

УДК 58.095:582.288.45

Метод и аппаратно-программное обеспечение контроля эффективности биоцидов / В. Е. Курочкин, Г. А. Парамонов, А. О. Петряков, Л. К. Панина // Научное приборостроение. - 1992. - Т.2. - N 2. - С. 85-94.

Разработан подход к оценке эффективности биоцидов, базирующийся на фотометрическом анализе роста периодических тест-культур микроорганизмов, инкубируемых в плоскодонных микротитрационных планшетах. Для регистрации роста микроорганизмов применен многоканальный фотометр "Линкей". Разработано программное обеспечение для оценки информативных параметров роста микроорганизмов в соответствии с модифицированной моделью Ферхюльста — Пирла. Влияние биоцидов на тест-культуры предложено оценивать по параметру ингибирования, характеризующему степень отклонения роста от логической модели.

Определена эффективность биоцидов на примере катамина АБ, применяемого в музеях, и катапола, перспективного в реставрации. Полученные данные по эффективности антисептиков согласуются с теоретически рассчитанными. Показаны преимущества предлагаемого метода по сравнению с традиционными. Библ.-12 назв. Ил.-3. Табл.-1.

---

В. Е. Курочкин, Г. А. Парамонов, А. О. Петряков

(Институт аналитического приборостроения РАН, С.-Петербург)

Л. К. Панина

(НИИ физиологии им. А. А. Ухтомского,

С.-Петербургский государственный университет)

## МЕТОД И АППАРАТНО-ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЦИДОВ

### Введение

Применение химических средств защиты против микробных агентов стимулирует поиск новых эффективных, экологически безопасных биоцидов пролонгированного действия. В связи с этим возникает вопрос разработки точного и надежного метода оценки действия биоцидов, позволяющего выявлять наиболее эффективные средства защиты и устанавливать научно обоснованные нормы их применения.

Так, например, известно, что использование завышенных концентраций антисептиков, вопреки ожидаемому усилению воздействия, приводит лишь к временному бактериостатическому эффекту, не вызывая гибели микроорганизмов [1].

Проведены исследования возможности оценивания эффективности известных и вновь синтезируемых биоцидов, равно как и определения резистентности к ним отдельных видов микроорганизмов путем анализа периодических тест-культур в стационарной фазе роста и в кинетическом режиме.

В основе предлагаемого метода лежат периодическое культивирование тест-культур микроорганизмов в 96-луночных микротитрационных планшетах; регистрация роста биомассы путем фотометрирования в вертикальном световом потоке в области линейной зависимости  $D=f(x)$ , где  $D$  — оптическая плотность,  $x$  — биомасса; математическое моделирование кинетики роста тест-культур; оценка информативных параметров модели роста; оценка ингибирующих концентраций биоцидов.

Известно, что при культивировании микроорганизмов под действием внешних факторов, ингибирующих или стимулирующих их рост, изменяются такие параметры, как удельная скорость роста биомассы, ее количество в стационарной фазе, длительность лаг-фазы. Учет изменений всей совокупности перечисленных параметров, очевидно, будет способствовать установлению более точного знания о характере ингибирования по сравнению с традиционными методами, принимающими во внимание, как правило, только один показатель — биомассу (концентрацию) микроорганизмов в стационарной фазе

роста. Для получения количественных оценок параметров целесообразно осуществлять контроль кинетики роста, культивируя тест-культуры в плоскодонных ячейках микротитрационных планшетов. Помимо успешного применения микротитрационных планшетов для визуального изучения развития водорослей и грибов [2, 3] техника культивирования в планшетах открывает перспективы совмещения в каждой ячейке функций реактора и фотометрической кюветы [4, 5].

Последующий анализ экспериментальных кривых роста можно осуществить на основе математических моделей замкнутой популяции. Вычисляя параметры модели методом нелинейных наименьших квадратов (МНК), можно однозначно охарактеризовать процесс и дать количественную оценку ингибирующего фактора и динамики его действия.

Метод апробирован при изучении биоцидного действия нового препарата катапола [6] на грибы и водоросли, повреждающие музейные экспонаты, в сравнении с катамином АБ, применяемым в реставрационной практике.

