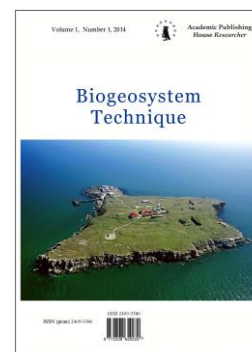


Copyright © 2017 by Academic Publishing House Researcher s.r.o.



Published in the Slovak Republic  
Biogeosystem Technique  
Has been issued since 2014.  
ISSN: 2409-3386  
E-ISSN: 2413-7316  
2017, 4(2): 140-188

DOI: 10.13187/bgt.2017.2.140  
[www.ejournal19.com](http://www.ejournal19.com)



## “MALDI-FLIP-on-a-chip” and “MALDI-FRAP-on-a-flap”: Novel Techniques for Soil Microbiology and Environmental Biogeochemistry. I – MALDI Chip Fingerprinting (Invited Paper)

Arthur G. Jablokow <sup>a, \*</sup>, Andrew A. Skrynnik <sup>a</sup>, Feodor K. Orekhov <sup>a</sup>,  
Philipp A. Nasirov <sup>a</sup>, Oleg V. Gradov <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute for Energy Problems of Chemical Physics named after Talrose,  
Russian Academy of Sciences, Russian Federation

### Abstract

Novel approaches for verifying continuity of membranous structures and measurements of nucleus-cytoplasm exchange rates are proposed. Novel approaches for the measurements of lateral diffusion/molecular mobility and bindings using MALDI+FRAP/FLIP hybridization are proposed (“MALDI-FLIP-on-a-chip” and “MALDI-FRAP-on-a-flap”). FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) is a method for diffusion kinetics measurements in living cells using fluorescence microscopy which allows to estimate quantitatively 2D lateral diffusion in molecularly thin film containing fluorescent-labeled probes, or for single cell examination (i.e. the study of lateral mobility of cellular molecules). Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP) is a microscopic technique predominantly performed using laser scanning microscopy (e.g. for tagged protein local photobleaching by short, intensive laser excitation on CLSM platform) used for the studies on molecular mobility inside the cells and membranes. MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) is a soft ionization technique used in mass spectrometry, allowing for the analysis of biomolecules (biopolymers such as DNA, proteins, peptides and sugars) and large organic molecules (such as polymers, dendrimers and other macromolecules), which tend to be fragile and fragmented when ionized by more conventional ionization methods (according to encyclopedic definition). The above laser-based technique is readily compatible with MALDI or other LDI using the same laser beam for LDI (for example – MALDI) and FLIP.

**Keywords:** FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching), MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), “BIOTYPER”, CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy), LoC (Lab-on-a-Chip).

### 1. Введение

#### MALDI-микробиология и MALDI-таксономия

Общеизвестна применимость методов матрично-активированной лазерной десорбции /ионизации (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) в идентификации бактерий (Avanzi et al., 2016; Chiu, 2014; Guo et al., 2014; Hammarström et al., 2014; Xiao et al., 2014) на подложках (т.н. MALDI target plates – см. Рис. 1–3) с зонами, на которые раскапываются соответствующие идентифицируемые микробиологические пробы. Раскапывание пробы на мишень (target plates) может осуществляться вручную стеклянным (Рис. 4) или пластиковым

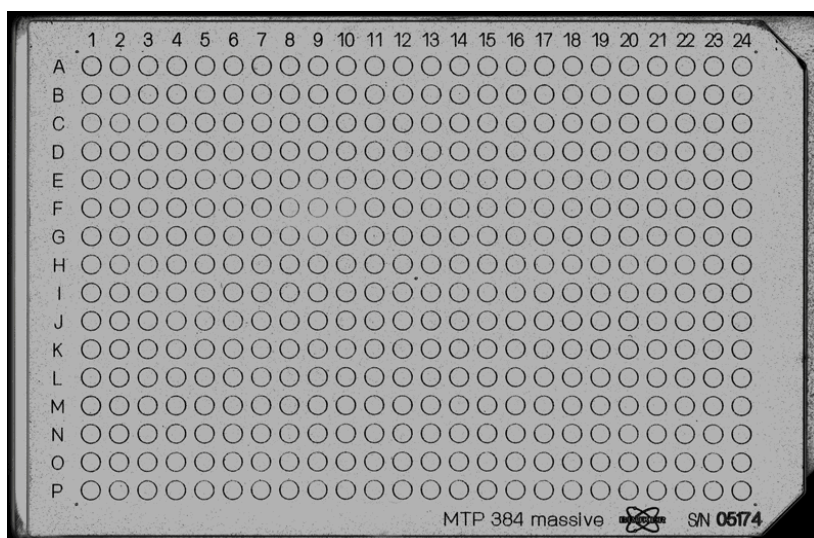
\* Corresponding author

E-mail address: [retromicroscopy@gmail.com](mailto:retromicroscopy@gmail.com) (A.G. Jablokow)

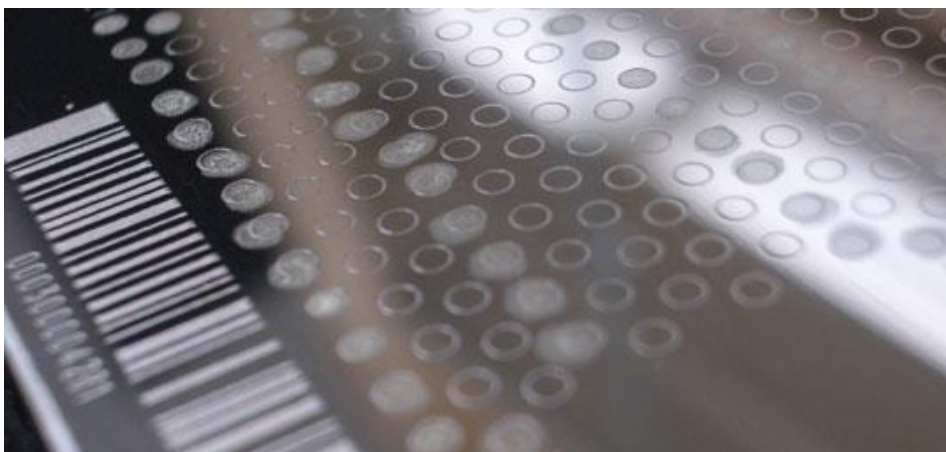
(Рис. 5) наконечником (в последнем случае вероятность загрязнения пробы органическими контаминантами зачастую существенно увеличивается). В идеальном случае, если ставится цель не просто обнаружения, но удельного количественного или полуколичественного сбора данных о содержании целевых веществ в пробах, капли должны быть подобны по объёмам и микрореологическим свойствам, что не всегда удается добиться при ручном дозировании на подложку (Рис. 6). Идентичные капли идентично десольватируются и кристаллизуются (Рис. 7), однако капли, нанесенные с интервалом во времени, к любому моменту времени после их раскапывания имеют разные оптико-рекристаллометрические, десольватационные и микрореологические характеристики (Рис. 8). С позиций статистического анализа данных и метрологии, результатом этого может являться гетероскедастичность в выборке, связанная с различием размеров капель и полноты заполнения лунок на подложке (MALDI target plates / anchor chips) при нанесении вручную; особо эта проблема проявляется при различии типов геометрий лунок (Рис. 9). По существу, продукты дегидратации/кристаллизации аналитов, как коллоидной, так и макромолекулярной (например, полипептидной) природы, с позиций нелинейной физики, представляют собой продукты самоорганизации (Golbraikh et al., 2003; Rapis, 1991, 1995, 2000, 2001, 2002, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008), формирующиеся в случае наличия соответствующих энергетических условий/градиентов, в том числе – при лазерно-индуцированной десольватационной (например, дегидратационной) самоорганизации (Рис. 10). Поэтому форма таких самоорганизующихся структур сильно зависит от условий среды и протокола эксперимента.

## 2. Объекты и методы

Как для коллоидных, так и для надмолекулярных структур, верны утверждения о зависимости строения от условий получения. Переход от ручного нанесения к автоматическим пипетаторам для нанесения «пятен» (известным также как MALDI spotter или MSLDI spotting system – см. Рис. 11, Рис. 12а, 12б), хотя и приводит к улучшению воспроизводимости дозирования и однородности пластины по объёмам заполнения, но не ведет к устранению физических причин десольватационной гетерогенности. Поэтому в ряде случаев измерений нативных образцов и прямой масс-спектрометрии отказываются от цели достижения однородности пятен и, более того, не преследуя цели удельной количественной аналитики, переходят лишь к идентификации наличия того или иного соединения/агента в анализируемом препарате, либо – химической идентификации неопознанного образца или пробы, коллектированной непосредственно в природной среде, по его MALDI-масс-спектрам без сверхсложной пробоподготовки, сопряженной с разделением биологического образца на элементарные идентифицируемые молекулярные компоненты (липиды, белки и т.д.).

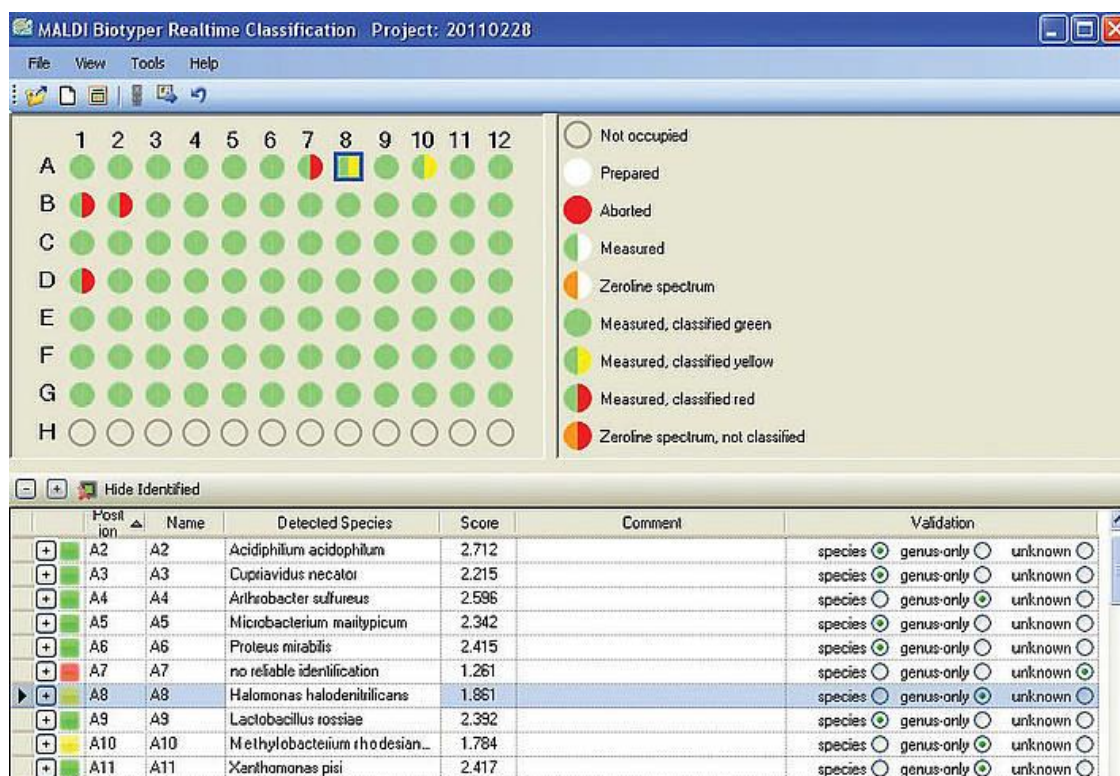


**Рис. 1.** Промышленно изготавливаемая MALDI-мишень MTP 384 с координатной сеткой/матрицей 24X16 с алфавитно-числовой кодировкой позиций считывания (фирма BRUKER)

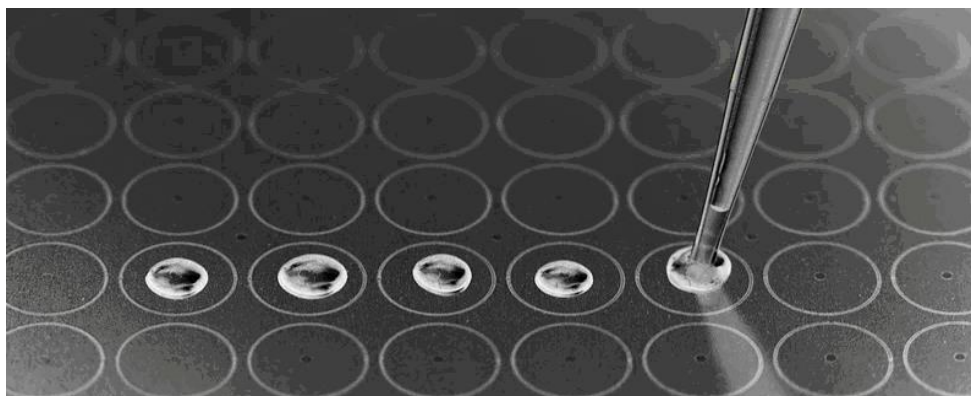


**Рис. 2.** Разновидность MALDI-мишени с машинно-считываемым штрих-кодом

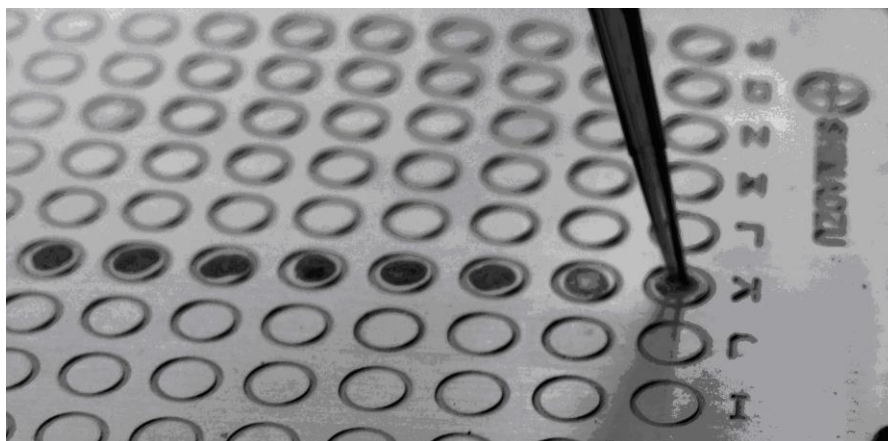
Этот подход часто называют «фингерпринтингом» (по аналогии со снятием отпечатка пальцев для идентификации подозреваемого). Существуют базы данных типа “BIOTYPER”, снабженные библиотеками опорных файлов, соответствующих идентифицируемым видам и иным таксономическим группам и штаммам микроорганизмов, причем базы данных могут как поставляться с прибором, так и приобретаться отдельно для конкретных задач, а формы использования баз данных могут зависеть от конкретных возможностей биоинформатики и хеометрики закупающего их учреждения, поскольку возможно импортирование анализов в другие программные продукты для постобработки (Cunningham, Patel, 2013; Grenfell et al., 2016; Harju et al., 2017; Kim et al., 2017; Rodríguez-Sánchez et al., 2016); например, возможно внедрение усовершенствованных алгоритмов интерпретации или кластеризации измерений (Harju et al., 2017; Rodríguez-Sánchez et al., 2016), что зачастую сопровождается внедрением в пользование таксономически-специализированных библиотек (например – библиотеки для идентификации микобактерий, имеющей не менее трех широко распространенных версий (Rodríguez-Sánchez et al., 2016)), либо увеличением номенклатуры существующих баз данных без изменений основного контента (Harju et al., 2017). Преимущество перед стандартными в микробиологии методами индикации окрашиванием заключается в том, что «биотайпинг», имплементируемый с помощью MALDI, подходит как для грамположительных бактерий, не имеющих внешнюю мембрану (Alatoom et al., 2011; McElvania Tekippe et al., 2013; Schulthess et al., 2014; Veloo et al., 2016), окрашивающихся по методу Г. Грама (окраска генциновым или метиловым фиолетовым с последующей фиксацией раствором йода и промывкой спиртом), так и для грамотрицательных, имеющих её, обесцвечиваемых при промывке в спирте (Faron et al., 2015; Ford and Burnham, 2013; Marko et al., 2012; Schulthess et al., 2016; Wimmer et al., 2012). С позиций почвенной и биогеохимической экологии и микробиологии, позитивно, что «биотайпинг» с использованием MALDI подходит как для аэробных (Faron et al., 2015), в том числе – грамотрицательных аэробных, так и для анаэробных микроорганизмов (Schmitt et al., 2013; Veloo et al., 2016); как для нативных изолятов из среды (Wang et al., 2016), так и для колоний, культивируемых на селективных средах биогенного происхождения (He et al., 2010); как для патогенных клинических изолятов (McElvania TeKippe and Burnham., 2014), так и для водных/ихтиопатогенных микроорганизмов (Kurokawa et al., 2013) и почвенных и ризосферных микроорганизмов (Uhlik et al., 2011;). Пример графического интерфейса GUI программы идентификации/классификации в реальном времени (MALDI Biotyper Realtime Classification для масс-спектрометров Bruker “Microflex” и “Autoflex”) с сайта отечественного дистрибьютора [<https://биотайпер.рф/biotyper>] приведен на Рис. 3.



**Рис. 3.** Процедура MS-измерения и идентификации с кодированной MALDI target plate



**Рис. 4.** Раскапывание стеклянным наконечником на мишень (anchor chip) Bruker Scout 384

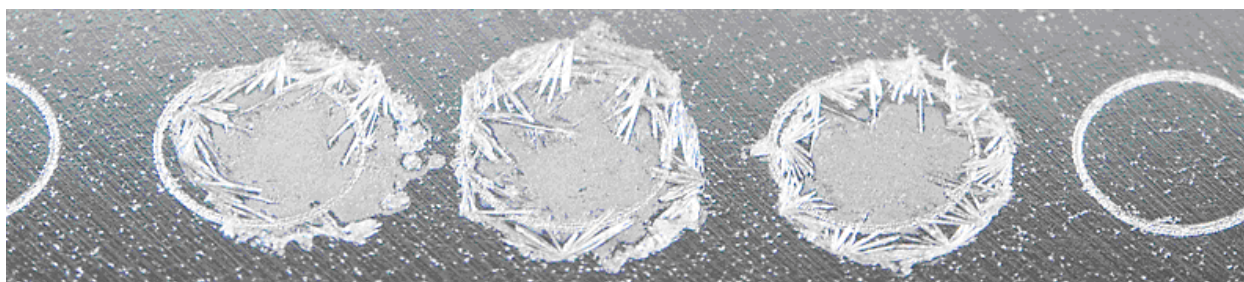


**Рис. 5.** Раскапывание пластиковым наконечником на мишень (anchor chip) SHIMADZU

Таким образом, достигается возможность идентификации микроорганизмов в режиме реального времени без окрашивания. Однако нанесение образца на лунки мишени является ограничивающим и в этом случае, так как, как можно видеть (Рис. 3), идентификация не может быть осуществлена без привязки к конкретным координатным меткам (A1 – A12; B1 – B12.; C1 – C12; D1 – D12; E1 – E12; F1 – F12; G1 – G12; H1 – H12), часть из которых берется как нулевая линия при калибровке (Zeroline spectrum / Zeroline spectrum, not classified). Поэтому возможности исследовать цельные структуры биосферного происхождения – биопленки, бактериальные маты, элементы строматолитов, любые иные пробы гетерогенной биомассы большего (чем размеры лунок) масштаба\* – с помощью координатных пластин для MALDI-MS (MALDI target plates / anchor chips) нет. Аналогичное утверждение относится и к многим биокосным комплексам, точнее – их пробам (например – почвам с микроорганизмами, без внедрения которых в образец забор проб естественных почв невозможен). Частично данную проблему решает внедрение методов MALDI-имэджинга, которые в ряде имплементаций по геометрии приближаются к методам микроскопии, имплементируемым на общедоступных у биологов предметных стеклах в совместимых с ридерными отсеками рамках – фреймах (Рис. 13). Также в данные рамки входят некоторые счетные камеры: Предтеченского, Тома-Цейсса (Thoma-Zeiss), Бюркера, Нойбауэра, Горяева, Малассе (гемоцитометрические) и пр., которые могут считываться не только MALDI, но и иными лазерными ридерами, для многих которых они являются пассивными аналитическими чипами (Notchenko and Gradov, 2013; Градов и Нотченко, 2012; Нотченко и Градов, 2011; Нотченко и Градов, 2012).

