

## ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ И ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ И ДИАГНОСТИКИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Лисиченко Н. Л.<sup>1</sup>, Жила В. И.<sup>1</sup>, Васильев В. С.<sup>1</sup>, Дорич О. В.<sup>1</sup>, Бабич Е. М.<sup>2</sup>,  
Кныш О. В.<sup>2</sup>, Исаенко Е. Ю.<sup>2</sup>, Дроздов А. А.<sup>3</sup>, Рыжкова Т. Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства,  
<sup>2</sup>ГУ "Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины" (г. Харьков),  
<sup>3</sup>Харьковская государственная зооветеринарная академия

*В статье рассматривается возможность применения методов интерференционной микроскопии для контроля реакции клеток, молочных бактерий на лазерное воздействие с целью установления наиболее оптимальных параметров и технологических режимов производства кисломолочных продуктов*

**Постановка задачи.** Производство молока и молочных продуктов в Украине на душу населения в последние годы составляет около 50% от нормы потребления. Такое положение характеризует глубокий и длительный кризис отечественной молочной отрасли и требует применения необходимых, адекватных мер для выхода из этого состояния. Широкое применение инновационных, ресурсосберегающих, лазерных технологий позволит достаточно быстро преодолеть негативные последствия кризиса.

Лазерные технологии позволяют существенно увеличить продуктивность животных за счет повышения эффективности их воспроизведения как на этапе получения генетического материала (спермы, яйцеклеток, зигот), так и хранения клеток, их клонирования, искусственного осеменения, трансплантации зигот. Получение потомства заданного пола, с заданными хозяйственно-производственными показателями, протестированного по ДНК маркерам, позволяет быстро повысить в молочном скотоводстве валовое производство молока и нарастить объемы производства высококачественных молочных продуктов. Для контроля качества клеток, скорости деления молочных бактерий, дрожжей, оценки эффективности действия лазерного излучения на каждом этапе технологической цепочки получения молока и молочных продуктов целесообразно использовать методы интерференционной микроскопии [1].

**Анализ последних достижений и публикаций.** Методами интерференционной микроскопии изучали количественные и качественные изменения в пробах коровьего и козьего молока в процессе приготовления молочных продуктов, культуры клеток при обработке образцов лазерным излучением, ультразвуком и другими видами физико-химического воздействия. Характер воздействия определяли из предыдущих результатов исследований. Оптимальная интенсивность лазерного излучения в предыдущих опытах определена в пределах от  $10^2$  до  $10^4$  Вт/м<sup>2</sup>, время экспозиции от 5 до 20 сек [2].

**Основные материалы исследований.** Методы интерференционной микроскопии позволяют наблюдать живые, неокрашенные клетки, молочнокислые бактерии, жировые шарики молока с хорошей контрастностью и проводить количественные измерения размеров, концентрации вещества, сухой массы кле-

ток, объективно оценивать качество молока и молочнокислых продуктов. С этой целью нами разработан и создан измерительный комплекс состоящий из интерференционно-поляризационного микроскопа MPI-5, цифровой видеокамеры с выходом on-line на компьютер и в интернет (рис. 1).



Рисунок 1 – Измерительный комплекс с интерференционно-поляризационным микроскопом MPI-5

В отличие от обычного светового микроскопа, интерференционная система MPI-5, состоящая из поляризатора, анализатора и двоякопреломляющей призмы (призмы Волластона), раздваивает изображения клеток так, что сдвиги фаз световых волн в них противоположны. С помощью поляризационной системы сдвиги фаз световых волн проходящих через клетку и мимо клетки преобразуются в разности амплитуд световых волн. В результате, в поле зрения микроскопа мы наблюдаем раздвоенные изображения микрообъекта, окрашенные в разные интерференционные цвета. Если раздвоение небольшое и составляет десятые доли микрометра, то возникает дифференциальный интерференционный контраст (ДИК или контраст Номарского). Хорошие условия для наблюдения клеток создает ДИК при увеличении в 200 – 1000 раз в однородном интерференционном сером, желто-коричневом или голубом цветах (создается формат 3-D).