### Фотометрическая оценка кинетики роста

Отсутствие стандартной единицы роста и специфика пространственной конфигурации структур, особенно мицелиальных, вызывают определенные трудности при оценке биомассы оптическими методами. Тем не менее, применение фотометрии целесообразно вследствие минимального возмущающего действия на развитие тест-культур. Поэтому, несмотря на отсутствие строгой теории светорассеяния на анизодиаметрических объектах на практике используют величину оптической плотности  $D$  для оценки концентрации биомассы в области линейной зависимости  $D = f(x)$ .

Методические ограничения обуславливают исключение стадии спороншения микромицетов, а также необходимость перемешивания биомассы перед фотометрированием с целью достижения равномерности распределения ее по объему лунок. Кроме этого, фотометрирование необходимо проводить в диапазоне длин волн, где отсутствует поглощение светового излучения пигментами и метаболитами. В связи с этим использовалось излучение с длиной волны 450 нм. Измерение оптической плотности, т. е. оценка концентрации биомассы, осуществлялась посредством 96-канального фотометра "Линкей". Результаты фотометрирования передавались интерфейсом RS-232 в память персонального компьютера. Фотометрирование производилось через произвольные интервалы времени, начиная с момента посева до наступления стационарной фазы роста, что позволяло получать кинетические зависимости развития биомассы в процессе ее культивирования.

### Математическая модель

Экспериментальные зависимости роста биомассы количественно могут описываться известным уравнением логистического роста Ферхюльста – Пирла (модель замкнутой популяции с ограниченными внешними ресурсами):

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \left[ 1 - \frac{x}{x_{\infty}} \right],$$

где  $\mu$  — удельная скорость роста;  $x$  — биомасса;  $t$  — текущее время;  $x_{\infty}$  — биомасса в стационарной фазе роста. Как было показано ранее [5], данная модель и набор экспериментальных значений  $(x_i, t_i)$  посредством МННК позволяет вычислить параметры роста биомассы  $x_0, x_{\infty}$  и  $\mu$ .

Данная модель удобна в прямых задачах, таких как оптимизация процессов микробиологического синтеза. Однако в обратных задачах, в которых по особенностям жизнедеятельности тест-культур судят о характере и направленности воздействий внешней среды, в том числе и при оценке эффективности биоцидов, выгодна модифицированная форма модели (1) [7]:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \left[ 1 - \left( \frac{x}{x_{\infty}} \right)^{\alpha} \right], \quad (2)$$

где  $\alpha$  — индекс ингибирования, отвечающий за отклонение роста от экспоненциального закона (1).

Действительно, при  $\alpha = 1$  уравнение переходит в стандартное логистическое и, в нашем случае, удовлетворительно описывает рост контрольной популяции без внесения биоцидов. Присутствие биоцидов снижает  $\alpha$ ,  $0 \leq \alpha \leq 1$ , и уравнение (2) описывает различную степень ингибирования в сравнении с логистическим ростом.

### Оценивание параметров модели

Исходя из заданной математической модели (2) и набора экспериментальных значений  $(x_i \sim D; t_i)$ , посредством МННК для каждой кривой роста вычислялись параметры  $x_0, x_{\infty}, \mu$  и  $\alpha$ , характеризующие развитие замкнутой популяции при воздействии токсиканта. При этом  $x_0$  — параметр, характеризующий биомассу посева (начало биотестирования),  $x_{\infty}$  — параметр, оценивающий конечную биомассу и характеризующий потенциальную способность субстрата поддерживать рост микроорганизмов,  $\mu$  — параметр, оценивающий скорость биомассы,  $\alpha$  — индекс ингибирования.

При постановке и выборе методов решения нелинейной задачи о наименьших квадратах следует отличать задачи с нулевой или малой невязкой и задачи с большой невязкой.

Известно, что в задачах с нулевой и малой невязкой методы решения типа Гаусса—Ньютона, в которых каждый шаг рекурсии делается в направлении спуска, сходятся  $q$ -квадратично. В случае, если невязка достаточно велика, методы типа Гаусса—Ньютона могут совсем расходиться.

Методы линейного поиска, в которых необходимо найти приемлемую длину шага в заданном направлении, приводят к сходимости лишь некоторого класса нелинейных задач о наименьших квадратах с большой или "сильной нелинейной" невязкой. В указанном классе задач эффективны алгоритмы решения типа алгоритма Marquart. Однако априорное незнание начальных условий и вид функции, содержащей экспоненциальную зависимость ("сильная нелинейность"), не позволяют использовать как методы Гаусса—Ньютона, так и методы линейного поиска. Применительно к данной модели методы линейного поиска приводили к расходимости процесса.