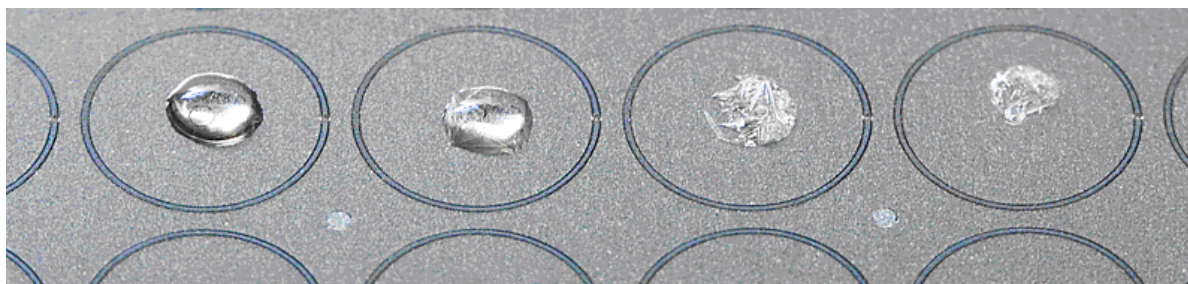


**Рис. 6.** Почти «идеальное» состояние капель после нанесения на мишень (anchor chip) при оптимальной гидрофобности поверхности и допустимой ошибке ручного дозирования. При ручном дозировании ошибка может достигать десятков процентов от объема капли

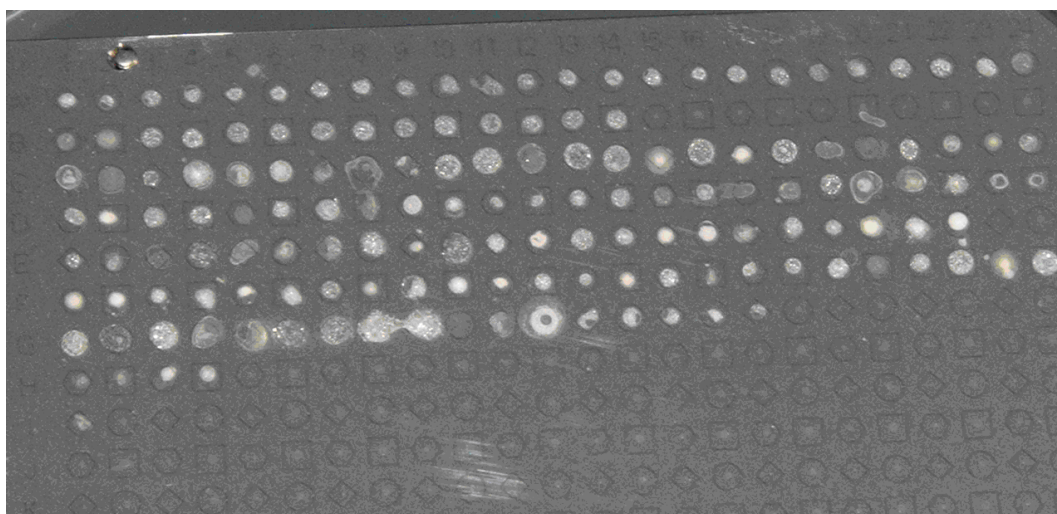


**Рис. 7.** Идентичные капли идентично десольватируются / кристаллизуются

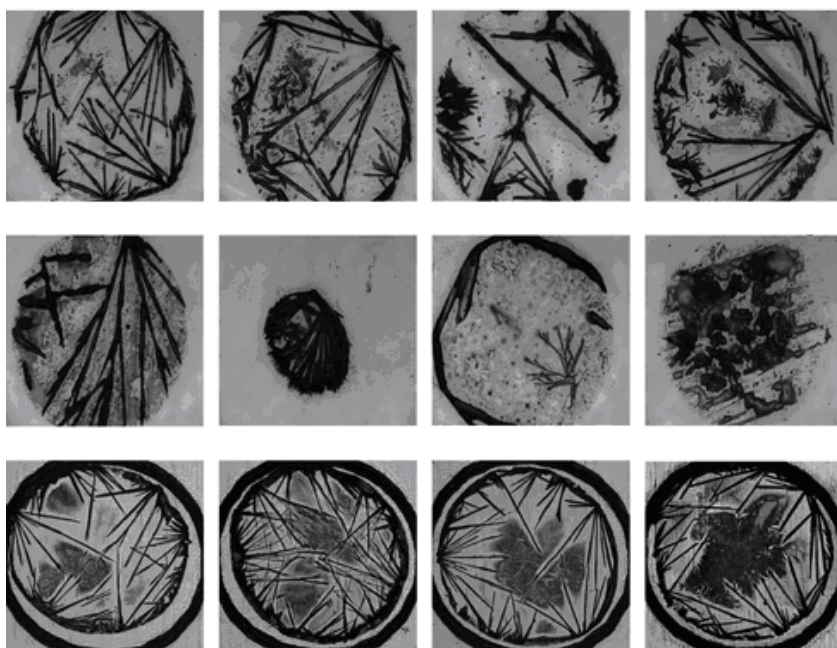
\* Как известно, масштабная стратификация важна для точной геоэкологической и биогеохимической классификации природных объектов этого типа. Те же вышеупомянутые строматолиты, как известно, делятся на микростроматолиты – до 1 мм, министроматолиты – до 1 см, мезостроматолиты – до 10 см, макростроматолиты – до 1 м (далее идут нерелевантные для структурного анализа мегастроматолиты и гигастроматолиты – до 100 м и до 1 км соответственно). Микростроматолиты укладываются в лунки на масс-спектрометрической подложке, министроматолиты и мезостроматолиты или, что корректнее, их срезы – в камерах MALDI масс-спектрометров, но уже не укладываются на одиночных лунках и не дают возможность калибровки в заданной нулевой лунке.



**Рис. 8.** Капли, нанесенные с интервалом во времени, к любому произвольно взятому моменту времени после раскапывания имеют разные оптико-рекристаллометрические, десольватационные / дегидратационные и микрореологические характеристики



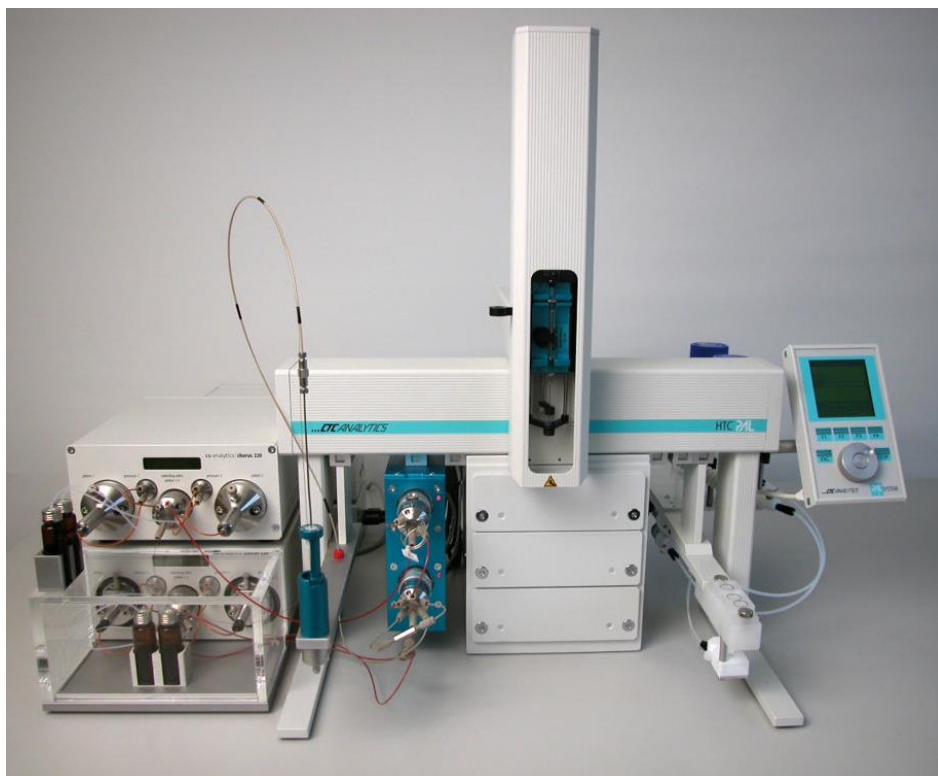
**Рис. 9.** Статистико-квалиметрический / метрологический пример различия формы и размера капель, а также полноты заполнения лунок «чипа», при нанесении вручную на мишень с разной геометрией и ориентацией позиций / лунок (круглая, квадратная, ромб)



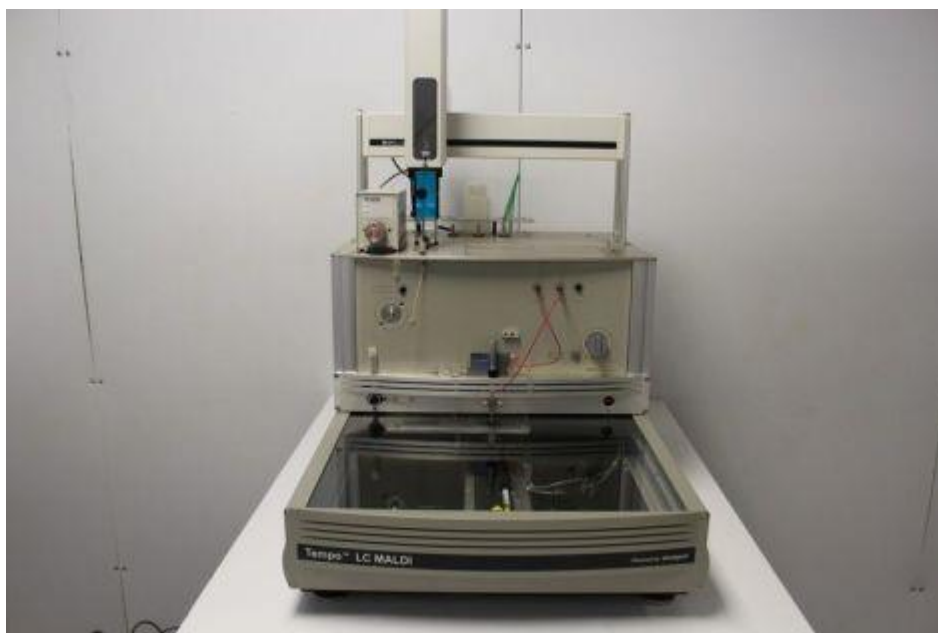
**Рис. 10.** Результаты десольватации на MALDI-подложке подобны структуре фаций при клиновидной дегидратации в морфологии биологических жидкостей и биокристалломике.

**Проблема картирования: анализ колонии/клеток или биосистемы?**

Надо сказать, что отдельно использование MALDI для анализа компонент почвенных сред является достаточно стандартизированной процедурой, применяемой для химического профилирования почвы по отдельным загрязнителям (Ivanova and Spiteller, 2015; Ivanova, 2016; Tsirogianni et al., 2005) и определения отдельных биохимических компонент в среде, в частности – белков вирусных капсид, определяющих наличие последних в пище, воде, почве и иных биогенных, абиогенных и биокосных средах (Hartmann et al., 2015). Однако, большой проблемой является то, что данный метод не является позиционно-чувствительным, то есть указать локализацию отдельных компонент в конкретных клетках микроорганизмов или же культурах клеток, а тем более – колокализацию разных компонент в одной культуре, вообще говоря, невозможно. Для этого, в идеале, нужно использование техник масс-спектрометрии, в которых обеспечивается пространственное разрешение на уровне одиночных клеток, что в случае микронных размеров объекта исследования, задающих необходимую дискретизацию, является проблемой. На данный момент среди техник SCMS (“Single-Cell Mass Spectrometry”) в биоаналитике на живых клетках (Masujima, 2009), адекватных витальному окрашиванию в колориметрических позиционно-чувствительных методиках индикации микроорганизмов, не существует техник, работающих на уровне микроструктуры популяций микроорганизмов в естественных условиях. Указанные методы допускают: регистрацию пептидных профилей с разрешением на уровне одиночной эукариотической клетки (Li et al., 2000), регистрацию и квантификацию пептидов межклеточного сигналинга (Rubakhin and Sweedler, 2008); анализ содержания микроэлементов (при использовании фемтосекундной лазерной ионизации) на слайсах тканей с индицируемыми клетками или в культурах клеток (Gao et al., 2013); солей и комплексных соединений, таких, как цис-диамминдихлороплатина или, что эквивалентно, соль Пейроне – комплексный хлорид-аммиакат двухвалентной платины (Chang et al., 2015); распределение биоаналитов в пористых носителях, подобных минеральным металлогенным (Fu et al., 2016); анализ следовых количеств / «трейсеров» при ионизации, технологически основанной на принципах нанопотоники (Walker et al., 2012); липидное профилирование в мембраносодержащих структурах (Mach, 2012); углеводное МС-профилирование на уровне до субпиколитровых образцов (Gholipour et al., 2008); и т.д. Поэтому существенного смысла в MALDI-имэджинге микроорганизмов их естественной геохимической среды до разработки способов имэджинговой масс-спектрометрии одиночных микроорганизмов – не имеется. Известные до текущего времени техники совмещения естественного высокоразрешающего имэджинга с масс-спектрометрией (напр., электронного микроскопа с масс-спектрометром, в чем у отечественных ученых имеется приоритет; группа В.Л. Тальрозе занималась этим более, чем два десятилетия назад), хотя и дают возможность установления колокализации стандартного имэджинга с позиционно-чувствительными данными масс-спектрометрии, но не дают сопоставимой точности либо сопоставимого пространственного разрешения в масс-спектрометрической карте, накладываемой на карту стандартного имэджинга (СЭМ / ПЭМ). Однако, возможно, для исследования в биогеохимическом и почвенно-микробиологическом ключе нет надобности в разрешении на уровне одиночной клетки, тем более – если целями исследования является микробное сообщество как система и химизм обратных связей в ней.

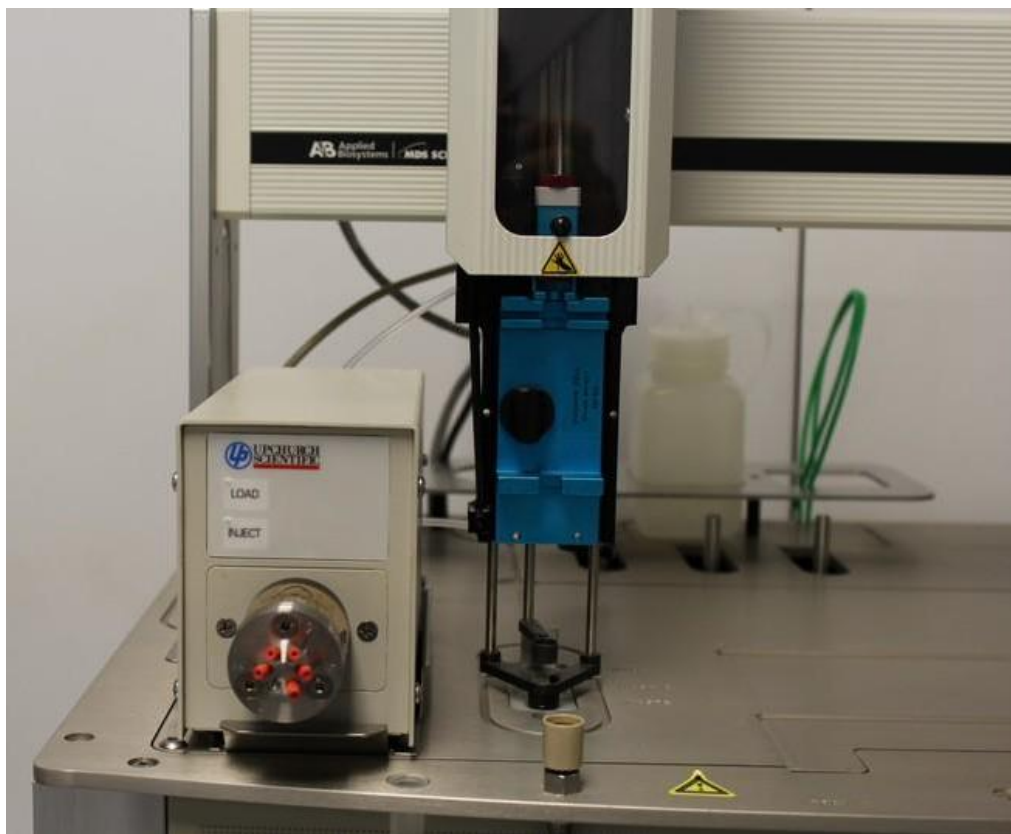


**Рис. 11.** PAL-MALDI-споттер



**Рис. 12а.** Жидкостно-хроматографический MALDI-споттер (от 1 нанолитра; частота скапывания = 4 Гц; скорость – от 200 нл/мин; максимальный размер пятна = 1 мм)





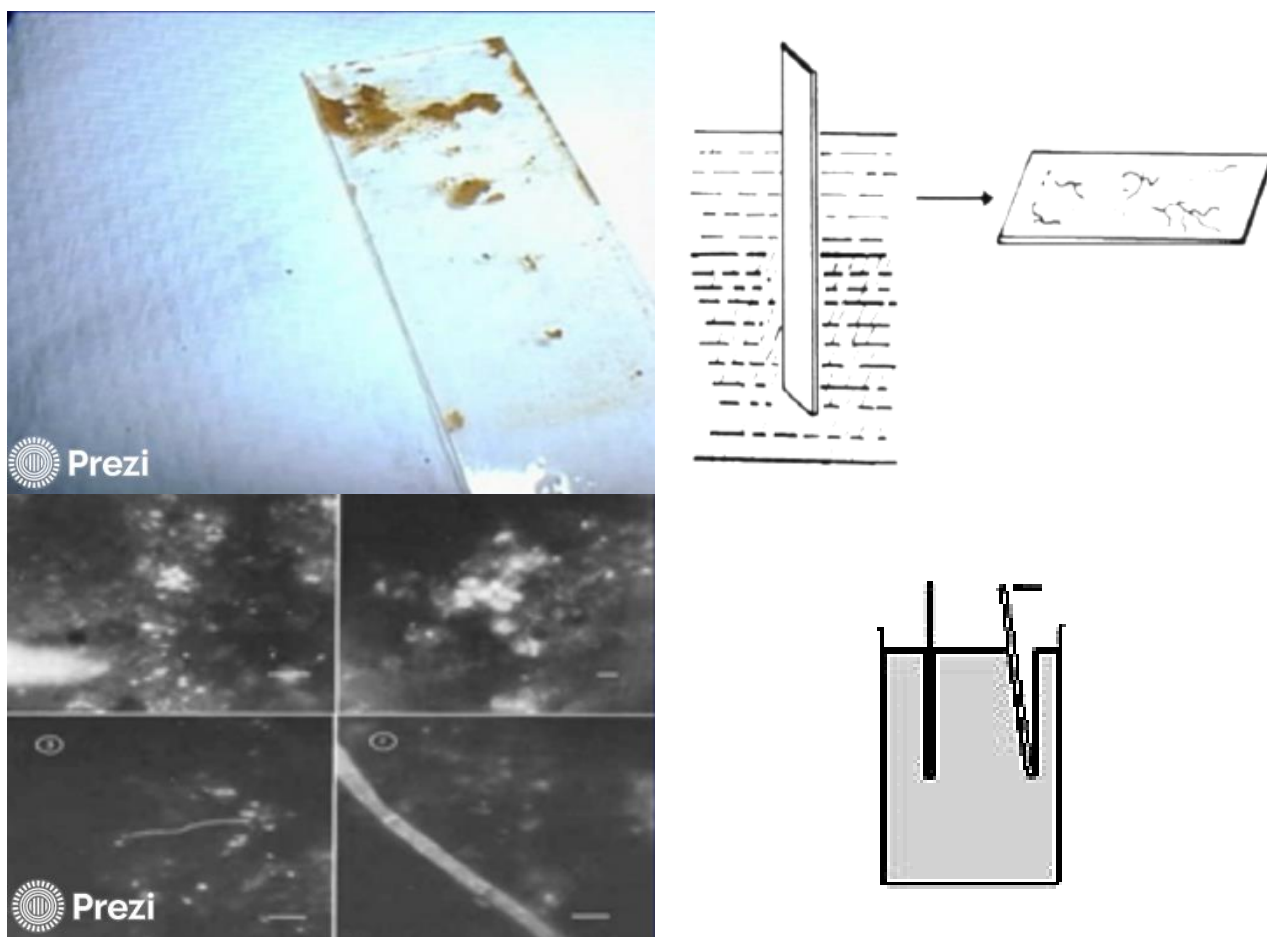
**Рис. 12б.** Дозирующий узел споттера “Applied Biosystems”, изображенного на рис. 12-а

