for bacterial detection // *Int. J. Biosen. Bioelectron*. 2017. V. 2. P. 197-199.
8. Kumar N., Hu Y., Singh S., Mizaikoff B. Emerging Biosensor Platforms for the Assessment of Water-Borne Pathogens // *Analyst*. 2018. V. 143. P. 359-373.
9. Santos I., Hildenbrand Z., Schug K. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology // *Analyst*. 2016. V. 141. P. 2827-2837.
10. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis / N. Singhal [et al.] // *Front Microbiol*. 2015. V. 6. P. 791-791.
11. Alvarez A., Hernandez E., Toranzos G. Advantages and Disadvantages of Traditional and Molecular Techniques Applied to the Detection of Pathogens in Waters // *Water Sci*. 1993. V. 27. P. 253-256.
12. Miller J.N., Nawawi M.B., Burgess C. Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection // *Analytica Chimica Acta*. 1992. V. 266. P. 339-343.
13. The ATP assay, a method for measuring biological activity in industrial water / R. Caprița [et al.] // *Revue Roumaine de Chimie*. 2006. V. 51. I. 10. P. 1031-1036.
14. Методы определения аденозинтрифосфата и других адениновых нуклеотидов / С.В. Хлынцева [и др.] // *Журнал аналитической химии*. 2009. Т. 64, № 7. С. 677-693.
15. ATP Amplification for Ultrasensitive Bioluminescence Assay: Detection of a Single Bacterial Cell / Satoh T. [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2004. V. 68. I. 6. P. 1216-1220.
16. Firefly Bioluminescent Assay of ATP in the Presence of ATP Extractant by Using Liposomes / T. Kamidate [et al.] // *Anal. Chem*. 2006. V. 78. P. 337-342.
17. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы экспресс-метод определения микробиологических показателей качества питьевой воды, воды поверхностных и подземных источников: методические указания / Сост.: В.А. Ишутин [и др.] // Военная академия химической защиты, ВЦМК «Защита», НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды имени А.Н. Сысина РАМН; Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999. 25 с.
18. Пат. 2276190 Российская Федерация, МПК⁷ С 12 Q 1/04, G 01 N 33/48. Экспрессный способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей / Аксенов А.В., Ишутин В.А., Кармишин А.Ю. № 2004116675/13; заявл. 02.06.2004; опубл. 10.05.2006, Бюл. №13. 7 с.
19. Трофимов С.И., Михеева И.В. Совершенствование хемилюминесцентного экспресс-метода оценки уровня бактериальной зараженности водной среды // *Научные и образовательные проблемы гражданской защиты*. 2011. Т. 4. С. 57-62.
20. Янькова Т.В. Организованные молекулярные системы в хемилюминесцентной реакции люминола // *Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018»*: тез. докл. М.:2018. С. 904.
21. Янькова Т.В., Мельников П.В., Зайцев Н.К. Хемилюминесцентные реакции люминола и п-октиллюминола с гипохлоритом в анионных поверхностно-активных веществах // *Вестн. моск. ун-та. сер. 2. Химия*. 2019. Т. 60, № 3. С. 20.
22. Хемилюминесцентные реакции люминола и N-октиллюминола с гипохлоритом в неионогенных поверхностно-активных веществах / Т.В. Янькова [и др.] // *Тонкие Химические Технологии*. 2019. Т. 14, № 3. С. 90.
23. Experimental Determination and System Level Analysis of Essential Genes in Escherichia coli MG1655 / S.Y. Gerdes [et al.] // *Journal of Bacteriology*. 2003. V. 185. P. 5673–5684.
24. РМГ 61-2010 ГСИ. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: Стандартинформ., 2012. 62 с.

REFERENCES

1. *Gosudarstvennaia farmakopeia Rossiiskoi Federatsii, XII izdanie, tom 2* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII Edition, Volume 2], Moscow, 2015 (in Russian).
2. Bonadonna L., Briancesco R., La Rosa G. Innovative analytical methods for monitoring microbiological and virological water quality. *Microchemical Journal*, 2019, vol. 150, pp. 104-160. doi: 10.1016/j.microc.2019.104160
3. Bushon R.N., Likirdopulos Ch.A., Brady A.M.G. Comparison of immunomagnetic separation/adenosine triphosphate rapid method to traditional culture-based method for E. coli and enterococci enumeration in wastewater. *Water Research*, 2009, vol. 43, pp. 4940–4946. doi: 10.1016/j.watres.2009.06.047
4. Hammes F., Egli T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. *Anal Bioanal Chem*, 2010, vol. 397, pp. 1083–1095. doi: 10.1007/s00216-010-3646-3
5. Kennedy D., Wilkinson M.G. Application of Flow Cytometry to the Detection of Pathogenic Bacteria. *Curr. Issues Mol. Biol*, 2017, vol. 23, pp. 21-38. doi: 10.21775/cimb.023.021
6. Yue H., He Y., Fan E., Wang L., Lu S., Fu Z. Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of pseudomonas aeruginosa using phage as highly specific recognition agent. *Biosens. Bioelectron*, 2017, vol. 94, pp. 429-432. doi: 10.1016/j.bios.2017.03.033