При поиске параметров данной модели использовалась стратегия *модель—доверительная область*, при которой вначале выбирается длина шага, а затем,

используя квадратичную аппроксимацию, делается выбор направления шага рекурсии. К таким методам относятся методы Shanno. Используемая стратегия модель — *доверительная область* приводит к глобальной сходимости модели с большой невязкой или "сильной нелинейностью".

Интерактивная графическая программа, реализующая указанную стратегию, разработана по рекурсии [8, 9]:

$$\hat{x} = x_T - \lambda_T [J(x_T)^T J(x_T) + S(x_T)^{-1} J(x_T)^T R(x_T)],$$

где  $x_T$  — точка минимума одномерной кубической функции  $\hat{x} = x_T - \lambda_T (J(x_T)^T J(x_T))^{-1} J(x_T)^T R(x_T)$ ;  $\lambda_T$  — либо первое подходящее значение из последовательности 1, 1/2, 1/4, ... , либо необходимо использовать более общую схему линейного поиска с дроблением шага

$$J(C, x_0, \mu, \alpha, t) = \begin{vmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial C} & \frac{\partial f_1}{\partial x_0} & \frac{\partial f_1}{\partial \mu} & \frac{\partial f_1}{\partial \alpha} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \frac{\partial f_4}{\partial C} & \frac{\partial f_4}{\partial x_0} & \frac{\partial f_4}{\partial \mu} & \frac{\partial f_4}{\partial \alpha} \end{vmatrix}$$

$$S(C, x_0, \mu, \alpha, t) = \begin{vmatrix} \frac{\partial^2 f}{\partial C^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial C \partial x_0} & \frac{\partial^2 f}{\partial C \partial \mu} & \frac{\partial^2 f}{\partial C \partial \alpha} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial C \partial x_0} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_0^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_0 \partial \mu} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_0 \partial \alpha} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial C \partial \mu} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_0 \partial \mu} & \frac{\partial^2 f}{\partial \mu^2} & \frac{\partial^2 f}{\partial \mu \partial \alpha} \\ \frac{\partial^2 f}{\partial C \partial \alpha} & \frac{\partial^2 f}{\partial x_0 \partial \alpha} & \frac{\partial^2 f}{\partial \mu \partial \alpha} & \frac{\partial^2 f}{\partial \alpha^2} \end{vmatrix}$$

Такой алгоритм является компромиссом между скоростью сходимости, неадекватностью модели экспериментальным данным и объемом занимаемой оперативной памяти ПЭВМ.

### Аппаратура

Для реализации настоящего метода использовались 96-канальный фотометр "Линкей", 8-канальный автоматический дозатор, 8-канальная ручная полуавтоматическая пипетка, суховоздушный термостат для 20 микротитрационных планшетов, персональный компьютер типа IBM PC. Эта аппаратура производится Научно-производственным комплексом аналитических систем и иммуноферментного анализа акционерного общества "Научные приборы" (С.-Петербург).

Фотометр "Линкей" позволяет проводить исследования в спектральном диапазоне от 340 до 700 нм и имеет предел измерений от 0 до 2.5 е. о. п.

8-канальный автоматический дозатор позволяет автоматически дозировать жидкие вещества в пределах от 20 до 300 мкл с шагом 5 мкл. Время раскапывания одного планшета не более одной мин.

8-канальная ручная полуавтоматическая пипетка позволяет раскапывать исследуемые пробы в объемах от 5 до 50 мкл и от 50 до 500 мкл. В конструкции пипетки предусмотрены возможности быстрой и простой перестройки объемов дозирования, а также смены наконечников для предотвращения переноса веществ из пробы в пробу.

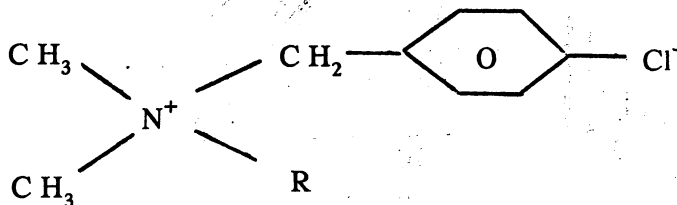
### Тест-культуры

Тест-объектами взяты некоторые виды мицелиальных грибов, выделенных с экспонатов в Государственном Эрмитаже и микроскопические водоросли из коллекции лаборатории Биологического научно-исследовательского института при С.-Петербургском университете. В эксперименте использовалась также первичная смешанная культура водорослей, обнаруженных на экспонатах в археологическом раскопе-музее Юдиново (Беларусь), следующих видов: желто-зеленые водоросли — *Botrydiopsis magna* Snow, *Heterothrix stichococcides* Pash и др.; зеленые — *Chlorella protothecoides* Krüger, *Chlorella vulgaris* Beijer, *Scotiellopsis* sp.; сине-зеленые — *Microcoleus vaginatus* (Vauch.) Crom., *Phormidium Lenninsii* Lemm.