### 3. Результаты и обсуждение

#### **Использование почвенных пластинок обрастания и почвенных камер по системе Росси-Холодного как MALDI-мишеней и альтернативный принцип мультиплексного детектирования микрофлоры почвы на активных чипах**

«...Углубленное изучение физиологии и биохимии микроорганизмов на основе чистых культур, дополненное геномикой и протеомикой, заставляет студентов забывать о больших системах, в которых действуют микроорганизмы» - писал акад. Г.А. Заварзин – крупнейший авторитет в геохимической экологии микроорганизмов и природоведческой микробиологии современного периода развития (ранее следовал этап, в котором *naturwissenschaftlichen und technischen mikrobiologie* уже существовали, а о геномика и протеомика еще не выделились в роли лидеров ещё не существовавшего тогда омикского тренда из молекулярной биологии – см., напр.: (Hirte, 2016)) в общеизвестных «Лекциях по природоведческой микробиологии» (Заварзин, 2003). Там же он писал: «...сообщество с химической точки зрения определяется термодинамикой и кинетикой осуществляемых окислительно-восстановительных реакций»; «для микробного сообщества главную роль при этом играет молекулярная диффузия» (Заварзин, 2003) и, как естественное следствие отсюда: «первая задача для микробиолога при решении задач экологии микроорганизмов ... в том, чтобы определить направления движения вещества» (Заварзин, 2003). Таким образом, очевидна потребность в методах отбора и подготовки биоматериала, в частности – микробиологических препаратов, из естественной среды с сохранением системы физико-химических связей между клетками, проявляющихся в: сопряженных межвидовых и популяционных (а рамках парагистологии сообществ по Г.А. Заварзину) редокс-процессах, межвидовом переносе электрона, молекулярной диффузии, синтрофии и т.д. Это нужно для обеспечения исследуемости межвидовых (теоретически, и межштаммовых) взаимодействий в изолированном из среды препарате микробного сообщества / экосистемы. В дальнейшем – менее важно то, каким методом, позволяющим получить соответствующие вышеописанному списку сведения, будет исследоваться тот или иной образец, но желательна совместимость с множеством методов, что не всегда достижимо при использовании одиночных кювет, чипов и т.д.,

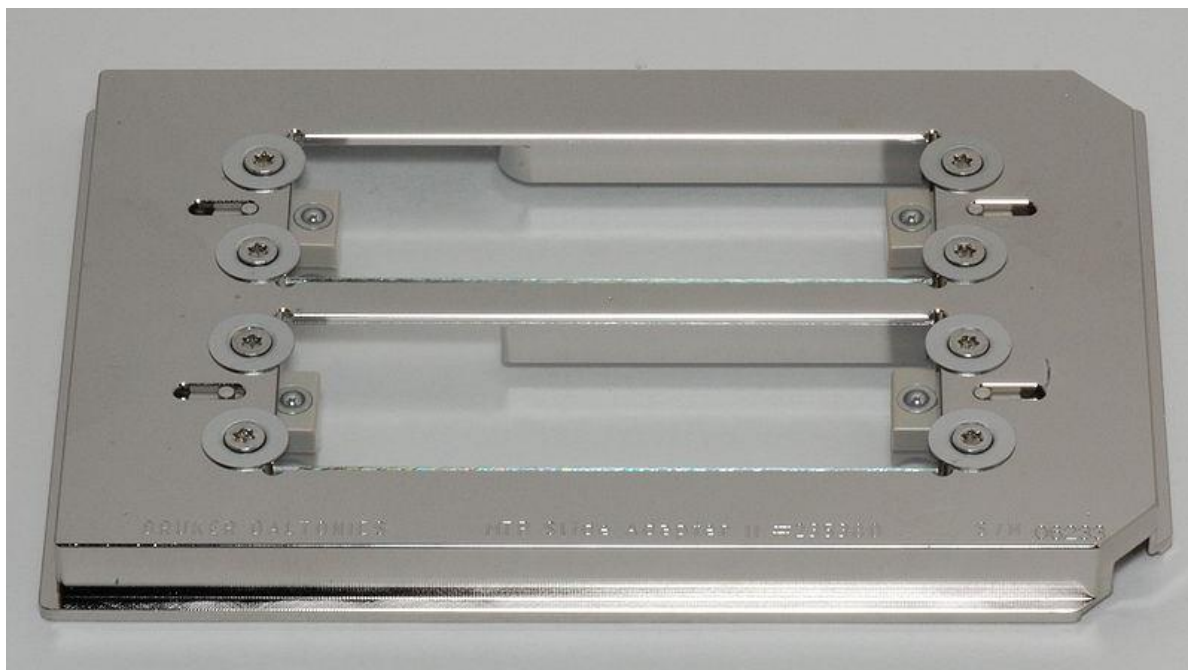
специализированных для какого-то определенного метода (например – MALDI). Цель унификации – возможность анализа множеством методов без переноса образца из кюветы в кювету или с картриджа для метода А на картридж для метода В, во избежание изменения и нарушения структуры связей в сообществе, поскольку обратное может вести к артефактам. В связи с прогрессированием и специализацией аналитической техники, возможно, логичным было бы возвращение к более ранним геометриям устройств забора образцов в естественной среде, не являющимся узкоспециализированными для решения задач на конкретных даже не марках (что свойственно современному коммерческому тренду), а типах приборов.



**Рис. 13.** Внешний вид и принцип действия пластинок обрастания Росси-Холодного (Diaz, 2013; Coffman, 2014; Kumari, 2014; Faryal, 2014)

Известно, что для отбора микробиологических проб в естественной биогеохимической обстановке, в частности в почве, болотных средах и т.д. в XX веке использовались пластинки обрастания, разработанные Н.Г. Холодным, представлявшие модифицированные пластинки метода Росси, экспонировавшиеся в течение длительного времени (в классической версии, в частности, описывавшейся В.Л. Омелянским – от трех недель) в среде / почве (это же может производиться в лабораторных условиях в почве, размещенной в специальных сосудах – как в методе Кона), после чего подвергавшиеся микроскопированию (иногда с культивацией во влажной камере – как в методе Крючковой, в т.ч. – с подсчетом по методу Виноградского), а также анализу посредством выращивания на элективных средах (пример: метод Гильтнера-Штермера) либо добавления питательного раствора напрямую в почву на пластинке – как в видоизмененном методе Реми (по Фишеру, Фогелю, Коху и др.). Достаточно полный список с описанием особенностей каждого метода дан Омелянским в 1922 г. в первом русскоязычном методическом пособии по практической микробиологии, переизданном с дополнениями, в том числе в этом разделе, в 1940 г. (Омелянский, 1940). Также данная тематика затронута

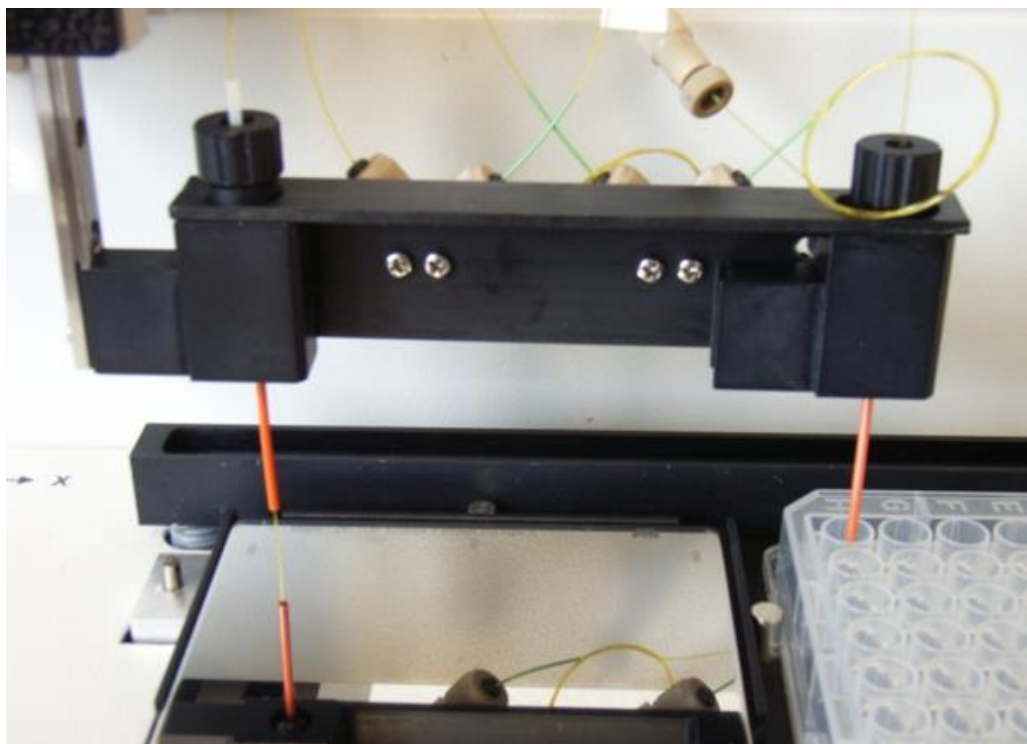
им в кратком курсе общей и почвенной микробиологии (Омелянский, 1929). Можно полагать, в соответствии со статистикой цитирования и использования данных методов, что эта техника была популярна у советских почвоведов и почвенных микробиологов, начиная с 1930-1940-х гг., однако основное развитие указанные техники получили в Европе и, отчасти, позднее – в США. Преимущественное развитие в Европе, в особенности – в Германии, было связано, по очевидным соображениям, с тем, что работы отцов-основателей данного направления, в том числе – Н.Г. Холодного, были опубликованы на немецком языке (Cholofny, 1928, 1929, 1936) или, по крайней мере, в немецких журналах (Cholodny, 1934), а немецкий язык выполнял до (по) 1930 гг. функцию доминирующего в науке, что обуславливалось высоким уровнем работ немецких авторов и качеством немецкого приборостроения, обеспечивавшего этот уровень. Впоследствии много работ с использованием пластинок обрастания и почвенных камер типа Росси-Холодного было выполнено в англоязычных и иных странах; они были опубликованы в англоязычных журналах (D'Aeth, 1939; Blair, 1943; Oppenheimer & ZoBell, 1952; Sulochana, 1952; Chesters & Thornton, 1956; Coole, 1956; Jannasch, 1958; Durbin, 1961; Agnihothrudu, 1962; Forest, 1962; Hirsch & Pankratz, 1970; Palmer, 1970; Prasad, 1977; Nair, 1979; Pipe & Cullimore, 1980; Cullimore & Pipe, 1980; etc.). При этом исследованию подвергались не только обычные для данного метода объекты – почвенные бактерии, но и почвенные микроводоросли, грибы и их споры, и почвенные простейшие, которые могут быть фиксированы или адгезированы на пластине или в почвенной камере. За прошедший век разработан ряд вариаций методов, делающих пластины, камеры Росси-Холодного и почвенные камеры более удобными для их последующего исследования. В частности, были разработаны методики имплантированных слайдов (Pipe & Cullimore, 1980), пластинок обрастания на базе полиэтилентерефталата (т.е. полиэтиленгликольтерефталата, также известного как лавсан, майлар, хостафан, мелинекс), являющихся одноразовыми, в противовес стеклянным и кварцевым прототипам (Moshynets et al., 2011), пластинок обрастания на базе мембранных фильтров (Jannasch, 1958), а также – в наиболее прогрессивной версии – совместимых с электронной микроскопией пластинок на базе стандартных сеток для фиксации образцов просвечивающей электронной микроскопии (Hirsch & Pankratz, 1970). Однако основной и наиболее доступной версией для специалистов долгие десятилетия являлись пластинки на основе обычных предметных стекол. Типичный внешний вид и принцип действия такой пластинки обрастания на базе предметного стекла с адгезированными в результате экспонирования фрагментами почвы и микрофлоры показан на рис. 13. Эта техника является популярной до настоящего времени в латиноамериканских и иных неанглоязычных странах, а подобные изображения кочуют из одной презентации в другую (Diaz, 2013; Coffman, 2014; Kumari, 2014; Faryal, 2014). В MALDI-имэджинге есть ряд специализированных устройств, которые по входному каналу вполне совместимы с данным типом пластинок обрастания, представляя собой рамку с микровинтовыми фиксаторами для зажима предметных стекол, как это показано на рис. 14. Это является более прогрессивным и неразрушающим методом, так как нанесение анализа осуществляется не путем дроблетно-диспергирующей инфузии из пробоотборника или 96-луночных планшет (как это показано на Рис. 15), а естественным путем, за счет физико-химических взаимодействий в природной среде (хотя проблема совместимости с MALDI этим не решается в полной мере, поскольку на практике приходится обеспечивать совместимость полимерной матрицы и техник фиксации/адгезии между биопленкой и подложкой, что опосредованно полимерной матрицей).



**Рис. 14.** Кассета MALDI imaging target, состоящая из фиксатора и предметных стекол.  
Источник: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MALDI\\_imaging\\_target.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MALDI_imaging_target.jpg)



**Рис. 15а.** Программно-аппаратный комплекс для программируемого нанесения проб для MALDI-имэджинга (SunCollect Systems – с сайта CHEMEUROPE.COM)



**Рис. 15б.** Непрерывное нанесения элюата на пластину напрямую из 96-луночных плашек

Однако существует ряд очевидных проблем, не позволяющих использовать пластинки обрастания и почвенные камеры Росси-Холодного по прямому назначению – для реального *in situ* (в реальном масштабе времени, “online”) анализа почвенной микробиоты. Во-первых, невозможность наблюдения за состоянием колонии / биопленки в реальном времени, в силу нахождения образца в природной почвенной среде, делает невозможным мониторинг ряда ключевых показателей роста и реконструкцию его кинетики. Для приготовления препаратов в рамках визуализации т.н. «микробных пейзажей» (по Теппер) требуется пробоподготовка, занимающая много часов времени и не являющаяся неразрушающей (по отношению к тому либо иному множеству микроорганизмов и фрагментов биокосной естественной среды). Во-вторых, потребность в окрашивании (зачастую – селективном окрашивании) микрофлоры в целях обеспечения эффективного подсчета при микроскопии (особенно – люминесцентной) смещает реальные биохимические характеристики компонентов микропрепарата, благодаря чему эффективное окрашивание и популяционный (популяционно-видовой) анализ пробы становятся антонимами её компартментного биохимического анализа. В-третьих, отсутствие кинетических коррелятов (в силу отсутствия телеметрической передачи данных с пластинки обрастания или почвенной камеры на ресивер) делает невозможным реконструкцию стадий развития колонии / микробной популяции / биопленки / микробного мата, а от стадийности зависит химизм и характер интерпретации химизма данного образца, репрезентируемой им природной среды и адекватность их некоторой стандартной модели (обратно коэффициенту невязки). Мы не можем понять на какой фазе (лаг-фазе или иной) находится популяция, что ведет к тому, что: наблюдая результат выемки образца в отдельной временной точке, нельзя определить принадлежность этой точки к тому или иному кинетическому интервалу и – как следствие – реальную объективную характеристику состояния образца и природной среды в биогеосистемном / биогеохимическом смысле, то есть – охарактеризовать оптимальность по критерию воздействия на рост популяции данной среды и фенологические ритмы роста для данного типа среды, от чего зависит динамика продукционных процессов (биопленок, матов и пр.), элективных или специфичных по биогеохимическим критериям к ней как к субстрату либо действующему агенту регуляции (Ризниченко, Рубин, 1993; Ризниченко, Рубин, 2004). В-четвертых, все попытки использования селективной выемки одиночных пластин в разные временные интервалы при массовой (до нескольких тысяч) закладке, приводят (не говоря о трудоемкости этого подхода) к постепенному изменению размеров выборки, статпараметров

и гетероскедастичности результатов разных прогонок. Допустим, итоговый результат счета / цитометрии определяется для 50-100 пластин, прошедших полный курс контаминации (3-7 месяцев), а в ходе эпизодического анализа за данный период времени осуществлялись пять-десять выборочных (вопрос «по какому критерию отбирались пластины» решить нельзя, по причине субъективности визуальных оценок микробной контаминации в полевых условиях) выемок при разных (не контролируемых на уровне индивидуальных пластин или в целом на экспериментальном поле) условиях, причем исходное число пластин было порядка от сотен до тысячи с лишним. В ходе гидробиологически и фенологически обусловленного («средой обростания») изменения численности одних микробных популяций относительно других [в силу конкуренции; полной элиминации ряда видов из-за неоптимальности климатических или иных средовых (биогеохимических/биогеосистемных) условий; физически-различной устойчивости данных видов/популяций к процессам пробоподготовки на разных стадиях и фазах выемки (то, что почвенная среда с микроорганизмами подчиняется законам адгезии и сорбции / десорбции, диффузии и многофазной адвекции, электростатическим принципам, статистике дисперсных систем и частиц – признанный с XX века факт, требующий анализа с позиций физической и коллоидной химии)]; индивидуальной реактивности-резистентности отдельных колоний/микроразнообразий, картируемой по областям их локализации в почве, в силу аллелопатии] произошло многократное неординарное смещение баланса среды, включая определяющие состояние статистики популяционно-биохимические показатели, в результате чего выборки ранних этапов и выборки поздних этапов выемки («разнофазные») являются статистически несовместимыми при прочих равных. Очевидно, что преодоление в корне факторов статистической нерепрезентативности и кинетической несовместимости для биогеосистемного микробиологического комплекса данного эксперимента осуществимо не в рамках унификации биогеохимических и аллопатических условий в поле (до уровня чистого лабораторного эксперимента), а в рамках учета полного комплекса факторов и телеметрии / центрифугирования кинетического анализа для скоррелированного анализа разных популяций / колоний различного таксономического и геоэкологического характера. Для этого необходим аппаратный базис, включающий в себя, как минимум: совокупность активных сенсоров с не менее, чем одним картирующим распределение плотности популяции элементом; ресивер и передатчик для сбора данных с временным разрешением; программно-аппаратный модуль / драйвер для многоканального синхронного анализа (сбора-обработки) данных и отправки их в память ПК для последующей обработки в статистических пакетах с установлением различий в локализации и колокализации соответствующих переменных на карте, зарегистрированной позиционно-чувствительным сенсором.