7. Chen S., Cheng F. Biosensors for bacterial detection. *Int. J. Biosen. Bioelectron*, 2017, vol. 2, pp. 197-199. doi: 10.15406/ijbsbe.2017.02.00048
8. Kumar N., Hu Y., Singh S., Mizaikoff B. Emerging Biosensor Platforms for the Assessment of Water-Borne Pathogens. *Analyst*, 2018, vol. 143, pp. 359-373. doi: 10.1039/C7AN00983F
9. Santos I., Hildenbrand Z., Schug K. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 2016, vol. 141, pp. 2827-2837. doi: 10.1039/C6AN00131A
10. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Viridi J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*, 2015, vol. 6, pp. 791-791. doi:10.3389/fmicb.2015.00791
11. Alvarez A., Hernandez E., Toranzos G. Advantages and Disadvantages of Traditional and Molecular Techniques Applied to the Detection of Pathogens in Waters. *Water Sci*, 1993, vol. 27, pp. 253-256. doi: 10.2166/wst.1993.0354
12. Miller J.N., Nawawi M.B., Burgess C. Detection of bacterial ATP by reversed flow-injection analysis with luminescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 1992, vol. 266, pp. 339-343. doi: 10.1016/0003-2670(92)85061-A
13. Caprița R., Caprița A., Vintila T., Ilia G. The ATP assay, a method for measuring biological activity in industrial water, *Revue Roumaine de Chimie*, 2006, vol. 51, I. 10, pp. 1031-1036.
14. Khlyntseva S.V., Bazel Ya.R., Vishnikin A.B., Andruch V. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *J. Anal. Chem*, 2009, vol. 64, pp. 657-673. doi: 10.1134/S1061934809070028
15. Satoh T., Kato J., Takiguchi N., Ohtake H., Kuroda A. ATP Amplification for Ultrasensitive Bioluminescence Assay: Detection of a Single Bacterial Cell. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004, vol. 68, I. 6, pp. 1216-1220. doi: 10.1271/bbb.68.1216
16. Kamidate T., Yanashita K., Tani H., Ishida A., Notani M. Firefly Bioluminescent Assay of ATP in the Presence of ATP Extractant by Using Liposomes. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, pp. 337-342. doi: 10.1021/ac058038n
17. Ishutin V.A., Stekhin A.A., Iakovleva G.V., Koriakin Iu.N., Zubarev A.F., Doskina T.V., Rakhmanin Iu.A., Nedachin A.E., Mikhailova R.I., Streliaeva N.E., Krivolapova N.S., Podunova L.G., Skachkov V.B. *Metody kontrolya. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory ekspress-metod opredeleniia mikrobiologicheskikh pokazatelei kachestva pit'evoi vody, vody poverkhnostnykh i podzemnykh istochnikov* [Control methods. Biological and microbiological factors rapid method for determining microbiological indicators of the quality of drinking water, surface and underground water sources]. Guidelines RF, 1999 (in Russian).
18. Axenov A.V., Ishutin V.A., Karmishin A.Iu. *Ekspressnyi sposob opredeleniia mikroskopicheskikh gribov, bakterii i drozhzhei* [Express method for the determination of microscopic fungi, bacteria and yeast]. Patent RF, no. 2276190, 2006. (in Russian)
19. Trofimov S.I., Miheeva I.V. [Improving the chemiluminescent express method for assessing the level of bacterial contamination of the aquatic environment]. *Naychnye i obrazovatelnye problemy grazhdanskoj zashchity* [Scientific and educational problems of civil protection], 2011, vol. 4, pp. 57-62. (in Russian)
20. Yankova T.V. [Organized molecular systems in the chemiluminescent reaction of luminol]. *Materialy Mezhdynarodnogo molodezhnogo nauchnogo foruma "Lomonosov-2018"* [Materials of the International Youth Scientific Forum "LOMONOSOV-2018"]. Moscow, 2018, pp. 904-904. (in Russian)
21. Yankova T.V., Melnikov P.V., Zaytsev N.K. Chemiluminescent reactions of luminol and N-octiluminol with hypochlorite in anionic surfactants. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2019, vol. 74, no. 3, pp. 116-121. doi: 10.3103/S002713141903012X
22. Yankova T.V., Melnikov P.V., Yashtulov N.A., Zaytsev N.K. Khemiliuminestsentnye reaktsii liuminola i N-oktilliuminola s gipokhloritom v rastvorakh neionogennykh poverkhnostno-aktivnykh veschestv [Chemiluminescent reactions of luminol and N-octiluminol with hypochlorite in nonionic surfactants]. *Fine Chemical Technologies*, 2019, vol. 14, no. 3, pp. 90. (in Russian) doi: 10.32362/2410-6593-2019-14-3-90-97
23. Gerdes S.Y., Scholle M.D., Campbell J.W., Balazsi G., Ravasz E., Daugherty M.D., Somera A.L., Kyrpides N.C., Anderson I., Gelfand M.S., Bhattacharya A., Kapatral V., Souza M.D., Baev M.V., Grechkin Y., Mseeh F., Fonstein M.Y., Overbeek R., Barabasi A.L., Oltvai Z.N., Osterman A.L. Experimental Determination and System Level Analysis of Essential Genes in Escherichia coli MG1655. *Journal of Bacteriology*, 2003, vol. 185, pp. 5673-5684. doi: 10.1128/JB.185.19.5673-5684.2003
24. *RMG 61-2010 GSI. Gosudarstvennaya sistema obespecheniia edinstva izmerenii. Pokazateli tochnosti, pravilnosti, pretsizionnosti metodik kolichestvennogo khimicheskogo analiza. Metodi ozenki* [RMG 61-2010 GSI State system for ensuring the uniformity of measurements. Indicators of accuracy, correctness, precision of methods of quantitative chemical analysis. Evaluation Methods]. Moscow, Standartinform Publ., 2012. 62 p. (in Russian).