### Биоциды

Были исследованы активность и пороговые концентрации биоцидов, являющихся четвертичными аммониевыми соединениями (ЧАС) из группы катионных поверхностно-активных веществ, рекомендованных для использования в реставрационной и музейной практике в качестве химического средства борьбы с микроорганизмами [10].

Препарат катамин АБ — алкилдиметилбензиламмоний хлорид



R — смесь гомологичных соединений следующего состава: до  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$  — 1.42 %,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$  — 61.27 %, до  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$  — 0.72 %;  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$  — 36.39 %, свыше  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$  — 0.29 %.

В ряде случаев применение катамина АБ ограничено его токсичностью. Для получения частично детоксицированного ЧАС предлагается применять комплексы этих веществ с полимерами [6]. При этом антимикробный эффект

комплекса обусловлен активностью низкомолекулярного вещества, которое диффундирует к микроорганизмам после отщепления с полимерной матрицы. Можно уменьшить содержание антисептика в полимерном комплексе, сохранить спектр действия и понизить его влияние на человека. Эти свойства, в частности, исследовались нами на примере препарата катапол, представляющего собой полимерный комплекс, содержащий 30 % катамина АБ, разработанного в Институте высокомолекулярных соединений РАН (С.-Петербург).

### Методика эксперимента

Грибы и водоросли выращивались в 96-луночных плоскодонных планшетах производства Ленмедполимер (С.-Петербург). Для культур грибов использовалась жидкая среда Чапека—Докса с 3%-ной сахарозой в качестве источника углерода. Водоросли культивировались на питательной среде № 6, приготовленной по прописи [11]. Тестируемые биоциды добавлялись к среде в возрастающих концентрациях от  $10^{-5}$  до  $10^{-1}$  %. Инокулят, приготовленный на стерильной среде с исходной концентрацией  $10^6$  клеток/мл, прибавляли в каждую ячейку в количестве 20 мкл. Общий объем пробы составлял 200 мкл. Грибы инкубировались в термокамерах при  $29^\circ\text{C}$ . Водоросли помещались в люминостат со стандартной освещенностью 5000 ЛК при температуре  $25^\circ\text{C}$ . Посевы микроорганизмов без антисептиков являлись контрольными.