Нами были предложены технологии аппаратного обеспечения вышеуказанных задач и способы анализа, удовлетворяющие вышеуказанным требованиям. В частности, в качестве позиционно-чувствительного (картирующего) сенсора было предложено использовать ПЗС- и КМОП- матрицы, чувствительность которых в интегрирующем режиме (или режиме счета фотонов с интегрированием по времени) достаточна для анализа хемилюминесценции либо (тождественно) биолюминесценции микробных популяций и сопряженных с ними сред или биогеохимических / биогеосистемных (не только косных) субстратов. Это – технологические принципы люминесцентной безлинзовой микроскопии. В качестве измерительной системы с многими датчиками использовались герметизированные в полимерный носитель схемы на современной элементной базе, однако этот подход не позволял картировать образец. В связи с этим, был осуществлен переход на уровень тонкопленочной (в том числе – спин-коатинг с интеркалированными сенсорными агентами) технологии ([Gradov and Jablov, 2016](#); [Gradov, 2017](#)). Данные аналитические системы на интерфейсе матрица-почва или, точнее, матрица-покровное стекло-почва (электрохимически-обезопасенное от сбоя) позволяли не только картировать распределение плотности популяций частиц / микроорганизмов и проводить в реальном времени их (условную, если по флуоресцентному гало) «гранулометрию» (то есть – цитометрию в случае кокковых форм), но и взаимно-однозначно сопоставлять различные по физической природе переменные на их пиксельных картах в псевдоцвете (pseudocolor) и ASCII-представлении кодов дескрипторов, устанавливая колокализацию последних. Чистое оптическое детектирование было применено для анализа отдельных модельных микробных и микологических дрожжевых форм с временным разрешением, что позволило говорить не

только о фиксации отдельных точек состояния системы (временных срезов), но и о развитии и физиологических его механизмах. Например, осуществимо применение «микроскопии на чипе» в реальных условиях для кинетической морфометрии грибов-микромикетов на чипе, фиксации морфогенеза и кинетики хронологического (или клонального) старения дрожжей (Градов и др., 2017а), а в экспериментальных условиях возможна регистрация методами лазерной видеомиллиосмометрии голофитного (осмотрофного) питания дрожжей на чипе (Градов и др., 2017б).

Первые агро-почвенные и эдафологические закладки чипов чисто оптического плана осуществлены в 2010-2012 гг. (Градов, 2012а–в; Gradov, 2012), причем трансляция велась по телеметрическому каналу (2.4 ГГц, 1.9 ГГц и альтернативные частоты приемопередачи). Приборы лабораторного применения с лазером или спектральнонабором лазеров в качестве источника излучения проекции имели в программном обеспечении возможность определения стадий жизненного цикла (и деления например, с различением цитотомии и цитокинеза) клеток (Oganessian et al., 2015; Градов, Нотченко, 2017). В приборах полевого применения специального назначения был внедрён качественно-новый селективный радиовизиографический принцип визуализации паттерна радиоактивной контаминации почв – на базе тонкослойных сцинтилляторов с различным квенчинг-фактором для отличных типов излучений (Градов, 2015а). Для идентификации на планарной поверхности результирующего сенсора микроорганизмов (грамположительные/грамотрицательные) был использован магнитооптический преобразователь («flux-detector» без перехода через точку Кюри – для полевых условий или совместимый с MALDI лазерный вариант с переходом через точку Кюри – для специфицированных лабораторных условий), в результате чего была имплементирована возможность сопряжения описанного комплекса с магнитной вариацией методик окрашивания по Граму (Budín et al., 2012).

Очевидно, что использование планарной или поверхностно-структурированной схемы межфазового сопряжения почва-интерфейс, в которой интерфейсом является поверхность с заданными свойствами, определяемыми свойствами используемых микропреобразователей, обеспечивает возможность проведения кинетических измерений в реальном времени (т.е. *in situ* – в биологических терминах) без обработки красителями и цитометрическими метками, давая возможность последующего анализа методами атмосферной масс-спектрометрии при использовании лазерной десорбции-ионизации (не обязательно только MALDI). Принципы совместимости оптических флуоресцентных измерений с MALDI была описана коллективом разработчиков в 2014-2016 г. (Orekhov et al., 2016), однако исследования не были доведены до решающей стадии в силу организационных причин. До этого была предложена методика сопряжения флуоресцентных кинетических и мембранно-электрофизиологических работ на биоматериале (Alexandrov et al., 2015), позволяющая, в частности, отличить физиологически активные клетки (в том числе – клетки микроорганизмов при планарном популяционном патч-клампе на чипе) от неактивных. Вместо полимерных матриц для MALDI рационально в ряде случаев использовать собственные свойства частично-упорядоченной почвенной среды (рассматриваемой как фон и как реактивный агент одновременно), чтобы обеспечить метод прямой масс-спектрометрии для атмосферного применения в нативной кондиции образцов, однако до разработки алгоритмов для этой задачи в рамках имевшихся условий дойти мы не имели возможности. Теоретически, решение задачи неинвазивных исследований клеточных структур (в том числе – колоний микроорганизмов) в данном контексте совместимо также и с микроскопией без флуоресцентного окрашивания (Skrynnik, 2015), которую разрабатывал до сокращения с полставки бывший сотрудник ИНЭПХФ РАН Скрынник, которому были по этой причине переданы так и не принесшие эффекта в данных условиях оптическая скамья и лазерные столы, азотные и твердотельные лазеры, оптомеханика, модуль прокачки лазера на красителях, комната с подводкой для насосов, микроспектрофотометр, оборудование для измерений. В настоящее время работы приостановлены, а институт терпит реорганизацию с присоединением в состав ФИЦ; комната расчищается для установки масс-спектрометра для приложений, не имеющих отношения к тематике настоящего исследования и тематике исследований Скрынника. В данных условиях мы считаем целесообразным опубликовать некоторые не только базовые / экспериментальные результаты, но и пропозициональные пункты программы исследований и разработок в данной области. Работы по MALDI-совместимой микроскопии на чипах нами были продолжены в усеченном варианте – в

формате безлинзовой микроскопии на чипах с лазерным сканированием (что даёт возможность использования чипов также как сенсоров в задачах почвенной реологии и микрокриологии почв, по аналогии с целями смежных работ (Orehov, Gradov, 2017; Zaytsev et al., 2017), однако их масс-спектрометрический аспект сведен к нулю.



**Рис. 16.** Идентификация по штрих-коду перед биотайпингом. Возможность избежать этого достигается в предлагаемой нами схеме за счет регистрации комплекса иных физических свойств образца в целом и сверхточной комплементарной идентификации конкретного образца или типа образцов по базе данных с несуррогатным ключом, определяемым собственными физическими параметрами объекта в их уникальном сочетании

Из развивавшегося масс-спектрометрического и имэджингового направления осталась алгоритмика и идеология фингерпринтинга, адекватная аналогичным методам для других наборов данных. В качестве наборов данных используются, однако, не масс-имэджинговые паттерны, а паттерны распределения физических свойств, полученные путем конвертации в аналоговых тонкопленочных преобразователях неоптического сигнала в оптический сигнал с позиционно чувствительностью, обеспечиваемой дискретной структурой преобразователей или/и дискретной (пиксельной, сенсельной, ресельной) структурой ПЗС-/КМОП-детекторов (Градов, 2016). При этом в качестве носителя преобразователя может использоваться среда проращивания микроорганизмов, а её структурные свойства (как soft matter, включая почву) могут использоваться как основа для естественной самосборки микрофлюидных топологий, обеспечивающих межклеточный массоперенос в условиях экспозиции (Градов, 2015б). Этот, по существу, эмерджентный подход, сопрягающий формирование чипа и экспонирование в почве, идентификацию и измерение в реальном времени по «онтологически-имманентным объекту исследования» дескрипторам, модификацию поверхности и самомодификацию или сопряженную (а следовательно – метрологически-самоскомпенсированную) модификацию объекта исследования и предмета исследования (синхронизированным изменением пулов дескрипторов) обеспечивает корректность исследований в реальном времени (относительно измерения после выемки на масс-спектрометре) и в комплексе (при алгоритмическом учете всех перечисленных факторов, что является, само по себе, сложной нерешенной задачей) не уступает иным одиночным физическим методам по теоретически-исчислимой корректности идентификации.



### Целесообразность внедрения гибридных активных чипов, совместимых с MALDI / LDI в биогеосистемный анализ с микробиологическими базами

Целесообразность использования устройств, совмещающих в себе свойства пластинок обрастания и почвенных камер со свойствами активных детекторов и мишеней для MALDI или иных LDI обуславливается широким диапазоном применимости образцов-прототипов – самих приборов Росси-Холодного. Ниже приводятся некоторые чисто библиографические и справочные по своей неполноте примеры использования почвенных пластинок и камер для анализа природных сред:

1. Исследовались собственно почвенные микроорганизмы, в том числе для технической или прикладной микробиологии (Hirte, 1965; Prasad, 1977; Cullimore, Pipe, 1980).
2. Исследовались почвенные грибки (D'aeth, 1939; Chesters and Thornton, 1956) и споры грибов (Nair, 1979), а также эффекты вегетации мицелия (Brown, 1958).
3. Исследовались почвенные микроводоросли как сообщество и эффект воздействия на них ряда химических агентов, в частности – гербицидов (Forest, 1962; Pipe, Cullimore, 1980).
4. Исследовались воздействия почвенных условий на заболевания корневой системы и микоризные эффекты (Sulochana, 1952; Rhizoctonia solani, biology and pathology, 1970).
5. Исследовались эффекты колонизации искусственных обнажений микроорганизмами (Cooke, 1956).
6. Исследовалась микрофлора пресноводных водоемов, особенно – источников питьевой воды (Långmark et al., 2001).
7. Исследовались бактериальные популяции морской воды, причем использовали ряды компаративных комплементарных дескрипторов, получаемых с разных источников и методик подсчета (Oppenheimer and ZoBell, 1952).

Номенклатура исследуемых позиций для почвенных камер и пластинок обрастания не уступает номенклатуре аналогичных пунктов для MALDI-биотайпинга, включающей в себя, помимо патогенных бактерий: грибки, в частности – плесени, дрожжи и патогенные грибки (Yan et al., 2011; Theel et al., 2012 ; Lohmann et al., 2013 ; Mancini et al., 2013; Schmidt et al., 2014; Schulthess et al., 2014b; Chen et al., 2015; Fraser et al., 2016; Wang et al., 2016b; Lee et al., 2017; Wilson et al., 2017); низшие растения – одноклеточные зеленые водоросли, такие как хламидомонады (Krismer et al., 2015, 2016); некоторые цианобактерии (Imanishi et al., 2017). При этом видовой (видоспецифичный) химико-таксономический аспект данной проблемы и имплементации метода позволяет идентифицировать не только принадлежность препарата к некоторому таксону (например – *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Listeria* (Hsueh et al., 2014)) или отдельным его видам (например, для *Staphylococcus* (Richter et al., 2012), *Acinetobacter* (Alvarez-Buylla et al., 2012), *Acanthamoeba* (Del Chierico et al., 2016)), либо фиксировать наличие целевого («таргетного») вида в данной пробе, специфичного для того или иного состояния её источника (например, *Staphylococcus aureus* в биомедицинских и ветеринарных диагностических пробах (Szabados et al., 2010) или прямой диагностический мультиплексный тест на N-таргетную обсемененность в сепситайпинге крови (Buchan et al., 2012)), но и отдельные штаммы или биохимически-детерминированные расы организмов в связи с прямым молекулярно-химическим анализом, обеспечиваемым применением масс-спектрометрии. Ускорение идентификации в подобных случаях (Sogawa et al., 2011) обычно достигается не только итеративным сужением спектра идентификации согласно таксонам и идентифицируемым группам организмов (например, первое сужение для бактерий может в случае клинической диагностики представляться опосредованным базами данных делением на грамположительные и грамотрицательные), но и применением систем сепарации форм в ходе пробоподготовки и пробоподачи образца в рамках расширенных техник т.н. «automated microbiology» (Saffert et al., 2011). Внедрение морфометрических операций в проколах такого рода обеспечивается в лабораторных условиях лазерными сканирующими техниками либо в полевых условиях – обычной микроскопией (хороший пример этого явила одна из наиболее ранних инициативных биогеохимических экспедиций членов нашего коллектива (в ГЕОХИ РАН), в которой в полевых условиях (а затем – в лабораторных условиях для обеспечения биостатистической сопоставимости результатов измерений) использовалась микроскопия на МЛД-2 – микроскопе люминесцентном дорожном, который после доставки почвенных сред

и микропрепаратов на базу встраивался в автоматическую установку панорамного подсчета с осциллографической регистрацией при видеомикроскопии – см. [Рис. 17](#)). Недостатки этого подхода, впрочем, очевидны: перенос образцов с прибора на прибор обеспечивает неполную воспроизводимость паттернов и отсутствие возможности их совмещения или сопоставления – тем более, что для динамических измерений в реальном времени это не подходит, так как в данных протоколах с временным разрешением производится либо измерение параметра А, либо измерение параметра В (либо цитоморфометрия – либо масс-спектрометрия, то есть – либо морфологический / либо биохимический анализ; либо идентификация – либо анализ определенного).



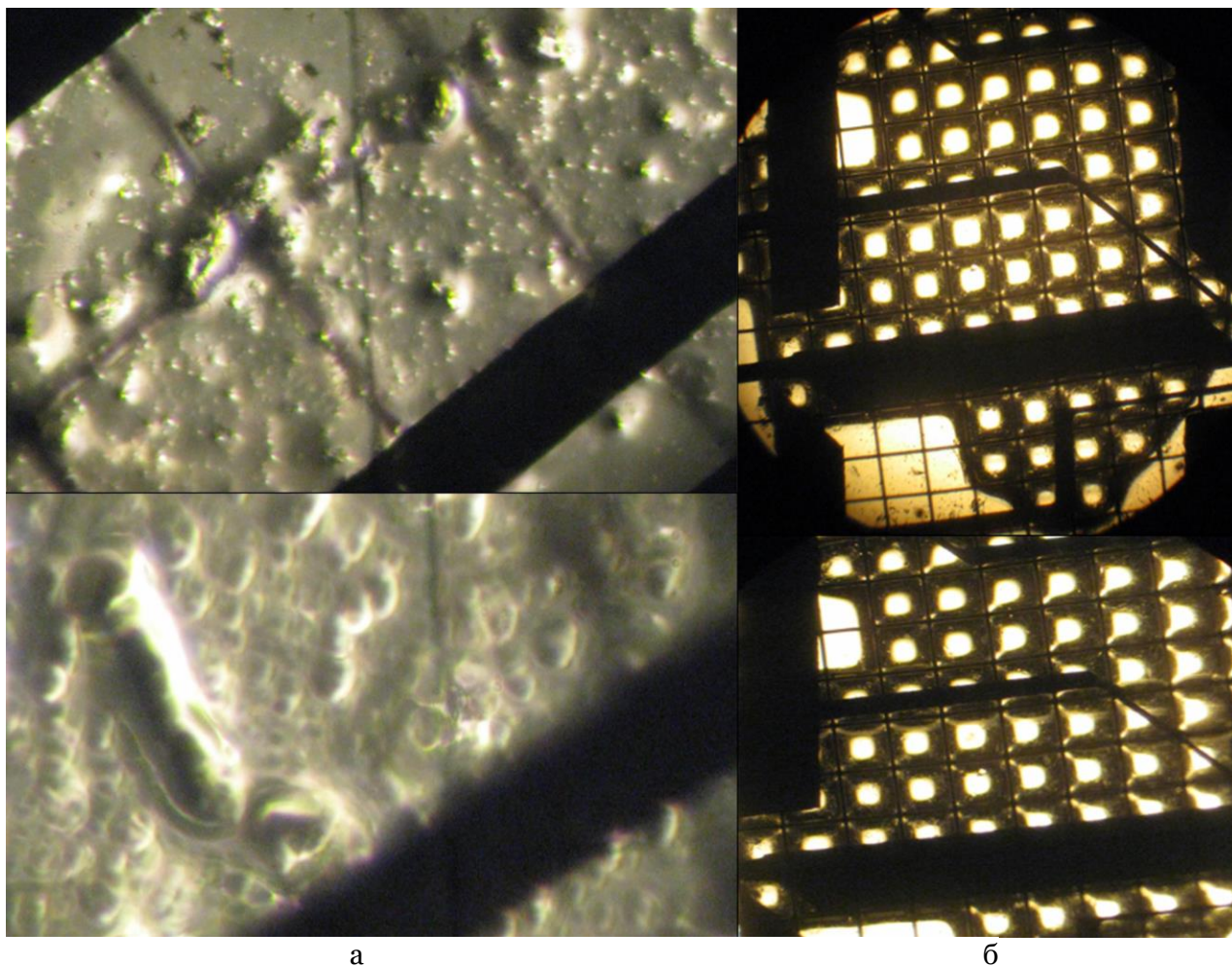
*Установка для построения 3D-профилей люминанса на основе люминесцентного микроскопа с системой видеорегистрации.*

**Рис. 17.** Установка панорамного подсчета частиц с осциллографической регистрацией при видеомикроскопии на базе микроскопа люминесцентного дорожного ([ГЕОХИ РАН, 2011](#))

Достаточно очевидно, что преодоление проблем подобного рода возможно только при совмещении идентификации и измерения в реальном времени, что достигается в настоящее время чипами нашей конструкции (см. выше). Это искореняет недостатки протоколов масс-спектрометрии MALDI с цитометрическим анализом ([Wang et al., 2013](#); [Chang et al., 2014](#); [Rawlins et al., 2015](#)), однако позволяет достигать сопоставимого с MALDI MS уровня анализа

и идентификации только при совмещении с последней, что требует рассмотрения КМОП- или ПЗС-детектирующих чипов с антиалиасным фильтром как платформ MALDI-имэджинга на чипе (естественно, одноразовых, так как большинство ПЗС- и КМОП-матриц повреждаются за счет физического выжигания и SEU [single event upsets] при попадании на них лазерного излучения достаточной для десорбции-ионизации мощности или одиночных фотонов того же характера воздействия). Это формирует качественно новый сегмент номенклатуры чипов для масс-спектрометрического анализа и MALDI-чипов, известных как продукт с начала XXI века (Kling, 2001) и эффективно развивающихся на экзотических геометриях до настоящего времени (Chen et al., 2010, 2011; Li et al., 2017). Предлагаемый конструктив не только выдаёт данные в активном формате приемопередачи с возможностью мониторинга, замещающего как MALDI-чипы с мониторинговыми окнами (Brivio et al., 2005), так и чипы, совместимые с флуоресцентным анализом (Halim et al., 2009), но и позволяет реализовывать мониторинг в реальном времени с выемкой образца для масс-спектрометрического анализа на известной в результате предварительных динамических измерений (с временным разрешением) стадии, предварительно (на менее высокоэнергетическом режиме лазерной обработки) осуществляя кинетические фотохимические измерения типа FRAP и FLIP. Таким образом, осуществляя в рамках АРИЗ (алгоритма решения подобных задач Альтшулера) определение противоречий прототипов и противопоставляемых моделей, мы приходим (без использования синектики и морфологического анализа перебором) к совмещению несовместимых протоколов.