На рисунке 2 на сером интерференционном фоне представлены в контрасте Номарского клетки культуры живых дрожжей в сахарозной питательной среде.

Градуированная окулярная сеточка позволяет определять концентрацию клеток в пробе и измерять размеры клеток. Длина стороны наименьшего квадрата по нашим измерениям равнялась 33,3 мкм. Проведенные измерения и расчеты позволили определить ряд количественных показателей сахаромицетов: средние значения длины и ширины клеток – 5,69 мкм x 2,85 мкм, площади – 12,7 мкм<sup>2</sup>, объема – 35,6 мкм<sup>3</sup>, сухой массы – 15,7 пг, массы живой клетки – 39,2 пг. Концентрация клеток в пробе была равна – 43,6 x 10<sup>6</sup> см<sup>-3</sup>.



Рисунок 2 – Сахаромицеты в дифференциальном сером интерференционном контрасте

Существенно улучшается контраст наблюдения при большом раздвоении изображений клеток в однородном интерференционном фоне по методу Плюте-Номарского [3]. В случае большого раздвоения (рис. 3), изображения каждой клетки, в которых фазы колебаний световых волн сдвинуты относительно фона на одинаковые величины, но в противоположных направлениях, окрашены в разные интерференционные цвета. Сдвиг фазы в изображении тем больше, чем больше толщина и концентрация вещества в клетке (рис. 3). Измеряя сдвиг фазы световых волн, прошедших через клетку, зная размер клетки можно рассчитать сухую массу клетки, распределение концентрации вещества в клетке.

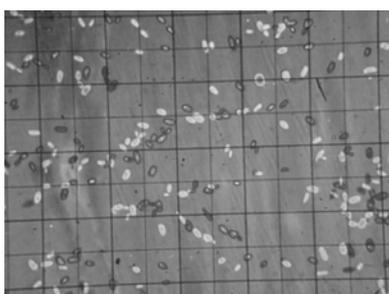


Рисунок 3 – Раздвоенные изображения сахаромицетов на сером интерференционном фоне

В интерференционном контрасте с большим раздвоением можно наблюдать пропионовокислые и другие бактерии, их рост, размножение, агрегацию и другие процессы *in vivo*. Возможность выбора цвета интерференционного фона, в котором раздвоенные изображения клеток оказываются в наилучшем контрасте, позволяет наблюдать объекты с предельным оптическим разрешением в 0,3 мкм.

Молочнокислые бактерии, имеющие размеры около 0,5 – 0,7 мкм и вносящие сдвиг фазы в световые

волны порядка 40 – 80 нм, обладали сухой массой от 0,1 до 0,5 пг. Как в контрасте Номарского, так и в однородном интерференционном поле с большим раздвоением хорошо оценивать морфологию и идентифицировать бифидобактерии, лактобактерии, дрожжи, клетки крови, спермии и другие клетки животных (рис. 4).

В пробе суспензии лактобактерий, представленной на рис. 4, в процессе инкубации образуются цепочки бактерий разной длины в результате биполярного деления клеток.



Рисунок 4 – Раздвоенные изображения лактобактерий на сером интерференционном фоне

При обработке суспензии ультразвуком, нарушается процесс бинарного деления бактерий и в результате хаотического деления клеток образуются "ёжики", которые можно наблюдать на рис. 5 в серых интерференционных цветах. При этом возможно, у многих бактерий нарушается обычный процесс деления, а отпочкование и рост дочерних клеток происходит в произвольных местах стенки клетки (рис. 5). Возникает хаотический рост стенок, в результате чего образуются более компактные, разветвленные колонии бактерий, представляющие собой глобулы подобные "ёжикам".