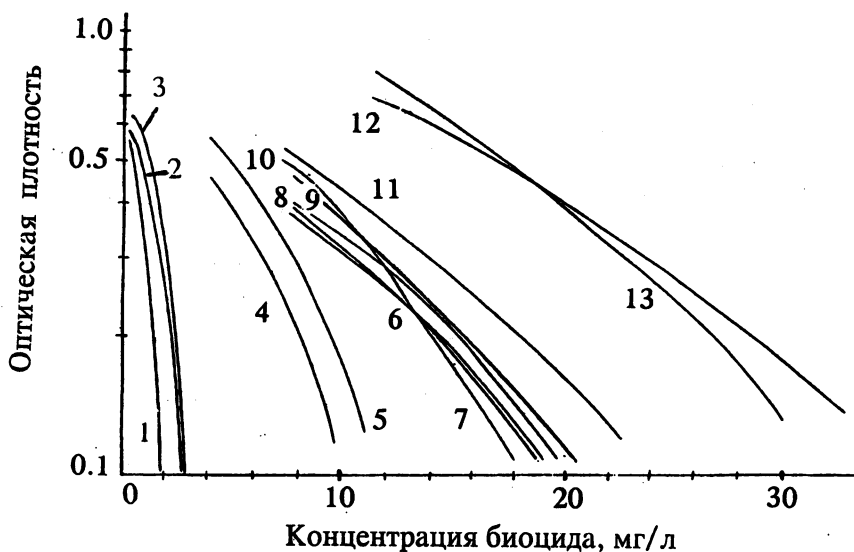


Рис. 1. Зоны ингибирования микроорганизмов катамином АБ (по оси абсцисс — концентрация биоцида, по оси ординат — оптическая плотность в стационарной фазе роста микроорганизмов): 1 — *Anacystis nidulans*; 2 — *Bracteacoccus minor*; 3 — *Chlorella vulgaris*; 4 — *Mucor racemosus*; 5 — *Mucor plumbeus*; 6 — *Penicillium funiculosum*; 7 — *Penicillium verrucosum*; 8 — *Penicillium cyaneo-fulvum*; 9 — *Penicillium fellutanum*; 10 — *Penicillium chrysogenum*; 11 — *Trichoderma viride*; 12 — *Aspergillus niger*; 13 — *Aspergillus clavatus*

Измерение оптической плотности микрокультур проводилось через относительно произвольные интервалы времени, начиная с момента посева до вступления в стационарную фазу роста. За нулевой отсчет принималась оптическая плотность среды с биоцидом до внесения инокулята. Результаты фотометрирования заносились в память ПЭВМ для обработки. После завершения культивирования по каждой пробе в компьютере накапливался набор экспериментальных значений, который мог быть представлен в виде кривой роста. Каждый опыт повторялся 8—16 раз, и по результатам усреднения формировалась обобщенная кривая роста микрокультуры под воздействием испытуемого биоцида определенной концентрации. За минимальную ингибирующую концентрацию принималась наименьшая концентрация, полностью подавляющая рост культуры в пробе.

### Результаты и обсуждение

В целом результаты экспериментов показали, что по мере возрастания концентрации катамина АБ в интервале от  $0.05 \cdot 10^{-3}$  до  $4.0 \cdot 10^{-3}$  % и катапол от  $1.0 \cdot 10^{-3}$  до  $1.0 \cdot 10^{-2}$  % в среде происходит торможение роста гетеро- и фототрофных микроорганизмов. Зоны ингибирования микроорганизмов катамином АБ приведены на рис. 1. При этом разные виды водорослей и грибов обладают разной резистентностью.

В таблице приведены минимальные ингибирующие концентрации биоцидов, подавляющие рост микроорганизмов.

Тип микроорганизма	Пороговая концентрация ( $\times 10^{-3}$ %)	
	катамин АБ	катапол
<b>Microalgae</b>		
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.30	1.0
<i>Hormidium fluitans</i>	0.25	1.0
<i>Bracteacoccus minor</i>	0.30	0.9
<i>Chlamidomonas moewusii</i>	0.20	0.7
<i>Anacystis nidulans</i>	0.20	0.7
<i>Nitzschia communis</i>	0.20	0.7
<i>Chlorococcum wimmeri</i>	0.05	0.1
<i>Anabaena variabilis</i>	0.05	0.1
<b>Micromycets</b>		
<i>Aspergillus niger</i>	3.50	10.0
<i>Aspergillus clavatus</i>	3.25	10.0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2.00	5.0
<i>Penicillium cyaneog-fulvum</i>	2.00	5.0
<i>Penicillium fellutanum</i>	2.00	5.0
<i>Penicillium verruosum</i>	2.00	5.0
<i>Penicillium funiculosum</i>	2.00	5.0
<i>Trichoderma viride</i>	2.50	5.0
<i>Mucor plumbeus</i>	1.50	5.0
<i>Mucor ramosus</i>	1.00	3.0



Культуры водорослей *Anabaena variabilis* и *Chlorococcus Wimmeri* оказались наиболее чувствительны к биоцидам. Минимальная ингибирующая концентрация катамина АБ для них составила  $5 \cdot 10^{-3}$  %. Для первичной смешанной культуры водорослей, выделенной в музее-раскопе Юдиново, ингибирующие концентрации были больше и равны  $3 \cdot 10^{-3}$  и  $1.0 \cdot 10^{-2}$  %, соответственно, для катамина АБ и катапола.

Микромицеты проявили в целом большую устойчивость к биоцидам по сравнению с водорослями и продемонстрировали характерную зависимость между своей принадлежностью к определенному роду и устойчивостью к биоцидам (см. рис. 1).