Надо сказать, что при адаптации для MALDI с полимерной матрицей и при подгонке к условиям имплементации в варианте чипа мы использовали богатейший опыт устаревших к настоящему времени, однако достаточно актуальных в модифицированном формате КМОП-чипов методических источников. Так, прототипом дискретной матрицы на поверхности или в экранировке ПЗС- или КМОП- чипа почвенного заложения явилась модификация камер и пластинок обрастания Росси-Холодного с электронно-микроскопическими сетками для СЭМ от 1970-го года (Hirsch, Pankratz, 1970); идеологии синхронного удержания и анализа в чипе – технология фиксации бактерий планктона на мембранном фильтре, заменяющем камеры и пластинки обрастания Росси-Холодного (Jannasch, 1958) от 1958 года; идеологию введения полимерных покрытий, непосредственно связываемых с полимерной планарной подложкой чипа, особенно – напечатанного из PET на 3D-принтере, предвосхитили с позиций подходов DIY-оптимизации (в более легком и подобном нашему решению только по материалу – PET) наши украинские коллеги (Moshynets et al., 2011), хотя в MALDI предпочтительны известные типы полимеров-матриц и, если говорить о совместимости с MALDI, то ставку нужно делать на них и на полимер-иммобилизованные матричные имплантаты на их основе. Однако для данного случая есть и альтернативное решение – безматричная масс-спектрометрическая LDI-вариация клеточного анализа по вторичным метаболитам (Hölscher et al., 2009). Почва является «приемником», «накопителем», «линией задержки» и «трансмиссером» факторов аллелопатии и биохимических сигналов микроорганизмов, поэтому можно использовать её свойства в создании (самоорганизации) на её адгезивно-сорбционной основе замещающих MALDI-матрицы развитых soft matter поверхностей на базе частично-упорядоченных сред с динамической структурой, определяемой взаимодействиями в дисперсной системе – между почвой и биохимически-активными/биохимически-индивидуальными микроорганизмами – происходящими на уровне микровязкостных эффектов, микрофлюидики / нанофлюидики и процессов на базе нековалентных взаимодействий, в комплексе обеспечивающих MALDI-совместимый анализ, адекватный микро-/нанофлюидике и аффиметрическим биочипам в едином конструктиве. Это позволяет заменить, соответственно, безматричную аналитику на LDI-платформах в микрофлюидных носителях (Yang et al., 2016), нативное картирование по флюидным потокам и силам в частично упорядоченной биогенной полимерной и биокосной матрице (Guillaume-Gentil et al., 2017) с аффиметрикой на адгезирующих и сорбирующих чипах. Пример иммобилизованной частично-упорядоченной среды на чипе с микросетками (типа описанных в (Hirsch, Pankratz, 1970), только не формаваровых, а проводящих сеток от электродных элементов электронных и ионных приборов для био-электрофизических работ при морфометрии с передачей *in situ*, в реальном времени) нашей конструкции приведен на Рис. 18.



**Рис. 18.** Пример иммобилизованной частично-упорядоченной среды на чипе с сетками от электродных элементов электронных и ионных приборов для био-электрофизических работ и электрофизического мониторинга почвы при морфометрии микроорганизмов с передачей аналитического сигнала по телеметрическому каналу *in situ*, в реальном времени. а – проба частично-упорядоченной среды под большим увеличением на сетке на чипе; б – нанесение полимера для интеркаляции преобразователя и аппликации микрообразца на сетке на чипе.

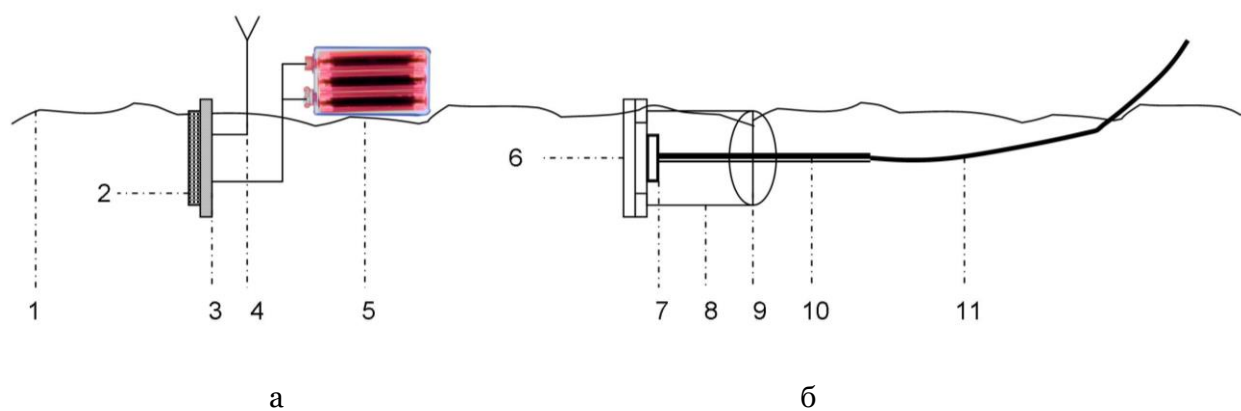
Таким образом, данный принцип существенно упрощает анализ природных частично упорядоченных сред и био-косных ассоциатов. О рациональности и необходимости данного подхода, обусловливаемой, в частности, отсутствием оптимальных средств пробоподготовки («универсальной пробоподготовки») мультитиповых природных образцов для MALDI (т.е. и для MALDI-биотайпинга), говорит тот факт, что в «природоведческой» микробиологии (по терминологии Заварзина) и фундаментальной систематической микробиологии количество работ по LDI-микробиологической идентификации с матричной активацией отсчитывается единицами (Santos et al., 2016; Welker and Moore, 2011), в то время как в клинической – идёт на десятки в год с тенденцией к росту (на данный момент – сотни работ): например – 2010 г. (Seng et al., 2010; Dupont et al., 2010; De Bel et al., 2010; Bizzini et al., 2010; van Veen et al., 2010); 2013 (DeMarco and Ford, 2013; Barreau et al., 2013; Patel, 2013a; Patel, 2013b; Kok et al., 2013; Clark et al., 2013; Seng et al., 2013; Wojewoda et al., 2013; Moon et al., 2013) и т.д. (сборка контрольной библиографии для выявления релевантности темы дана для этапа завершения предварительного этапа работ над прототипом нашего устройства в ГЕОХИ РАН – не ранее 2011 года, и подготовки первой версии данной статьи; не более 4 лет назад). Целесообразно рассматривать «природоведческую микробиологию» на уровне отдельных микроструктур, в частности – ассоциатов клеток, колониеобразующих единиц, поэтому, с экобиохимических позиций, необходимо предъявить доказательства применимости как MALDI-MS-технологий, так и чипов с APS (Active Pixel Sensor) нашей разработки для анализа подобных структур.

На практике, MALDI-MS достаточно давно работает на уровне одиночных клеток в витальном и суправитальном состоянии (Masujima, 2009), причем не только в аддитивно-биохимической, но и в модальности «картирующей», имэджинговой масс-спектрометрии одиночных клеток (Boggio et al., 2011; Passarelli and Ewing, 2013; Schober et al., 2012;). В настоящее время MALDI на уровне одиночных клеток (впрочем, как правило, достаточно крупных эукариотических) и клеточных ассоциатов используется для определения: стадий зрелости пролиферативных клеток (Shimizu et al., 2002); интрапопуляционной метаболической гетерогенности многих одноклеточных организмов (Amantonico et al., 2010); классификации крупных популяций, в том числе – одноклеточных микроорганизмов типа *Chlamydomonas sp.* (Krismer et al., 2015), в том числе – с выявлением аномальных клеток, выделяющихся из общей выборки (Ong et al., 2015); биохимических профилей клеток, например – дрожжевых (Schmidt et al., 2014), не только по отдельным классам веществ (например – пептидам (Li et al., 2000; Rubakhin et al., 2008) или липидам (Mach, 2012; Hossen et al., 2015)), но и на уровне метаболомики в целом (Emara et al., 2017); уровня накопления и пространственного распределения цитотоксичных и регулирующих фармацевтических веществ, воздействующих на клеточный цикл (Chang et al., 2015). Однако, также как и у биотайпинга (Ngan et al., 2012; Lévesque et al., 2015), у этого подхода (Boggio et al., 2011) есть один недостаток, обусловленный превалирующим для него «заказчиком» – медициной: основная часть имэджинговой MALDI-масс-спектрометрии на данный момент адаптирована, преимущественно, для клинических задач, примерами чего в случае анализа и имэджинга одиночных клеток могут являться нейробиохимические (Neupert et al., 2005; Perdian et al., 2010), гематологические (в том числе – эпидемиологические – как на биотайпинге (Hsueh et al., 2014; Cheng et al., 2015; Fiori et al., 2016; Chien et al., 2016) и другие специфические медицинские задачи. На уровне клеток микроорганизмов работ крайне мало – сказывается не столько техническая сложность задачи, сколько отличие от метаболизма и конституции эукариотических клеток высших животных, а также необходимость учета сред, не являющиеся биологическими (как это характерно для лабораторных условий), имеющих собственные элементарно-химические / конституэнтные профили (почва, гидрохимические и литохимические условия и т.д.), которые нужно учитывать, наряду с такими же профилями одиночных клеток (Walker et al., 2012; Gao et al., 2013; Klepárník, 2013; Fu et al., 2016), что может осложняться собственными средовыми требованиями микроорганизмов (например – анаэробным характером микрофлоры (Shan et al., 2002)). Таким образом, если не принимать во внимание неразработанность темы и ряд преодолемых технических трудностей, MALDI-имэджинг способен работать в требуемой нами модальности (см. выше). Однако, несмотря на это, мапирование (или, тождественно, маппинг) колокализации, отображение онтологий и установление изоморфизма (или иных морфизмов) между зонами картирования различно детектируемых дескрипторов возможно тогда и только тогда (согда), когда разрешение у их источников данных или детекторов эквивалентно или сопоставимо настолько, что проблема неопределенности пограничных зон колокализации дескрипторов автоматически снимается в силу их взаимно-однозначного соответствия по дискретизации и смежным параметрам (по терминологии 1970-1980-х гг. – «резольвометрическим»). Поэтому мы должны показать, по меньшей мере, что разработанные нами лаборатории на чипе, совместимые с имэджингом на LDI-опосредованном, в частности – MALDI-опосредованном, базисе, могут фиксировать и картировать паттерны достаточно высокого требуемого разрешения.

### Новые методы и материалы

В качестве детектирующей части, совмещенной с подложкой, использовали матрицы с активным пиксельным сенсором (APS), изготовленные по КМОП-технологии. Пиксельные/сенсельные/ресельные параметры контролировались резольвометрически при различных длинах волн облучения с акцентом на коротковолновую область (аналогично тому, как для MALDI-анализа одиночных клеток, в силу оптических «релеевских» предпосылок, наиболее предпочтителен УФ-диапазон (Gholipour et al., 2008; Hölscher et al., 2009), хотя возможны и вариации в Vis-диапазоне (Xiong et al., 2016)). В качестве предметных стекол использовались антиалиасные фильтры, располагающиеся контактно к монохромным матрицам или поверх фильтров Байера в спектральноном варианте. Максимальное разрешение определялось по минимальному размеру пикселей. В наиболее

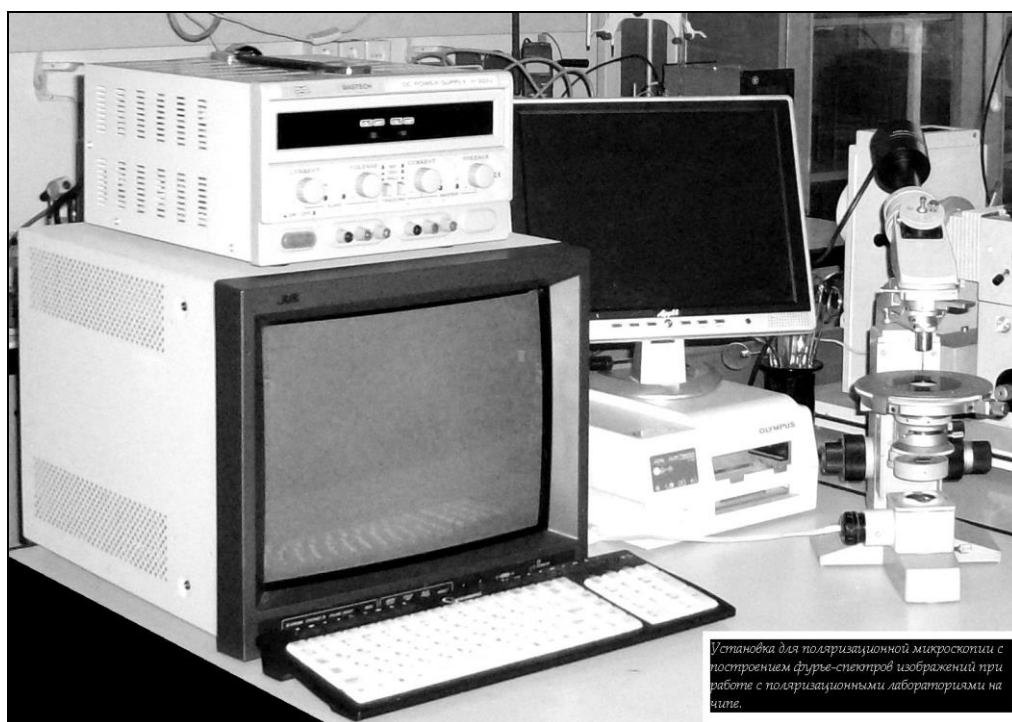
современных версиях было достигнуто почти соответствующее размерам одиночных бактериальных клеток разрешение 1.12 мкм КМОП-матрицы с активными пиксельными сенсорами обеспечивали чувствительность измерения, а также усиление сигнала порядка сотен микровольт на фотон или десятки электронов на 1 такт / пакет. Согласно расчетам, проведенным на базе технических выкладок разработчиков соответствующей элементной базы, в определенных полосах в видимой области достижимы 40-70 ккал/моль для одной грамм-молекулы. Полный фрейм картирования дескрипторов – 20 мс; минимальное время накопления менее 10 мкс. В режиме накопления картирование/маппинг могут осуществляться даже при достаточно малых освещенностях или наличии как источника эмиссии фотонов только собственной хемилюминесценции/биолюминесценции образца; это соответствует чувствительности до 0.00005 лк и широтности  $10^3$ - $10^5$  либо (если переводить в относительные логарифмические единицы динамического диапазона, то 8-12 Б). Содержащие указанные активные позиционно-чувствительные сенсоры печатные платы (PCB) корпусировали с использованием полимеризующегося герметика, оставляя открытой только зону непосредственного поверхностного экспонирования, и закладывали в почвы. В целях обеспечения диверсификации методов анализа были созданы две модификации чипа – с телеметрическим беспроводным каналом передачи данных и с кабельным соединением. Первый вариант менее подходит для расширенных исследований характеристик сигнала (по причине существования эфирных наводок и помех), но более отвечает задачам скоростного оценивания характеристик экспериментальных полей, почвенно-геодезической съёмки (как частный вариант – являясь устройством с RFID-меткой). Второй вариант – транслирующий результаты регистрации почвенных сред и их почвенной микробиоты по кабельному каналу – способен передавать данные с распределенной сети на многоканальные АЦП и крейтовые системы сбора-обработки данных (уровня САМАС, РХІ и т.п.). Конструктивные их различия доступно схематизированы на Рис. 19а, б.



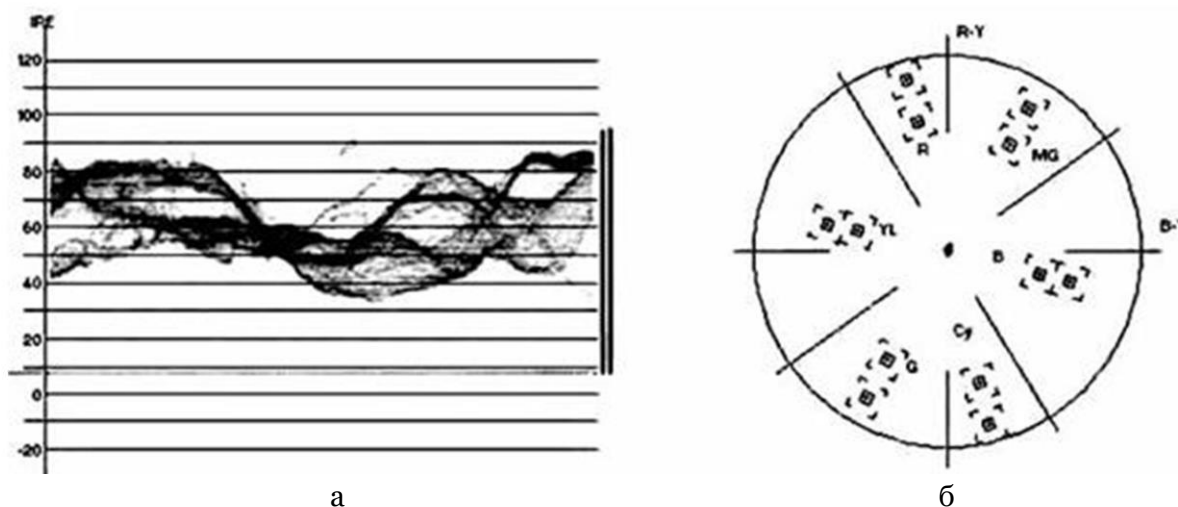
**Рис. 19.** Почвенные лаборатории на чипе: а – телеметрическая с радиочастотной передачей на ресивер (2.4. ГГц); б – кабельная телеметрическая система, монтируемая в герметичном шприце с поршневым подводом активного пиксельного сенсора к зоне экспонирования. На рис. 19а: 1 – поверхность почвы; 2 – активный пиксельный сенсор; 3 – печатная плата, РСВ; 4 – антенна, предающая сигнал на ресивер; 5 – аккумулятор / система питания. На рис. 19б: 6 – поверхность фильтра для экспонирования; 7 – активный пиксельный сенсор; 8 – корпус почвенной камеры; 9 – гермозаглушка; 10 – канал вывода кабеля; 11 – кабель коммутации, передающий сигнал на один из каналов многоканального АЦП или крейтовых систем DAQ

В результате апробации данного APS-опосредованного технологического подхода, был получен пул данных, относящихся как к лабораторным тестам, так и к регистрации в почвах. Так, например, можно получить (в стандартных координатах монитора формы волны – IRE) построчный (по сканограммам каждой строки) профиль конфигурации волн яркости (ранее это делалось с применением специфицированных поляризационно-микрофотометрических установок для построения профилей яркости {3D Luminance Surface}, подобных показанной

на рис. 20 установке, работавшей в постэкспедиционном режиме в ГЕОХИ РАН в 2010-2011 гг.). Если в результате использования активного пиксельного сенсора почвенной закладки в полевых условиях регистрируется нарастание в «поле зрения» (полном ROI для таких чипов без оптического тракта и возможностей аналогового виньетирования / кашетирования окна) фрагмента микробного мата или лоскута плесени («flap»), то на мониторе формы волны при мониторинге отображается изменение интенсивности сканограмм группы строк по оси IRE. Это показано на Рис. 21а. В случае использования как дополнительного кластеризующего дескриптора формы межканальных корреляций, получаемых вектороскопическим путём (в случае спектрозональных матриц с фильтрами Байера или их аналогами; в обратном случае векторограмма не будет отображать существенных корреляций, как это показано на Рис. 21б), можно, осуществляя (однозначное) сопоставление отдельных спектрозональных каналов конкретным агентам или типам/классам агентов, картировать их распределение в среде.