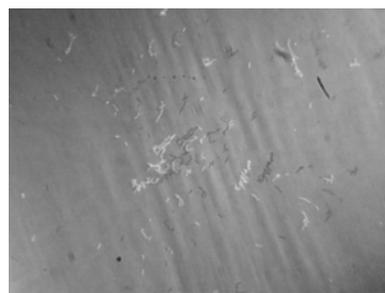


Рисунок 5 – Раздвоенные изображения лактобактерий после ультразвуковой обработки

При сквашивании молока в интерференционном контрасте удобно наблюдать весь процесс приготовления и созревания молочнокислых продуктов *in vivo*. На рис. 6 в пробе кефира в серых интерференционных цветах наблюдаются раздвоенные изображения нативных делящихся болгарских палочек. Размер палочек в среднем равен 5 мкм x 1 мкм, сухая масса – 2,2 пг. В поле зрения микроскопа также наблюдаются раздвоенные изображения сгустков молочного белка (рис. 6).

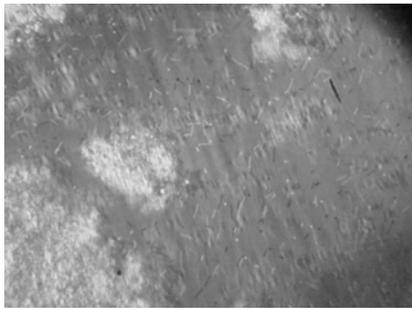


Рисунок 6 – Проба кефира. Раздвоенные изображения кефирных палочек в сером интерференционном фоне

В процессе технологической обработки молока часто возникает необходимость корректировать качество и свойства получаемых продуктов. С этой целью мы облучали молоко, различные закваски лазерным светом определенной длины волны, оптимальной плотностью потока излучения и необходимой дозой энергии. Ранее было показано, что красный лазерный свет интенсивностью от  $10^2$  до  $10^4$  Вт/м<sup>2</sup> вызывал активацию подвижности клеток, гипохромный и другие эффекты, увеличивал скорость деления клеток, бактерий как молочнокислых, так и бифидо-комплекса [4].

С учетом предварительных результатов проводили лазерное облучение молока, проб заквасок лактобактерий, пропионовокислых бактерий, проб обезжиренного коровьего и козьего молока, инкубируемого с бифидо- бактериями, светом с длинами волн 670нм, 630 нм, 532нм, 445 нм, 405нм с наиболее оптимальными параметрами (табл. 1).

Таблица 1 – Характеристики лазерного излучения

Длина волны, нм	670	630	532	445	405
Мощность излучения	N=7мВт	N=50мВт	N=50мВт	N=50мВт	N=50мВт
Плотность потока	20 мВт/см <sup>2</sup>				

Результаты опытов показали, что лазерное облучение проб молока с йогуртными заквасками бифидо-комплекса, особенно, в начале сбраживания, т.е. на начальном этапе фазы экспоненциального роста числа бактерий, вызывает существенное увеличение скорости деления клеток. При этом наибольший отклик и увеличение скорости размножения бактерий наблюдалось для фиолетового, а также для зеленого света (табл. 2).

Таблица 2 – Число бактерий в поле зрения микроскопа после 6 часов инкубации облученных проб

Длина волны, нм	670	630	532	445	405
Контроль	1100	1100	1100	1100	1100
5 сек облуч.	2200	1200	4200*	-	3100*
10 сек облуч.	1800	1100	4100*	-	5800*
20 сек облуч.	1000	1000	7000**	1300	9200**

\*-  $p < 0,1$ , \*\*-  $p < 0,05$ .