Среди этой группы микроорганизмов самыми устойчивыми оказались грибы вида *Aspergillus clavatus* и *Aspergillus niger*. По данным работы [12] минимальная ингибирующая концентрация катамина АБ для *Aspergillus niger* на агаризованной среде Чапека—Докса на два порядка выше и составляет 0.1 %. По-видимому, действие активных компонентов биоцида катамин АБ на культуры микроорганизмов на агаре проявляется слабее в силу того, что они связываются компонентами среды и образуют с ними малодиссоциируемые или слаботоксичные комплексные соединения. Известно, кроме того, что активность катамина АБ понижается в кислой среде и, следовательно, можно ожидать ослабления эффекта при воздействии этого биоцида на кислотообразующие микроорганизмы, существенно влияющие на рН непосредственно в локальном пространстве своего роста и снижающие биоцидный эффект.

Оценка биоцидного эффекта катапола — высокомолекулярного аналога катамина АБ — позволила установить пределы его токсических концентраций, превысившие в среднем в три раза соответствующие ингибирующие концентрации катамина. Эти данные находятся в согласии с расчетами, основанными на предположении о механизме ингибирования роста микроорганизмов биоцидом катапол за счет только лишь активных низкомолекулярных компонентов, диффундирующих после отщепления с полимерной матрицы. Полимерный носитель, использованный в комплексе, не оказал собственного ингибирующего

влияния на рост микроорганизмов. Процентное соотношение токсичных низкомолекулярных компонентов в катаполе в три раза снижено по сравнению с исходным катамином АБ, чем и объясняется кажущееся завышенное в три раза значение минимальной ингибирующей концентрации для катапола. На рис. 2 показано влияние различных концентраций обоих биоцидов на культуру водорослей *Graciliosira minor*. Данная зависимость является типичной для исследованных видов водорослей и грибов и демонстрирует соотношение пороговых концентраций катамина АБ и катапола как 1 : 3.

Помимо определения ингибирующих концентраций биоци-

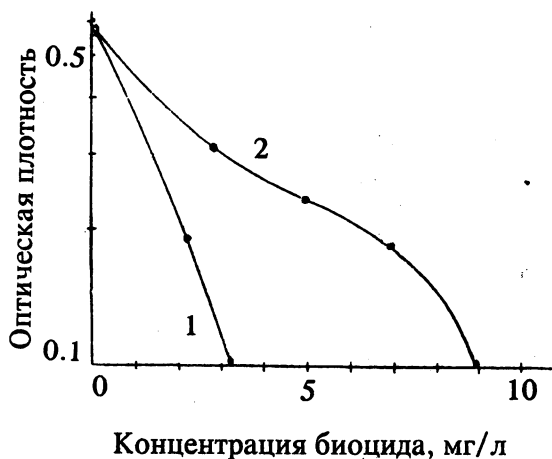


Рис. 2. Зависимость биомассы *Graciliosira minor* в стационарной фазе роста от концентрации биоцидов: 1 — катамин АБ; 2 — катапол

дов по биомассе в стационарной фазе роста предлагаемым методом проанализирована кинетика роста микромицетов под воздействием биоцидов в предпороговых сублетальных концентрациях. Для катамина АБ этот диапазон концентраций составляет  $0.5 \cdot 10^{-3} - 3.0 \cdot 10^{-3} \%$  в зависимости от вида грибов, для катапола, соответственно, пределы сдвинуты в три раза.

Экспериментальные кривые роста грибов *Aspergillus niger* для выборочных концентраций анти-септиков приведены на рис. 3. Из него видно, что по сравнению с ростом контрольной культуры без биоцидов в опыте наблюдаются изменения не только асимптотической биомассы, но и длительности лаг-фазы, удельной скорости роста. С помощью индекса ингибирования удается количественно оценить ответную реакцию тест-культуры на оказанное воздействие. Для исходной контрольной культуры вычисленные параметры роста составили:  $x_0 = 0.002$ ,  $x_\infty = 1.38$ ,  $\mu = 0.12$ ,  $\alpha = 1$ . Культуры в опыте отличаются от контрольных только внесением биоцидов. Это позволяет представлять кинетику роста в опытах как функцию от  $\alpha$  при заданных параметрах  $x_0$ ,  $x_\infty$  и  $\mu$ , соответствующих контрольным. Индекс  $\alpha$  резко убывает с нарастанием внешнего воздействия.