**Рис. 20.** Поляризационно-микрофотометрическая установка для реконструкции профилей яркости {3D Luminance Surface} с параллельным отображением результатов вектороскопии



**Рис. 21.** Мониторинг формы волны (а) и монохромная векторограмма (б) с КМОП-чипа (Notchenko, Gradov, 2013)

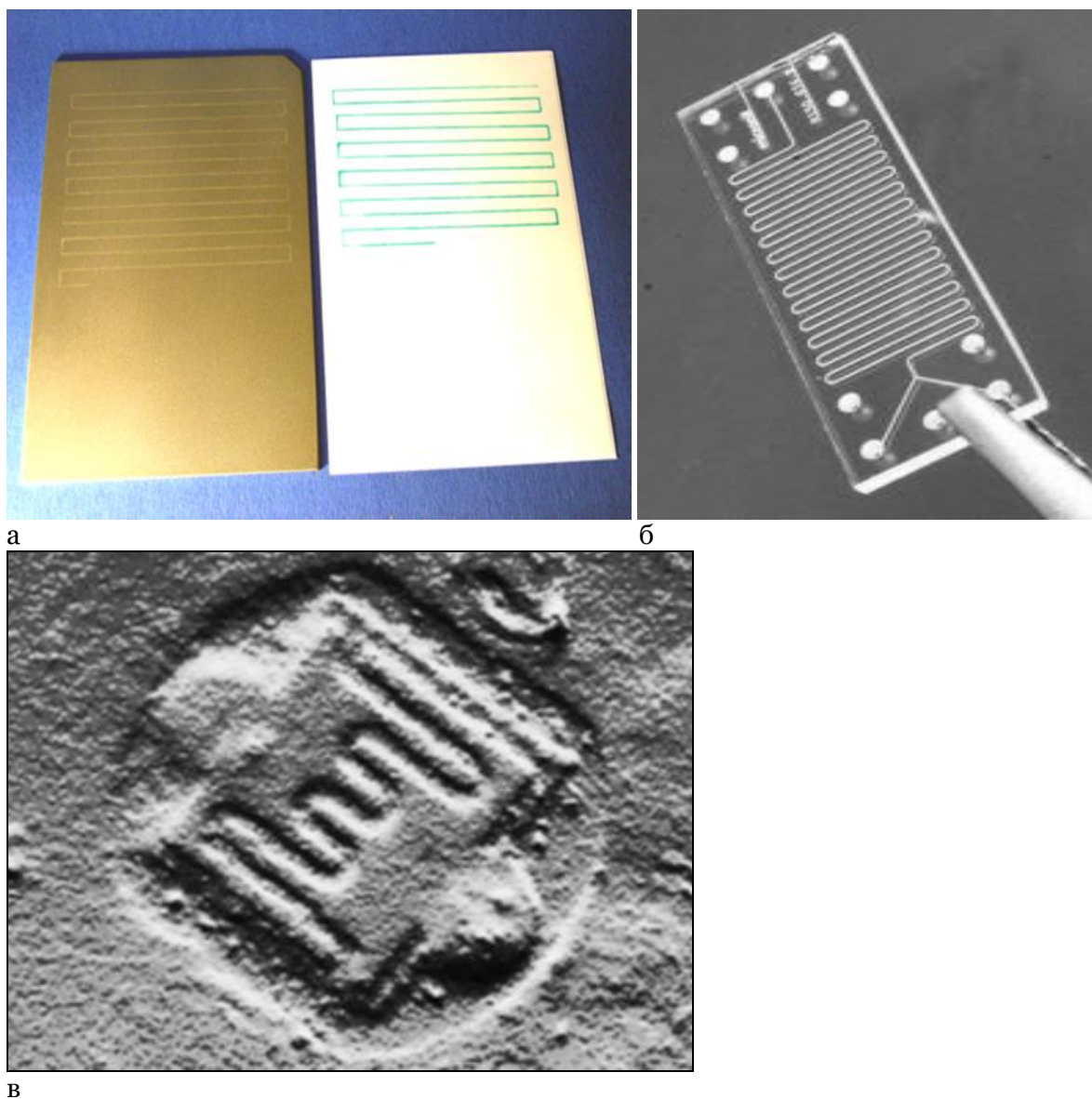


**Рис. 22.** Непосредственная прямая регистрограмма с чипа как безлинзового микроскопа в коротковолновом диапазоне (спектрозональный В-канал). Видны элементы микроструктур (фибрилярного и филаментарного характера). Использован стандартный чип и передача по кабелю через универсальную серийную шину (разработка модификации 2016-2017 гг.)

Нами были продолжены эти работы, в результате чего появилась возможность вывода сигнала не только по аналоговым спектрозональным каналам (с последующей оцифровкой, когда это целесообразно), а непосредственно по кабелю универсальной серийной шины для изначально полностью цифровых измерений в реальном времени (например, регулярности и корреляционно-спектрального анализа в программе QAVIS [ДВО РАН] с захватом данных прямо из окна визуализации). Современное программное обеспечение позволило выдавать эти данные напрямую в сеть, эквивалентно веб-камерам, на принципе которых основана вся данная конструкция. Это позволило также без привлечения крейтовых систем типа САМАС, РХІ {etc.} проводить одновременно измерения на нескольких (до нескольких десятков либо сотен, аналогично принципам телеконференции/телемоста) терминалов с использованием множества чипов в качестве источников данных (не менее числа терминалов). Эквивалентно развитию телемедицины и телемедицины на чипе, возможно развитие «теле-почвоведения»/«теле-педологии» и «теле-эдафологии» с использованием картирующих чипов в качестве прямых и корреляционно-компаративных источников данных. На рис. 22 демонстрируется пример изображения микроскопических (соответствующих размерам бактерий и почвенных структур) объектов на чипе при работе в коротковолновом диапазоне (спектрозональный В-канал). Можно видеть, что качество изображения с APS на CMOS в безлинзовом режиме не уступает качеству средних CCD прошлых лет при микроскопической регистрации с полным оптическим трактом (например, на телемикроскопах LEITZ, ZEISS и японских компаний; по состоянию на 1980–1990-е гг.). Возможность наблюдения одиночных клеточных структур и ассоциатов клеток позволяет гибридизировать эту технику с цитометрией на чипе (подобно тому, как лазерную сканирующую цитометрию объединяют с MALDI-анализом одиночных клеток (Rawlins et al., 2015); в случае аналоговых лабораторий на чипе это достигается путем использования собственной внутренней сканирующей развертки устройств трансляционной аналитики). Таким образом, осуществим переход от «теле-почвоведения, «теле-педологии» и «теле-эдафологии» на чипе к «почвенной микробиологии на чипе», «природоведческой микробиологии (Заварзин, 2004) на чипе». Учитывая связи почва-атмосфера и атмосфера-гидросфера в микробиологическом аспекте, известную начиная с опытов Пастера, в которых контаминация жидких сред происходила из атмосферы (Пастер, 1864), можно расширить и углубить соответствующий список дисциплин («аэриобиология / аэрозольная микробиология



на чипе», «наннопланктонология на чипе» и т.д.), в случае достаточной герметизации чипа, экспонируемого в нативных природных условиях. Нами были проведены эксперименты по контаминации открытых поверхностей чипов в условиях лабораторной атмосферы. В итоге многонедельной экспозиции было показано увеличение микроскопических артефактов типа объектов с фраунгоферовой дифракцией (в соответствующем типе детектирования на чипе в лабораторных условиях), адекватно аппроксимируемых ФРТ (функциями развертки точки) в случае более близких к коккам по геометрическим параметрам и ФРЛ (функции развертки линии) в случае более близких к бациллам по геометрическим параметрам (аналогично для растительных клеток: паренхимные и прозенхимные формы соответственно). Иначе говоря, экспонирование устройств природоведческой микробиологии возможно во всех условиях, на которых действуют принципы контаминации природоведческой микробиологии.



**Рис. 23.** Сопоставление открытой топологии фракционного коллектора MALDI (MALDI Fraction Collector)

а – стандартная тестовая топологии микрофлюидного чипа;  
 б – геометрическая совместимость данных техник при эдафологической экспонируемости, много лучшей у планарной MALDI-пластинки, чем у закрытого чипа;  
 в – простейшая геометрия сенсора не позиционно-чувствительного почвенного фотобиочипа.

Следует отметить, что наиболее адекватной по открытому паттернингу морфологией/геометрией поверхности активного пиксельного сенсора является именно LDI-совместимая геометрия (топология, если апеллировать к микроэлектронной терминологии) на фильтрах, которая подобна демонстрируемой на Рис. 23а. Более близкая к капиллярам Перфильева и педоскопам с развитой поверхностью геометрия микрофлюидного чипа, отличающаяся от первой тем, что канавки / бороздки закрыты, существенно менее подходит для анализа как по причинам пониженной контаминируемости в единицу времени и репрезентативности по статистическим характеристикам счета, так и по причине недоступности для ионизации под пучком MALDI при закрытом внутри герметизируемого чипа состоянии экспонирующейся в естественной среде пробы (Рис. 23б). Шлирен-реконструкция (псевдо-трехмерная, алгоритм визуализации «барельеф») простейшей геометрии сенсора не позиционно-чувствительного почвенного фотобиочипа приведена на Рис. 23в. Кроме того, есть ряд чисто оптических эффектов, препятствующих этому, однако их рассмотрение требует отдельного материала, не являясь в генеральной части предметом настоящей статьи.

#### 4. Заключение

Таким образом, разрабатывается комплекс технологий почвенно-микробиологических и агрохимических мониторинговых исследований на активном чипе, включающий в себя:

1. активный чип, совмещающий в себе принципиальные особенности: почвенных камер и пластинок обрастания Росси-Холодного, MALDI-мишени, счётных клеточных камер с координатными сетками, микрофлюидных фракционных коллекторов для MALDI MS, гранулометрических окулярных геологических счетчиков, приборов для капиллярной микроскопии Перфильева-Габе (но уже на микрофлюидных принципах), безлинзового контактного микроскопа на чипе по Озкану;

2. «тройную мультипараметрическую идентификацию», базирующуюся на совмещенном анализе: морфометрических и спектроколориметрических (визуализируемых в форме псевдоспектра на палитре) или флуориметрических данных безлинзовой микроскопии, масс-спектров MALDI-биотайпинга (особо интересно анализируемых в случае FT-ICR и смежных техник, в которых форму обработки исходных данных задает пользователь – вплоть до кепстральных и нойслетных обработок), сигнала с электродных сеток; таким образом, получается пул естественных дескрипторов – несуррогатных педологических физико-химических ключей, фиксируемых естественным путём (не считывание штрих-кода с идентификаторами) и имеющих самостоятельную ценность для «data mining»-а как «big data»;

3. компаративный анализ данных в рамках алгоритмики SOGDA\* («тогда и только тогда, когда все сигналы в комплексе при сличении с базой опорных “фингерпринтов” дают идентично высокую вероятность отнесения исследуемого образца к данному типу почв или некоторому микробному сообществу либо конкретной систематической нише, чип идентифицируется как носитель соответствующего данному определению образца; при полном отсутствии идентификации по мажоритарному дескриптору или комплексу его переменных – решение о классификации принято на основе базовых данных быть не может»);

4. установки контроля и калибровки чипа, в т.ч. поляризационно-микрофотометрическая установка реконструкции профилей яркости {«3D Luminance

\* Термин заимствован из элементарной топологии (цит.): <<Новое слово в математике: *согда*. В математической речи часто встречается сложный союз «*тогда и только тогда, когда*» (другие варианты: «в том и только в том случае, если», «для того чтобы ... необходимо и достаточно, чтобы»). Ни в одном естественном национальном языке нет короткого союза с тем же смыслом. В письменный английский математики ввели союз «*iff*», и он получил широкое распространение. Мы предлагаем на ту же роль слово «*согда*», которое звучит по-русски и имеет достаточно ясную этимологию. Его второй слог *гда* является активным славянским корнем, указывающим на время. Он входит в слова *тогда, всегда, когда, иногда, никогда, некогда*. Первый слог *со* - является не менее активной приставкой, которая служит для образования слов, означая общее участие, совместность и т. п., например, *со-временник, со-авт ор, со-гласие, со-ратник*. Вместе получается общность времени, что соответствует длинной форме «тогда и только тогда, когда» >> (Виро и др., 2012).

Surface»} с параллельным отображением результатов вектороскопии, установка панорамного подсчета частиц с осцилло-фотографической регистрацией при видеомикроскопии на основе микроскопа люминесцентного дорожного (модернизируемого в оптической части), стенд поверки и калибровки чипов с применением стробоскопического осциллографа-рефлектометра с дискретностью до наносекундного диапазона;

5. систему телеметрии активных чипов с радиочастотной идентификацией и ресивером с точной подстройкой (в ранних версиях – ручной с использованием атометрических или потенциометрических органов подстройки; в современных – с трэкинг-генератором на скалярной или, что лучше с позиций фазового анализа, векторной технологии сбора и обработки данных); в принципе, возможно использовать данные телеметрируемого (в реальном времени) сигнала после оцифровки без сжатия как источники кинетических дескрипторов процессов на интерфейсе «чип-почва» (используя алгоритмы обработки радиосигнала, близкие к использовавшимся нами для FT-ICR при MALDI-MS на чипе);

6. FRAP- или FLIP- анализ микрофлоры после выемки чипа, совмещённый с MALDI или иными LDI (соответственно, не матрично-опосредованными, не МА – «matrix assisted») при использовании лазеров с перестраиваемой длиной волны или нескольких лазеров в едином тракте, пригодных для обеспечения флуоресценции и выжигания красителей при FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) или же FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching);

7. интеграцию диодных лазеров или DPSS для Photobleaching-a непосредственно в корпус чипа при закладке в почву для проведения регулярного FRAP-мониторинга *in situ* (или *in vivo* – для почвенных микроорганизмов); к сожалению, техники аналогичного либо совместимого с ним внутрпочвенного MALDI, в принципе, не существует, а энергия в пучке у питаемых доступными для почвенной закладки устройств заведомо ниже, чем у ионизирующих лазеров в техниках MALDI и иных LDI.

Перспективны и представляют особый интерес следующие направления, которые могли бы быть развиты в рамках данных исследований (частично о них речь пойдёт в статьях данного цикла):

I. имплементация техники микрофлюидных капиллярных почвенных планарных чипов в альтернативной версии с сохранением капиллярных / микрофлюидных характеристик – в вариациях Перфельева-Габе (капиллярные методы анализа и численного контроля почвенной микрофлоры; MALDI-педоскопы и т.д.); также возможно их совмещение с SPIM-микроскопией в капиллярных устройствах при условии длительной предварительной почвенной экспозиции, а лазерная SPIM-микроскопия может являться основой как для FRAP, так и для трёхмерного (3D) MALDI-имэджинга, что является предметом отдельной нашей работы;

II. совмещение капиллярных методов почвенной микробиологии с капиллярными методами масс-спектрометрии (в хроматографических микро- и нано- колонках на чипе; в капиллярах ESI и линейки электроспрей-ионизации в принципе; сбор данных с микрокапилляров масс-патч-клампа; и т.д.);

III. имплементация методов висячей капли на покровном стекле в условиях почвы и лонгитюдного эксперимента с переходом через точку росы и конденсацией на чипе естественной влаги с психрометрическим (с контролем по встроенному в чип на поверхности полимерным конденсатором – в том числе);

IV. использование гибкой полимерной «тканной» микрофлюидики с чрезвычайно развитой поверхностью и компартиментализованной перколяционной пластикой (разработка нашей группы) одновременно в качестве материала чипа, матрицы MALDI и адгезивного слоя (в ряде случаев – с функцией питательной среды) на чипе одновременно;

V. использование иных – более эффективных методов люминесценции, отличных от лазерно-индуцированной флуоресценции, фотолюминесценции; до разгрома описываемых работ в нашей группе исследовалась возможность имплементации функций, аналогичных LDI-FRAP с использованием: хемилюминесценции либо биолюминесценции, сонолюминесценции, радиолюминесценции, электро- или катодо- люминесценции, кандолюминесценции и ТСЛ (термостимулированной люминесценции), электрохемилюминесценции, гамма-лиолюминесценции при соответствующем облучении,

кристаллолюминесценции, пьезолюминесценции и механолюминесценции (включая небезынтересную, с точки зрения фиксации в спектрзональном режиме, механохромную люминесценцию), отличающуюся от триболюминесценции (которая также может быть использована для этого, но только в ряде специфических методов механохимии).

Критерием эффективности предлагаемого подхода являются факты его совместимости с природной средой и LDI-конфигурацией эксперимента. Более подробно FRAP на чипе и FLIP на чипе будут представлены в цикле последующих статей (посвященных физическому фингерпринingu почвенной микрофлоры / микробиоты, а также – мониторингу агрохимии почвы на чипе), поскольку объём данных по заявленному направлению весьма велик, что не позволяет представить его в рамках единого сообщения, содержащего библиографические, технико-методические и алгоритмические детали данных подходов.

## 5. Благодарности

Авторы выражают благодарность коллегам из ГЕОХИ РАН, на ранних этапах (до 2011 г.) давших возможность инициативного проведения данных DIY-работ на базе ОМСИ / БИП ГЕОХИ РАН. Авторы выражают благодарность экспертам РФФИ, поддержавшим эту работу в 2015-2016 гг., благодаря чему мы имели возможность продолжить эти работы в последние годы. Работа поддержана грантом РФФИ 16-32-00914. Авторы признательны редакции BGT\*, которая в ответ на наше предварительное краткое сообщение от 28.08.2016 одобрила представленную тему и предложила нам опубликовать в BGT\* цикл статей о MALDI-FLIP и MALDI-FRAP-технологиях на чипе.

## Литература

[Виро и др., 2012](#) – Виро О.Я., Иванов О.А., Нецветаев Н.Ю., Харламов В.М. (2012). Элементарная топология. 2-е изд., исправл. М.: МЦНМО, 358+х с.

[Градов, 2012a](#) – [Градов О.В.](#) (2012). Микротоннельные многофакторные телеметрические установки как общедоступные зонды для поточного исследования болотных сред. В сб.: *Болотные экосистемы: фундаментальные аспекты охраны и рационального природопользования*, ПГТУ, Йошкар-Ола, С. 134–138.

[Градов, 2012б](#) – [Градов О.В.](#) (2012). Мониторинг нестандартных тепличных почвогрунтов с использованием почвенных камер-лабораторий на чипе. // *Мир теплиц*, (5): 43-46.

[Градов, 2012в](#) – [Градов О.В.](#) (2012). Цифровые матричные пластины обрастания и почвенные камеры как лаборатории на чипе для мониторинга болотной микробиоты. В сб.: *Болотные экосистемы: фундаментальные аспекты охраны и рационального природопользования*, ПГТУ, Йошкар-Ола, С. 129–133.

[Градов, 2015a](#) – [Градов О.В.](#) (2015). Радиохимические микрореакторы и лаборатории на чипе на основе сцинтилляторов с разным квенчинг-фактором и специфических шифтеров с отличными спектральными характеристиками переизлучения. В сборнике: *Материалы VIII Всероссийской конференции по радиохимии Радиохимия-2015*, г. Железногорск Красноярского края, Россия, С. 399–399.

[Градов, 2015б](#) – [Градов О.В.](#) (2015). Новый принцип дизайна лабораторий на чипе на базе КМОП: гибко-конфигурируемая архитектура с нетвердотельными бороздками, управляемыми внешним полем, и многоуровневое преобразование сигнала для измерения переменных на одном чипе. В сб.: *"Актуальные проблемы физической и функциональной электроники"*, УлГТУ, Ульяновск, С. 64–65.

[Градов, 2016](#) – [Градов О.В.](#) (2016). Мультипараметрические лаборатории на чипе для биохимических и физико-химических измерений с привязкой к координатам картируемого препарата. *Научно-практическая конференция "Научное приборостроение - современное состояние и перспективы развития"*. Сборник материалов, ФГУП ЭЗАН Москва – Черноголовка: Богородский печатник, С. 183–185.

[Градов, и др., 2017a](#) – [Градов О. В.](#), [Скрынник А. А.](#), [Яблоков А. Г.](#) (2017). Динамическая цейтраферная морфометрия грибов-микробиот на чипе: фиксация морфогенеза in situ и кинетики хронологического, клонального старения дрожжей. *Современная микология в России*, 6:92-94.

Градов и др., 2017б – Градов О. В., Зайцев Е. В., Скрынник А. А., Яблоков, А. Г. (2017). Применение лазерной видеомиллисмометрии в анализе голофитного (осмотрофного) питания дрожжей на чипе. *Современная микология в России*, 6:94-96.

Градов и Нотченко, 2012а – Градов О.В., Нотченко А.В. (2012). Загальнодоступні морфогістохімічні лабораторії на чипі на базі сіток рахункових камер різних типів: мікрофлюїдні морфодинамічні робочі станції. *Морфологія*, 6(1): 5-19.

Градов и Нотченко, 2012б – Градов О.В. и Нотченко А.В. (2012). Спектроразональные лаборатории на чипе с радиочастотной трансляцией. В: *Труды конференции "Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии"*, Т. 3 [Секция 6], С. 63–68.

Градов и Нотченко, 2017 – Градов О. В., Нотченко А. В. (2012). Индикация стадий / фаз цитотомии путем картирования изофот спеклограмм цифрового анализа бордантности. *Биомедицинская инженерия и электроника*, 1(15): 106-110.

Заварзин, 2004 – Заварзин Г.А. (2004). Лекции по природоведческой микробиологии. М., Наука, 2004, 348 с.