Возможно, такой характер действия лазерного света, указанных диапазонов, обусловлен тем, что бифидо- и некоторые другие молочные бактерии могут содержать ферменты элементов дыхательной цепи или цепи переноса электронов, как и в эукариотах. Такие гемопротейиды, например, цитохромы имеют полосы поглощения в видимой области, соответствующие длинам волн – 576 нм, 540 нм, 410 нм, причем, в последней полосе - поглощение – максимальное. Возможно, поэтому фиолетовое излучение вызывало наибольшую активацию ферментных систем бактерий и максимальный рост скорости деления клеток. Очевидно, что за 20 секунд экспозиции в опыте, практически, каждая акцепторная молекула могла поглотить не менее одного кванта, что обязательно приводит к возбужденному делокализованному (экситонному) или прямому резонансному электронно-конформационному возбужденному состоянию активной группы атомов или всей белковой глобулы [5]. В таком состоянии существенно увеличивается активность ферментов, увеличивается скорость роста и частота делений бактерий, что приводит к наблюдаемым эффектам.

Наибольшее увеличение скорости деления бактерий, по сравнению с контролем, наблюдалось в пробах, облученных фиолетовым светом (рис. 7). Облучение опытных проб лазерным излучением с длиной волны 405 нм в течение 5 секунд, на начальном этапе экспоненциального роста клеток, увеличивало число бактерий в поле зрения микроскопа через 6 часов инкубации в 2,8 раза, 10 секунд – 5,3 раза, а 20 секунд – почти в 8,4 раза, с 1100 до 9200.

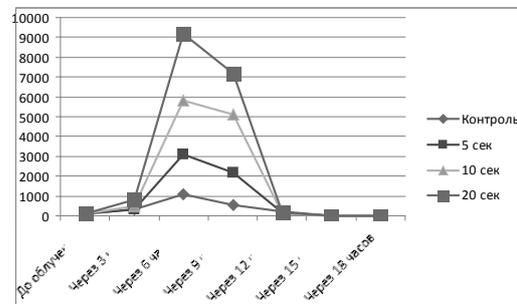


Рисунок 7 – Динамика изменения числа бактерий в поле зрения микроскопа после лазерного облучения проб

Математическое моделирование процессов молочнокислого брожения показало, что число бактерий в пробах йогуртов, кефиров и других молочнокислых продуктах на первом этапе, фазе роста, растет по экспоненциальному закону в зависимости от времени инкубации (рис. 8). Наилучшим образом, экспериментальные данные, полученные при 20 секундном облучении опытных проб фиолетовым светом, описывались экспонентой  $y = 12,618e^{2,1697x}$  (рис. 8). Константа экспоненты, в данном случае, фактически, характеризующая скорость размножения бактерий, имела значение  $2,1697 \text{ с}^{-1}$ . Это наибольшее значение константы из всех опытных данных и ее величина показывала, что каждые 30 секунд количество бактерий почти утраивалось в пробах.

На этапе отмирания бактерий, при исчерпании субстрата и высокой кислотности, число бактерий уменьшалось по логарифмическому закону (рис. 9). Теоретическая кривая описывала экспериментальные данные с надежностью  $R^2 = 0,8675$ .

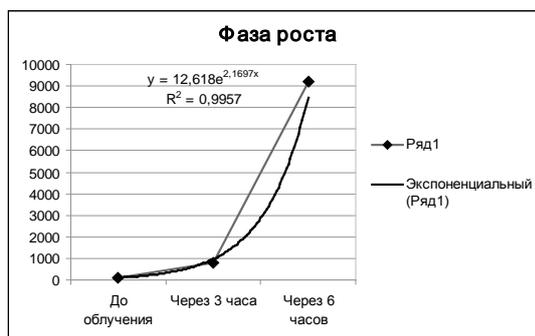


Рисунок 8 – Моделирование процесса роста числа бактерий в пробах йогурта, облученных в течение 20 сек фиолетовым лазерным светом