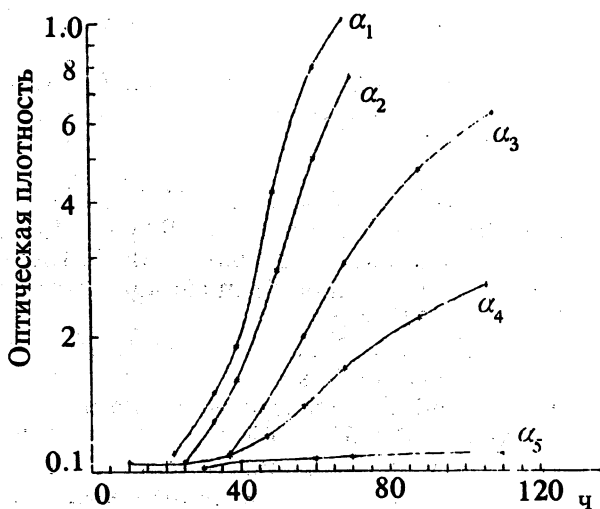


Рис. 3. Кинетика роста *Aspergillus niger* на среде Чапека—Докса после внесения различных концентраций катапола:  $\alpha_1 = 1$  (контрольная культура);  $\alpha_2 = 0.51$  (концентрация —  $1.3 \cdot 10^{-3} \%$ );  $\alpha_3 = 0.23$  (концентрация —  $4.8 \cdot 10^{-3} \%$ );  $\alpha_4 = 0.13$  (концентрация —  $8.4 \cdot 10^{-3} \%$ );  $\alpha_5 = 0$  (концентрация —  $1.6 \cdot 10^{-2} \%$ )

### Закключение

Рассмотренный метод и аппаратно-программное обеспечение контроля эффективности биоцидов показывает ряд преимуществ при исследовании кинетики роста тест-культур, а именно малые объемы проб, многократные неразрушающие оценки биомассы в течение цикла культивирования, высокую производительность, представительность статистик и достаточную чувствительность.

В совокупности с описанием кривых роста на основе математической модели и вычислением индекса ингибирования предлагаемый метод позволяет количественно сравнивать между собой влияние на микроорганизмы факторов различной природы, в том числе биоцидов, в зонах неполного ингибирования и однозначно характеризовать силу воздействия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Пронин С. В., Жуков В. Г., Турсунова Э. М.* Влияние катионного поверхностно-активного вещества (катамина АБ) на физиологоморфологические свойства *V. cereus* и *E. coli*//Изв. АН. - Сер.: Биологическая. - 1991. - N 1. - С. 31-42.
2. *Kerbs S., Hutton R., Hollister J.* Visual micromethod for assay of fungal growth//Can. J. Microbiol. - 1978.V. 24, N 5. - P. 574-578.
3. *Lonerz M. G., Krumbein W. E.* Large scale determination of cyanobacterial susceptibility to antibiotic and inorganic ions// Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1984.- V.20. - P. 422-426.
4. *Granade T. C., Hehmann M. F., Artis W. M.* Monitoring of the filamentous fungal growth by in situ microspectrophotometry, fragmented mycelium absorbance density and C<sup>14</sup> incorporation: alternatives to mycelial dry weight//Appl. Env. Microbiol. - 1985. - V.49, N 1. - P.101-108.
5. *Курочкин В. Е., Панина Л. К., Парамонов Г. А.* Фотометрический анализ роста культур мицелиальных грибов//Микология и фитопатология.- 1991. - Т.25, N 1.-С. 57-61.
6. *Соловский М. В., Панарин Е. Ф., Афиногенов Г. Е.* и др. Полимерные комплексы анионных поверхностно-активных веществ//Хим.-фарм. журн.-1980. - N 11.- С.51-56.
7. *Mulchandam A., Luong J.* Batch kinetics of microbial polisaccharide biosynthesis//Biotechn. Bioeng. - 1988. - V. 32, N 5. - P. 639-646.
8. *Ахо А., Хопкрофт Дж., Ульман Дж.* Построение и анализ вычислительных алгоритмов. - М.: Мир. - 1979. - 535 с.
9. *Аоки М.* Оптимизация стохастических систем. - М.: Наука.- 1971.- 424 с.
10. *Поверхностно-активные вещества.* Справочник/ Под ред. Абрамсон А. А., Гаевой Г. М. Л., 1979.
11. *Громов Б. В., Титова Н. К.* Культивирование коллекционных штаммов водорослей. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. - 203 с.
12. *Гончарова И. А.* Влияние кислотности осетрового клея на фунгицидную активность катамина АБ//Микология и фитопатология. - 1989. - Т. 23, N 3.- С. 246-248.

Рукопись поступила 10.02.92