Нотченко и Градов, 2011 – Нотченко А.В., Градов О.В. (2011). Лазерний топологічний спекл-аналізатор проліферативної та диференціаційної активності в культуральному морфогенезі. *Морфологія*, 5(4): 10-19.

Омелянский, 1924 – Омелянский В.Л. (1924). Микроорганизмы как химические реактивы. Л.: Научное химико-техническое издательство, 1924, 54 с.

Омелянский, 1929 – Омелянский В.Л. (1929). Краткий курс общей и почвенной микробиологии. М.-Л., ОГИЗ, 1929, 184 с.

Омелянский, 1940 – Омелянский В.Л. (1940). Практическое руководство по микробиологии. М.Л., Издательство АН СССР, 1940, 432 с.

Пастер, 1864 – Пастер Л. (1864). Обь организованныхъ тѣлахъ, существующихъ в атмосферѣ. СПб., Типографія А.П. Червякова, 1864, 110 с.

Ризниченко, Рубин, 1993 – Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. (1993). Математические модели продукционных процессов. Изд-во МГУ, М., 1993, 302 с.

Ризниченко, Рубин, 2004 – Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. (2004). Биофизическая динамика продукционных процессов. ИКИ, Москва-Ижевск, 2004, 464 с.

Agnihotrudu, 1962 – Agnihotrudu V. (1962). A comparison of some techniques for the isolation of fungi from tea soils. *Mycopathologia*, 16(3), 235-242.

Alatoom et al., 2011 – Alatoom A.A., Cunningham S.A., Ihde S.M., Mandrekar J., Patel R. (2011). Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 49(8): 2868-2873.

Alexandrov et al., 2015 – Alexandrov P., Notchenko A., Gradova M., Gradov O. (2015). Simultaneous in situ detection of the optical fluorescence, fluorescence recovery kinetics after photobleaching & membrane ion flux on the electrophysiological lab-on-a-chip. *American Journal of Optics and Photonics*, 3(5):118–122.

Alvarez-Buylla et al., 2012 – Alvarez-Buylla A., Culebras E., Picazo J.J. (2012). Identification of Acinetobacter species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol.*, 12(2): 345-349.

Amantonico et al., 2010 – Amantonico A., Urban P.L., Fagerer S.R., Balabin R.M., Zenobi R. (2010). Single-cell MALDI-MS as an analytical tool for studying intrapopulation metabolic heterogeneity of unicellular organisms. *Anal. Chem.*, 82(17): 7394-7400.

Avanzi et al., 2017 – Avanzi I.R., Gracioso L.H., Baltazar M.D., Karolski B., Perpetuo E.A., do Nascimento C.A. (2017). Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. *Envir. Sci. Pollut. Res. Int.*, 24(4): 3717-3726.

Barreau et al., 2013 – Barreau M., Pagnier I., La Scola B. (2013). Improving the identification of anaerobes in the clinical microbiology laboratory through MALDI-TOF mass spectrometry. *Anaerobe*, 22: 123-125.

Bizzini et al., 2010 – Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G., Prod'hom G. (2010) Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journ. Clin. Microbiol.*, 48(5): 1549-1554.

**Blair, 1943** – Blair I. D. (1943). Behaviour of the fungus *Rhizoctonia solani* Kiihn in the soil. *Annals of applied Biology*, 30(2), 118-127.

**Boggio et al., 2011** – Boggio K.J., Obasuyi E., Sugino K., Nelson S.B., Agar N.Y., Agar J.N. (2011). Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact. *Exp. Rev. Proteom.*, 8(5): 591-604.

**Brivio et al., 2005** – Brivio M., Tas N.R., Goedbloed M.H., Gardeniers H.J., Verboom W., van den Berg A., Reinhoudt D.N. (2005). A MALDI-chip integrated system with a monitoring window. *Lab Chip*, 5(4): 378-381.

**Brown, 1958** – Brown J.C. (1958). Fungal mycelium in dune soils estimated by a modified impression slide technique. *Transactions of the British Mycological Society*, 41(1): 81-88.

**Buchan et al., 2012** – Buchan B.W., Riebe K.M., Ledebor N.A. (2012). Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *Journ. Clin. Microbiol.*, 50(2): 346-352.

**Budin et al., 2012** – Budin G., Chung H.J., Lee H., Weissleder R. (2012). A magnetic Gram stain for bacterial detection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(31): 7752-7755.

**Chang et al., 2015** – Chang Q., Ornatsky O.I., Koch C.J., Chaudary N., Marie-Egyptienne D.T., Hill R.P., Tanner S.D., Hedley D.W. (2015). Single-cell measurement of the uptake, intratumoral distribution and cell cycle effects of cisplatin using mass cytometry. *Int. J. Cancer.*, 136(5): 1202-1209.

**Chen et al., 2010** – Chen S.Y., Li K.I., Yu C.S., Wang J.S., Hu Y.C., Lai C.C. (2010). A radiate microstructure MALDI chip for sample concentration and detection. *Anal. Chem.*, 82(14): 5951-5957.

**Chen et al., 2011** – Chen S.Y., Juang Y.M., Chien M.W., Li K.I., Yu C.S., Lai C.C. (2011). Magnetic iron oxide nanoparticle enrichment of phosphopeptides on a radiate microstructure MALDI chip. *Analyst*, 136(21): 4454-4459.

**Chen et al., 2015** – Chen Y.S., Liu Y.H., Teng S.H., Liao C.H., Hung C.C., Sheng W.H., Teng L.J., Hsueh P.R. (2015). Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry BrukerBiotyper for identification of *Penicillium marneffeii*, *Paecilomyces* species, *Fusarium solani*, *Rhizopus* species, and *Pseudallescheria boydii*. *Front. Microbiol.*, 6: 679.

**Cheng et al., 2015** – Cheng W.C., Jan I.S., Chen J.M., Teng S.H., Teng L.J., Sheng W.H., Ko W.C., Hsueh P.R. (2015). Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *Journ. Clin. Microbiol.*, 53(5): 1741-1744.

**Chesters & Thornton, 1956** – Chesters C. G., Thornton R.H. (1956). A comparison of techniques for isolating soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 39(3): 301-313.

**Chien et al., 2016** – Chien J.Y., Lee T.F., Du S.H., Teng S.H., Liao C.H., Sheng W.H., Teng L.J., Hsueh P.R. (2016). Applicability of an in-House Saponin-Based Extraction Method in Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Bacterial and Fungal Species in Positively Flagged Blood Cultures. *Front. Microbiol.*, 7: 1432.

**Chiu, 2014** – Chiu T.C. (2014). Recent advances in bacteria identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using nanomaterials as affinity probes. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(5): 7266-7280.

**Cholodny, 1929** – Cholodny N. (1929). Zur Methodik der quantitativen Erforschung des bakteriellen Planktons. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. A*, 77: 179-193.

**Cholodny, 1930** – Cholodny N. (1930). Über eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. *Archiv für Mikrobiologie*, 1(1): 620-652.

**Cholodny, 1934** – Cholodny N.G. (1934). A soil chamber as a method for the microscopic study of the soil microflora. *Archives of Microbiology*, 5(1): 148-156.

**Cholodny, 1936** – Cholodny N.G. (1936). Bodenstaubkulturen und die Mikroflora des Bodens. *Archiv für Mikrobiologie*, 7(1): 286-296.

**Clark et al., 2013** – Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26(3): 547-603.

- Coffman, 2014** – Coffman K. (2014). The Rossi-Cholodny Buried Slide Technique. 28 Oct. 2014. <https://prezi.com/mtrtaxf9brha/the-rossi-cholodny-buried-slide-technique/>
- Cooke, 1956** – Cooke W.B. (1956). Colonization of artificial bare areas by microorganisms. *The Botanical Review*, 22(9): 613-638.
- Cullimore, Pipe, 1980** – Cullimore D.R., Pipe A.E. (1980). Studying the activities of microorganisms in soil using slides. *Journal of Biological Education*, 14(3): 213-218.
- Cunningham, Patel, 2013** – Cunningham S.A., Patel R. (2013). Importance of using Bruker's security-relevant library for Biotyper identification of Burkholderia pseudomallei, Brucella species, and Francisella tularensis. *J. Clin. Microbiol.*, 51(5): 1639-1640.
- D'aeth, 1939** – D'aeth H.R.X. (1939). A survey of interaction between fungi. *Biological Reviews*, 14(2): 105-131.
- De Bel et al., 2010** – De Bel A., Wybo I., Piérard D., Lauwers S. (2010). Correct implementation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in routine clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.*, 48(5): 1991.
- Del Chierico et al., 2016** – Del Chierico F., Di Cave D., Accardi C., Santoro M., Masotti A., D'Alfonso R., Berrilli F., Urbani A., Putignani L. (2016). Identification and typing of free-living Acanthamoeba spp. by MALDI-TOF MS Biotyper. *Exp. Parasitol.*, 170: 82-89.
- DeMarco and Ford, 2013** – DeMarco M.L., Ford B.A. (2013). Beyond identification: emerging and future uses for MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Clin. Lab. Med.*, 33(3): 611-628.
- Diaz, 2013** – Diaz L. (2013). Tecnica Cholodny Rossi, 23 September 2013. URL: <https://prezi.com/k25pm5dnejxf/tecnica-cholodny-rossi/>
- Dupont et al., 2010** – Dupont C., Sivadon-Tardy V., Bille E., Dauphin B., Beretti J.L., Alvarez A.S., Degand N., Ferroni A., Rottman M., Herrmann J.L., Nassif X., Ronco E., Carbonnelle E. (2010). Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16(7): 998-1004.
- Emara et al., 2017** – Emara S., Amer S., Ali A., Abouleila Y., Oga A., Masujima T. (2017). Single-Cell Metabolomics. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 965: 323-343.
- Faron et al., 2015** – Faron M.L., Buchan B.W., Hyke J., Madisen N., Lillie J.L., Granato P.A., Wilson D.A., Procop G.W., Novak-Weekley S., Marlowe E., Cumpio J., Griego-Fullbright C., Kindig S., Timm K., Young S., Ledebor N.A. (2015). Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram-Negative Bacterial Isolates. *PLoS One.*, 10(11): E0141350-1 – E0141350-13.
- Faryal, 2014** – Faryal A. (2014). Rossi-Cholodny technique. Introduction. 04 April 2014. URL: <https://faryalkhushik.wordpress.com/2014/04/04/rossi-cholodny-technique/>
- Fiori et al., 2016** – Fiori B., D'Inzeo T., Giaquinto A., Menchinelli G., Liotti F.M., de Maio F., De Angelis G., Quaranta G., Nagel D., Tumbarello M., Posteraro B., Sanguinetti M., Spanu T. (2016). Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 54(3): 576-584.
- Ford and Burnham, 2013** – Ford B.A., Burnham C.A. (2013). Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *J. Clin. Microbiol.*, 51(5): 1412-1420.
- Forest, 1962** – Forest, H. S. (1962). Analysis of the soil algal community. *Transactions of the American Microscopical Society*, 81(2): 189-198.
- Fraser et al., 2016** – Fraser M., Brown Z., Houldsworth M., Borman A.M., Johnson E.M. (2016). Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Med. Mycol.*, 54(1): 80-88.
- Fu et al., 2016** – Fu Q., Tang J., Cui M., Xing J., Liu Z., Liu S. (2016). Application of porous metal enrichment probe sampling to single cell analysis using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J. Mass Spectrom.*, 51(1): 62-68.

Gao et al., 2013 – Gao Y., Lin Y., Zhang B., Zou D., He M., Dong B., Hang W., Huang B. (2013). Single-cell elemental analysis via high irradiance femtosecond laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 85(9): 4268-4272.

Gholipour et al., 2008 – Gholipour Y., Nonami H., Erra-Balsells R. (2008). Application of pressure probe and UV-MALDI-TOF MS for direct analysis of plant underivatized carbohydrates in subpicoliter single-cell cytoplasm extract. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19(12): 1841-1848.

Golbraikh et al., 2003 – Golbraikh E., Rapis, E.G., Moiseev S.S. (2003). On the crack pattern formation in a freely drying protein film. *Technical Physics*, 48(10), 1333-1337.

Gradov, 2012 – Gradov O. V. (2012). Digital lab-on-a-chip as analog of soil chambers & rossi-cholodny slides. *VII Int. Symp. CBAFFF (7-th Fr. Progr.)*: 17–18.

Gradov, 2017 – Gradov O. V. (2017). Multi-functional microprobe lab-on-a-chip based on the active-pixel sensor with the position-sensitive cassette masks assembled from discrete converters of different biophysical and biochemical parameters into the optical response signals [invited paper]. *International Journal of Modern Physics*, 2(1): 23–28.

Gradov and Jablovkov, 2016 – Gradov O. V., Jablovkov A. G. (2016). Novel morphometrics-on-a-chip: CCD- or CMOS-lab-on-a-chip based on discrete converters of different physical and chemical parameters of histological samples into the optical signals with positional sensitivity for morphometry of non-optical patterns. *Journal of Biomedical Technologies*, (2):1–29.

Grenfell et al., 2016 – Grenfell R.C., da Silva Junior A.R., Del Negro G.M., Munhoz R.B., Gimenes V.M., Assis D.M., Rockstroh A.C., Motta A.L., Rossi F., Juliano L., Benard G., de Almeida Júnior J.N. (2016). Identification of *Candida haemulonii* Complex Species: Use of ClinProTools to Overcome Limitations of the Bruker Biotyper(TM), VITEK MS(TM) IVD, and VITEK MS(TM) RUO Databases. *Front. Microbiol.*, 7: 940.

Guillaume-Gentil et al., 2017 – Guillaume-Gentil O., Rey T., Kiefer P., Ibáñez A.J., Steinhoff R., Brönnimann R., Dorwling-Carter L., Zambelli T., Zenobi R., Vorholt J.A. (2017). Single-Cell Mass Spectrometry of Metabolites Extracted from Live Cells by Fluidic Force Microscopy. *Anal. Chem.*, 89(9): 5017-5023.

Guo et al., 2014 – Guo L., Ye L., Zhao Q., Ma Y., Yang J., Luo Y. (2014). Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J. Thorac. Dis.*, 6(5): 534-538.

Halim et al., 2009 – Halim V.A., Muck A., Hartl M., Ibáñez A.J., Giri A., Erfurth F., Baldwin I.T., Svatos A. (2009). A dual fluorescent / MALDI chip platform for analyzing enzymatic activity and for protein profiling. *Proteomics*. 9(1): 171-181.

Hammarström et al., 2014 – Hammarström B., Nilson B., Laurell T., Nilsson J., Ekström S. (2014). Acoustic trapping for bacteria identification in positive blood cultures with MALDI-TOF MS. *Anal Chem.*, 86(21): 10560-10567.

Harju et al., 2017 – Harju I., Lange C., Kostrzewa M., Maier T., Rantakokko-Jalava K., Haanperä M. (2017). Improved Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* and Other *S. mitis* Group Streptococci by MALDI Biotyper Using an Improved MALDI Biotyper Database Content and a Novel Result Interpretation Algorithm. *J. Clin. Microbiol.*, 55(3): 914-922.

Hartmann et al., 2015 – Hartmann E.M., Colquhoun D.R., Schwab K.J., Halden R.U. (2015). Absolute quantification of norovirus capsid protein in food, water, and soil using synthetic peptides with electrospray and MALDI mass spectrometry. *J. Haz. Mater.*, 286: 525-532.

He et al., 2010 – He Y., Li H., Lu X., Stratton C.W., Tang Y.W. (2010). Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *J. Clin. Microbiol.*, 48(11): 3888-3892.

Hirsch, Pankratz, 1970 – Hirsch P., Pankratz S. H. (1970). Study of bacterial populations in natural environments by use of submerged electron microscope grids. *J. Bas. Microbiol.*, 10(8), 589-605.

Hirte, 1965 – Hirte W. F. (1965). Arbeitsmethoden in der naturwissenschaftlichen und technischen Mikrobiologie. I. Die Anwendung der Verdünnungsplattenmethode zur Erfassung der Bodenmikroflora. 1. Der quantitative Nachweis. *Zentralbl. Bakteriol.*, 119: 429-447.

Hölscher et al., 2009 – Hölscher D., Shroff R., Knop K., Gottschaldt M., Crecelius A., Schneider B., Heckel D.G., Schubert U.S., Svatos A. (2009) Matrix-free UV-laser desorption / ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *Plant J.*, 60(5): 907-918.



Hossen et al., 2015 – Hossen M.A., Nagata Y., Waki M., Ide Y., Takei S., Fukano H., Romero-Perez G.A., Tajima S., Yao I., Ohnishi K., Setou M. (2015). Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: a single-cell MALDI-IMS approach. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(18): 5273-5280.

Hsueh et al., 2014 – Hsueh P.R., Lee T.F., Du S.H., Teng S.H., Liao C.H., Sheng W.H., Teng L.J. (2014). Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. *J. Clin. Microbiol.*, 52(7): 2371-2379.

Hsueh et al., 2014 – Hsueh P.R., Kuo L.C., Chang T.C., Lee T.F., Teng S.H., Chuang Y.C., Teng L.J., Sheng W.H. (2014). Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 52(8): 3095-3100.

Imanishi et al., 2017 – Imanishi S.Y., Nakayama T., Asukabe H., Harada K.I. (2017). Application of MALDI Biotyper to cyanobacterial profiling. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 31(4): 325-332.

Ivanova, 2016 – Ivanova B. (2016). Erratum to: Solid-state UV-MALDI mass spectrometric quantitation of fluroxypyr and triclopyr in soil. *Environ. Geochem. Health.*, 38(5): 1215.

Ivanova and Spiteller, 2015 – Ivanova B., Spiteller M. (2015). Solid-state UV-MALDI mass spectrometric quantitation of fluroxypyr and triclopyr in soil. *Environ. Geochem. Health.*, 37(3): 557-574.

Jablokov et al., 2015 – Jablokov A., Skrynnik A., Gradov O. (2015). Applications of tunable diode lasers and the tunable laser diode spectroscopy in tschachotin's microbeam setups for irradiation of biological tissues, cells and cellular compartments with positional selectivity. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 5(3): 74.

Jannasch, 1958 – Jannasch, H. W. (1958). Studies on planktonic bacteria by means of a direct membrane filter method. *Microbiology*, 18(3), 609-620.

Kim et al., 2017 – Kim S.W., Nho S.W., Im S.P., Lee J.S., Jung J.W., Lazarte J.M., Kim J., Lee W.J., Lee J.H., Jung T.S. (2017). Rapid MALDI biotyper-based identification and cluster analysis of *Streptococcus iniae*. *J. Microbiol.*, 55(4): 260-266.

Klepárník, 2013 – Klepárník K. (2013). Recent advances in the combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: from element to single-cell analysis. *Electrophoresis.*, 34(1): 70-85.

Kling, 2001 – Kling J. (2001). MALDI chip shot. *Anal Chem.*, 73(3): 68A, 70A.

Kok et al., 2013 – Kok J., Chen S.C., Dwyer D.E., Iredell J.R. (2013). Current status of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Pathology*, 45(1): 4-17.

Krismer et al., 2015 – Krismer J., Sobek J., Steinhoff R.F., Fagerer S.R., Pabst M., Zenobi R. (2015). Screening of *Chlamydomonas reinhardtii* Populations with Single-Cell Resolution by Using a High-Throughput Microscale Sample Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(16): 5546-5551.

Krismer et al., 2016 – Krismer J., Steinhoff R.F., Zenobi R. (2016). Single-cell MALDI Tandem Mass Spectrometry: Unambiguous Assignment of Small Biomolecules from Single *Chlamydomonas reinhardtii* Cells. *Chimia*, 70(4): 236-239.

Kumari N. Rossi Cholodney Tech. <http://www.authorstream.com/Presentation/ayesha2-1205282-rossi-cholodney-tech/>

Kurokawa et al., 2013 – Kurokawa S., Kabayama J., Fukuyasu T., Hwang S.D., Park C.I., Park S.B., del Castillo C.S., Hikima J., Jung T.S., Kondo H., Hirono I., Takeyama H., Aoki T. (2013). Bacterial classification of fish-pathogenic *Mycobacterium* species by multigene phylogenetic analyses and MALDI Biotyper identification system. *Mar. Biotechnol.*, 15(3):340-348.