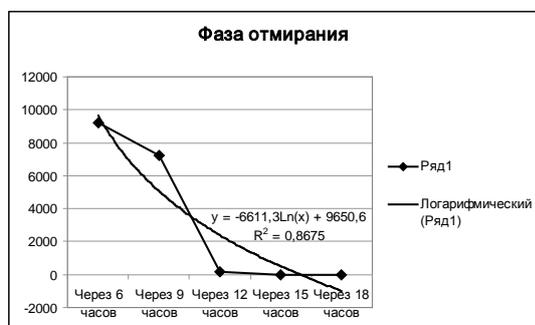


Рисунок 9 – Моделирование процесса отмирания бактерий в пробах йогурта, облученных в течение 20 сек фиолетовым лазерным светом

Результаты проведенных исследований показывают достаточно высокую эффективность использования интерференционной микроскопии для контроля реакции молочных бактерий на лазерное воздействие и позволяют наиболее точно устанавливать параметры и подбирать режимы лазерной обработки при производстве йогуртов, кефиров, других молочнокислых продуктов и создании новых видов молочных товаров.

**Выводы.** Таким образом, разрабатываемые лазерные технологии позволяют достаточно быстро повысить генетический потенциал и продуктивность животных, увеличить производство животноводческой продукции, создавать и совершенствовать новые ресурсосберегающие экономически выгодные процессы получения питьевого молока и молочных продуктов, в том числе, с использованием коровьего и козьего молока.

#### Список использованных источников

1. Васильев В. С. Совершенствование методов интерференционной микроскопии для изучения спермы в зависимости от породы, возраста и плодовитости быков: Автореф. Дисс... канд. биол. наук: 03.00.13 /

НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР. – Харьков, 1978. – 24 с.

2. Васильев В. С. Интерференционная микроскопия облученной спермы. / В.С.Васильев, Л.И.Васильева, Н. Л. Лисиченко, М. Й. Крамар, Г. Г. Юрченко // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. 15 / ХНАУ; ХГЗВА. – Харьков, 2005. – С. 157-160.

3. Васильев В. С. Морфофункциональные показатели спермы хряков в интерференционном контрасте. /В. С. Васильев, Хохлов А. М., Васильев Д. В. // Современные проблемы и технологические инновации в производстве свинины в странах СНГ: Сб. науч. тр. XX-ой Межд. научно-практич. конференции по свиноводству. – Чебоксары, 2013. – С. 165-172.

4. Васильев В. Сперма животных в интерференционном контрасте./ В. Васильев, Н. Лисиченко, О. Дорич // Науково-технічний бюлетень / ІТ НААН. – Х., 2015. – № 113. – С. 71-78.

5. Васильев В. С., Лисиченко Н. Л., Васильева О. В. Действие лазерного света разной поляризации на ферментативные системы клеток. //Плодоводство и ягодоводство России. Сб. науч. тр. – М., 2012. – Т. XXXIII. – С. 78-85.

#### Анотація

### ЗАСТОСУВАННЯ ІНТЕРФЕРЕНЦІЙНОЇ МІКРОСКОПІЇ ТА ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ДЛЯ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ ТА ДІАГНОСТИКИ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У МОЛОЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ

Лисиченко М. Л., Жила В. І., Васильєв В. С.,  
Доріч О. В., Бабич Є. М., Книш О. В.,  
Ісаєнко Е. Ю., Дроздов А. А.,  
Рижкова Т. Н.

*У статті розглядається можливість застосування методів інтерференційної микроскопії для контролю реакції клітин, молочних бактерій на лазерне вплив з метою встановлення найбільш оптимальних параметрів і технологічних режимів виробництва кисломолочних продуктів.*

#### Abstract

### APPLICATION OF INTERFERENCE MICROSCOPY AND LASER RADIATION FOR INTENSIFICATION AND DIAGNOSTICS OF TECHNOLOGICAL PROCESSES IN DAIRY INDUSTRY

N. Lisichenko, V. Zhila, V. Vasiliev,  
O. Dorich, E. Babich, O. Knysh,  
E. Isaenko, A. Drozdov,  
T. Ryzhkova

*The possibility of using interference microscopy methods to control the response of cells, milk bacteria to laser exposure in order to establish the most optimal parameters and technological regimes for the production of fermented milk products.*