Långmark et al., 2001 – Långmark J., Ashbolt N.J., Szewzyk U., Stenström T.A. (2001). Adequacy of in situ glass slides and direct sand extractions to assess the microbiota within sand columns used for drinking water treatment. *Canadian journal of microbiology*, 47(7): 601-607.

Lee et al., 2017 – Lee H.S., Shin J.H., Choi M.J., Won E.J., Kee S.J., Kim S.H., Shin M.G., Suh S.P. (2017). Comparison of the Bruker Biotyper and VITEK MS Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Systems Using a Formic Acid Extraction Method to Identify Common and Uncommon Yeast Isolates. *Ann. Lab. Med.*, 37(3): 223-230.

Lévesque et al., 2015 – Lévesque S., Dufresne P.J., Soualhine H., Domingo M.C., Bekal S., Lefebvre B., Tremblay C. (2015). A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. *PLoS One*, 10(12): e0144878.

Li et al., 2000 – Li L., Garden R.W., Sweedler J.V. (2000). Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling. *Trends Biotechnol.* 18(4): 151-160.

Li et al., 2017 – Li X., Chen X., Tan J., Liang X., Wu J. (2017). Palladium modified porous silicon as multi-functional MALDI chip for serum peptide detection. *Analyst*, [in press]

Lohmann et al., 2013 – Lohmann C., Sabou M., Moussaoui W., Prévost G., Delarbre J.M., Candolfi E., Gravet A., Letscher-Bru V. (2013). Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 51(4):1231-6.

Mach, 2012 – Mach J. (2012). Mass spectrometry imaging with single-cell resolution: spatial distribution of lipids in cotton seeds. *Plant Cell*, 24(2): 371.

Mancini et al., 2013 – Mancini N., De Carolis E., Infurnari L., Vella A., Clementi N., Vaccaro L., Ruggeri A., Posteraro B., Burioni R., Clementi M., Sanguinetti M. (2013). Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J. Clin. Microbiol.*, 51(7): 2453-2457.

Marko et al., 2012 – Marko D.C., Saffert R.T., Cunningham S.A., Hyman J., Walsh J., Arbefeville S., Howard W., Pruessner J., Safwat N., Cockerill F.R., Bossler A.D., Patel R., Richter S.S. (2012). Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, 50(6): 2034-2039.

Masujima, 2009 – Masujima T. (2009). Live single-cell mass spectrometry. *Anal. Sci.*, 25(8): 953-960.

McElvania TeKippe and Burnham., 2014 – McElvania TeKippe E., Burnham C.A. (2014). Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 33(12): 2163-2171.

McElvania Tekippe, 2013 – McElvania Tekippe E., Shuey S., Winkler D.W., Butler M.A., Burnham C.A. (2013). Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J. Clin. Microbiol.*, 51(5): 1421-1427.

Moon et al., 2013 – Moon H.W., Lee S.H., Chung H.S., Lee M., Lee K. (2003). Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *J. Med. Microbiol.*, 62(Pt 9): 1301-6.

Moshynets et al., 2011 – Moshynets O.V., Koza A., Dello Sterpaio P., Kordium V. A., Spiers A.J. (2011). Up-dating the Cholodny method using PET films to sample microbial communities in soil. *Biopolymers & Cell*, 27 (3): 199-205.

Nair, 1970 – Nair N. G. (1979). Studies on the behaviour of mushroom spores in relation to the epidemiology of virus disease. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30(6): 1123-1132.

Neupert et al., 2005 – Neupert S., Predel R., Russell W.K., Davies R., Pietrantonio P.V., Nachman R.J. (2005). Identification of tick periviscerokin, the first neurohormone of Ixodidae: single cell analysis by means of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 338(4): 1860-1864.

Ngan et al., 2012 – Ngan G.J., Lin R.T., Teo J.W. (2012). Utility of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometer in a clinical microbiology laboratory. *Pathology*, 44(5): 493-496.

Notchenko and Gradov, 2013 – Notchenko A. V. and Gradov O. V. (2013). Elementary morphometric labs-on-a-chip based on hemocytometric chambers with radiofrequency culture identification and relay of spectrozonal histochemical monitoring. *Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine*, 2(1).

Oganessian et al., 2015 – Oganessian V.A., Notchenko A.V., Gradov O.V. (2015). Multispectral topological laser speckle analyzers of proliferation and differentiation activity during morphogenesis based on tunable laser diodes and spectrometric fingerprinting of the cell cycle stages. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 5(3): 75.

Ong et al., 2015 – Ong T.H., Kissick D.J., Jansson E.T., Comi T.J., Romanova E.V., Rubakhin S.S., Sweedler J.V. (2015). Classification of Large Cellular Populations and Discovery of Rare Cells Using Single Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 87(14): 7036-7042.

Oppenheimer and ZoBell, 1952 – Oppenheimer C.H., ZoBell C.E (1952). Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.*, 4: 128-139.

Orehov, Gradov, 2017 – Orehov T. C. and Gradov O. V. (2017). Spectroscopic tunable laser rheogoniometer for weissenberg effect observation in condensed milk products as liquids with nonnewtonian viscosity. In: *AERC 2017: 11th Annual European Rheology Conference & 26th Nordic Rheology Conference (April 3 – 6, 2017; Copenhagen, Denmark)*, volume 1, pages 104–105. Copenhagen, Denmark.

Orehov et al., 2016 – Orehov F. K., Jablovkov A. G., Skrynnik A. A. (2016). Hybridization of laser-induced spectrofluorescence analysis (LIFS), matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry (MALDI), fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and fluorescence loss in photobleaching (FLIP) microtechnics. *Journal of Biomedical Technologies*, (2): 42–52.

Passarelli and Ewing, 2013 – Passarelli M.K., Ewing A.G. (2013). Single-cell imaging mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17(5): 854-859.

Patel, 2013 – Patel R. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin. Chem.*, 59(2): 340-342.

Patel, 2013 – Patel R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin. Infect. Dis.*, 57(4): 564-572.

Perdian et al., 2010 – Perdian D.C., Cha S., Oh J., Sakaguchi D.S., Yeung E.S., Lee Y.J. (2010). In situ probing of cholesterol in astrocytes at the single-cell level using laser desorption ionization mass spectrometric imaging with colloidal silver. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(8): 1147-1154.

Pipe, Cullimore, 1980 – Pipe A.E., Cullimore D.R. (1980). An implanted slide technique for examining the effects of the herbicide diuron on soil algae. *Bull. Environment. Contam. Toxicol.*, 24(1): 306-312.

Prasad, 1977 – Prasad M. (1977). Microbial Society and its Activity in the Soil. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie*, 132(7): 659-665.

Rapis, 1995 - Rapis E.G. (1995). The self-organization of protein. *Technical Physics Letters*, 21: 321-324.

Rapis, 2000 – Rapis E.G. (2000). Self-assembly of cluster protein films (allotropic nonequilibrium noncrystalline modification) during the process or their condensation. *Technical Physics*, 45(1): 121-131.

Rapis, 2001 – Rapis E. (2001). Properties and symmetry of the solid cluster phase of protein. *Technical Physics*, 46(10): 1307-1313.

Rapis, 2002 – Rapis E. (2002). A change in the physical state of a nonequilibrium blood plasma protein film in patients with carcinoma. *Technical Physics*, 47(4): 510-512.

Rapis, 2004 - Rapis E. (2004). Self-organization and supramolecular chemistry of protein films from the nano-to the macroscale. *Technical Physics*, 49(4): 494-498.

Rapis, 2005 - Rapis E. (2005). On the problem of nucleation (cell formation) in self-organization of protein nanostructures in vitro and in vivo. *Technical physics*, 50(6): 780-786.

Rapis, 2005 – Rapis E. (2005). Relaxation of the energy of the protein colloidal solution arising at drying in open and closed systems. *Technical physics*, 50(9): 1236-1238.

Rapis, 2006 – Rapis E. (2006). Nonequilibrium state of self-organized protein nanostructures. *Technical physics*, 51(2): 268-273.

Rapis, 2007 - Rapis E. (2007). On the nonequilibrium phase transition in protein. *Technical Physics*, 52(6): 787-792.

[Rapis, 2008](#) – *Rapis E.* (2008). Evolutionary aspect of protein self-organization. *Technical Physics*, 53(6), 783-788.

[Rapis, Gasanova, 1991](#) – *Rapis E.G., Gasanova G.* (1991). Autowave process in the dynamics of phase transition in a protein film. *Technical physics*, 36(4): 406-412.

[Rawlins et al., 2015](#) – *Rawlins C.M., Salisbury J.P., Feldman D.R., Isim S., Agar N.Y., Luther E., Agar J.N.* (2015). Imaging and Mapping of Tissue Constituents at the Single-Cell Level Using MALDI MSI and Quantitative Laser Scanning Cytometry. *Meth. Mol Biol.*, 1346: 133-149.

[Rhizoctonia solani, biology and pathology, 1970](#) – Parmeter, J. R. (Ed.). (1970). *Rhizoctonia solani, biology and pathology*. Univ of California Press. 1970

[Richter et al., 2012](#) – *Richter C., Hollstein S., Woloszyn J., Kaase M., Gatermann S.G., Szabados F.* (2012). Evaluation of species-specific score cut-off values for various *Staphylococcus* species using a MALDI Biotyper-based identification. *J. Med. Microbiol.*, 61(Pt 10): 1409-16.

[Rodríguez-Sánchez et al., 2016](#) – *Rodríguez-Sánchez B., Ruiz-Serrano M.J., Ruiz A., Timke M., Kostrzewa M., Bouza E.* (2016). Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 54(4): 1144-1147.

[Rubakhin and Sweedler, 2008](#) – *Rubakhin S.S., Sweedler J.V.* (2008). Quantitative measurements of cell-cell signaling peptides with single-cell MALDI MS. *Anal. Chem.*, 80(18): 7128-7136.

[Saffert et al., 2011](#) – *Saffert R.T., Cunningham S.A., Ihde S.M., Jobe K.E., Mandrekar J., Patel R.* (2011). Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, 49(3): 887-892.

[Santos et al., 2016](#) – Santos I.C., Hildenbrand Z.L., Schug K.A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 141(10): 2827-2837.

[Schmidt et al., 2014](#) – *Schmidt A.M., Fagerer S.R., Jefimovs K., Buettner F., Marro C., Siringil E.C., Boehlen K.L., Pabst M., Ibáñez A.J.* (2014). Molecular phenotypic profiling of a *Saccharomyces cerevisiae* strain at the single-cell level. *Analyst*, 139(22): 5709-17.

[Schmitt et al., 2013](#) – *Schmitt B.H., Cunningham S.A., Dailey A.L., Gustafson D.R., Patel R.* (2013). Identification of anaerobic bacteria by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with on-plate formic acid preparation. *J. Clin. Microbiol.*, 51(3): 782-686.

[Schober et al., 2012](#) – *Schober Y., Guenther S., Spengler B., Römpf A.* (2012). Single cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.*, 84(15): 6293-6297.

[Schulthess et al., 2014](#) – *Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M.* (2014). Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 52(4): 1089-1097.

[Schulthess et al., 2014](#) – *Schulthess B., Ledermann R., Mouttet F., Zbinden A., Bloemberg G.V., Böttger E.C., Hombach M.* (2014). Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 52(8): 2797-2803.

[Schulthess et al., 2016](#) – *Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden A., Mouttet F., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M.* (2016). Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Fastidious Gram-Negative Rods. *J. Clin. Microbiol.*, 54(3): 543-548.

[Seng et al., 2010](#) – *Seng P., Rolain J.M., Fournier P.E., La Scola B., Drancourt M., Raoult D.* (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.*, 5(11): 1733-1754.

[Seng et al., 2013](#) – *Seng P., Abat C., Rolain J.M., Colson P., Lagier J.C., Gouriet F., Fournier P.E., Drancourt M., La Scola B., Raoult D.* (2013). Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 51(7): 2182-2194.

[Shabalín et al., 1994](#) – *Shabalín V.N., Shatokhina S.N., Dutov V.V., Trapeznikova M.F., Morozov A.P., Mitroshnikov A.N.* et al. (1994). U.S. Patent No. 5,366,899. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

[Shabalin, Shatokhina, 1996](#) – *Shabalin V.N., Shatokhina S.N.* (1996). Autogenous rhythms and self-organization of biological fluids. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 122(4): 967-973.

[Shabalin, Shatokhina, 2007](#) – *Shabalin V. N., Shatokhina S. N.* (2007). Diagnostic markers in the structures of human biological liquids. *Singapore medical journal*, 48(5): 440.

[Shan et al., 2002](#) – *Shah H.N., Keys C.J., Schmid O., Gharbia S.E.* (2002). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Clin. Infect. Dis.*, 35(Suppl 1): S58-S64.

[Shimizu et al., 2002](#) – *Shimizu M., Levi-Schaffer F., Ojima N., Shingaki T., Masujima T.* (2002). A single-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectroscopic assay of the cell-maturation process. *Anal. Sci.*, 18(2): 107-108.

[Skrynnik, 2015](#) – *Skrynnik A.* (2015). Laser scanning biological microscope for non-invasive studies of the cell structures without fluorescent dyes. In: *Super-resolution in different dimensions*, page 87. OJSC "Human Stem Cell Institute," Moscow, Russia Moscow, Russia.

[Sogawa et al., 2011](#) – *Sogawa K., Watanabe M., Sato K., Segawa S., Ishii C., Miyabe A., Murata S., Saito T., Nomura F.* (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem.*, 400(7): 1905-1911.

[Sulochana, 1952](#) – *Sulochana C.B.* (1952). Soil conditions and root diseases. *Proceedings: Plant Sciences*, 36(6), 234-242.

[Szabados et al., 2010](#) – *Szabados F., Woloszyn J., Richter C., Kaase M., Gattermann S.* (2010). Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database. *J. Med. Microbiol.*, 59(Pt 7): 787-790.

[Theel et al., 2012](#) – *Theel E.S., Schmitt B.H., Hall L., Cunningham S.A., Walchak R.C., Patel R., Wengenack N.* (2012). Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 50(9): 3093-3095.

[Tsirogianni et al., 2005](#) – *Tsirogianni E., Aivaliotis M., Karas M., Tsiotis G.* (2005) Detection and characterisation of catechol 2,3-dioxygenase in an indigenous soil pseudomonad by MALDI-TOF MS using a column separation. *Biodegradation*, 16(2): 181-186.

[Uhlik et al., 2011](#) – *Uhlik O., Strejcek M., Junkova P., Sanda M., Hroudova M., Vlcek C., Mackova M., Macek T.* (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry- and MALDIbiotyper-based identification of cultured biphenyl-metabolizing bacteria from contaminated horseradish rhizosphere soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(19): 6858-6866.

[van Veen et al., 2010](#) – *van Veen S.Q., Claas E.C., Kuijper E.J.* (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 48(3): 900-907.

[Veloo et al., 2016](#) – *Veloo A.C., de Vries E.D., Jean-Pierre H., Justesen U.S., Morris T., Urban E., Wybo I., van Winkelhoff A.J.* (2016). The optimization and validation of the Biotyper MALDI-TOF MS database for the identification of Gram-positive anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Infect.*, 22(9): 793-798.

[Walker et al., 2012](#) – *Walker B.N., Stolee J.A., Vertes A.* (2012). Nanophotonic ionization for ultratrace and single-cell analysis by mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 84(18): 7756-7762.

[Wang et al., 2013](#) – *Wang X.H., Zhang G., Fan Y.Y., Yang X., Sui W.J., Lu X.X.* (2013). Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laserdesorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *Journ. Microbiol. Meth.*, 92(3): 231-235.

[Wang et al., 2016](#) – *Wang H., Chen Y.L., Teng S.H., Xu Z.P., Xu Y.C., Hsueh P.R.* (2016). Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinical and Environmental Isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Front. Microbiol.*, 7: 4151-415-8.

[Wang et al., 2016b](#) – *Wang H., Fan Y.Y., Kudinha T., Xu Z.P., Xiao M., Zhang L., Fan X., Kong F., Xu Y.C.* (2016). A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems for

Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. *J. Clin. Microbiol.*, 54(5): 1376-1380.

Welker and Moore, 2011 – Welker M., Moore E.R. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34(1): 2-11.

Wilson et al., 2017 – Wilson D.A., Young S., Timm K., Novak-Weekley S., Marlowe E.M., Madisen N., Lillie J.L., Ledebor N.A., Smith R., Hyke J., Griego-Fullbright C., Jim P., Granato P.A., Faron M.L., Cumpio J., Buchan B.W., Procop G.W. (2017). Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinically Important Bacteria and Yeasts. *Am J Clin Pathol.* [in press]

Wimmer et al., 2012 – Wimmer J.L., Long S.W., Cernoch P., Land G.A., Davis J.R., Musser J.M., Olsen R.J. (2012). Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. *J. Clin. Microbiol.*, 50(7): 2452-2444.

Wojewoda et al., 2013 – Wojewoda C. {Education Committee of the Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientists} (2013). Pathology consultation on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for microbiology. *Am. Journ. Clin. Pathol.*, 140(2): 143-148.

Xiao et al., 2014 – Xiao D., Zhang H., He L., Peng X., Wang Y., Xue G., Su P., Zhang J. (2014). High natural variability bacteria identification and typing: Helicobacter pylori analysis based on peptide mass fingerprinting. *J. Proteomics.*, 98: 112-122.

Xiong et al., 2016 – Xiong C., Zhou X., He Q., Huang X., Wang J., Peng W.P., Chang H., Nie Z. (2016). Development of Visible-Wavelength MALDI Cell Mass Spectrometry for High-Efficiency Single-Cell Analysis. *Anal. Chem.*, 88(23): 11913-11918.

Yan et al., 2011 – Yan Y., He Y., Maier T., Quinn C., Shi G., Li H., Stratton C.W., Kostrzewa M., Tang Y.W. (2011). Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system. *Journ. Clin. Microbiol.*, 49(7): 2528-2532.

Yang et al., 2016 – Yang T., Gao D., Jin F., Jiang Y., Liu H. (2016). Surface-printed microdot array chips coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for high-throughput single-cell patterning and phospholipid analysis. *Rapid Comm. Mass Spectrom. Suppl.* 1: 73-79.

Zaytsev et al., 2015 – Zaytsev E.V., Orehov F. K., Gradov O. V. (2015). Spectral laser freezing point depression osmometers for medical biochemical/biophysical measurements & automatic recording of physico-chemical dynamics & reaction-diffusion kinetics of biocrystallization using multi-wavelength tunable diode laser modules. In: *AERC 2017: 11th Annual European Rheology Conference & 26th Nordic Rheology Conference (April 3 – 6, 2017; Copenhagen, Denmark)*.

Виро и др., 2012 – Виро О.Я., Иванов О.А., Нейцетаев Н.Ю., Харламов В.М. Элементарная топология. 2-е изд., исправл. М.: МЦНМО, 2012. 358+х с.

## References

Viro et al., 2012 – Viro O.Y., Ivanov O.A., Netsvetaev N.Y., Harlamov V.M. Elementary topology. Moscow, Moscow center for lifelong mathematical learning, 2012, 358 p.

Gradov, 2012a – Gradov O.V. (2012). Microtunnel multiparametric telemetric setups for continuous flow analysis of swamp media. In: *Swarm ecosystems*, PGU, Yoshkar-Ola, pp. 134–138.

Gradov, 2012b – Gradov O.V. (2012). Nonstandard greenhouse soil monitoring using CMOS soil chambers in lab-on-a-chip format. *Greenhouse Land*, (5): 43-46.

Gradov, 2012c – Gradov O.V. (2012). Digital array soil chambers and slides as lab-on-a-chip-sensors for swamp microbiology monitoring., In: *Swarm ecosystems*, PGU, Yoshkar-Ola, pp. 129–133.

Gradov, 2015a – Gradov O.V. (2015). Radiochemical microreactor and lab-on-a-chip based on scintillators with different quenching factors and specific shifters with different spectral emission characteristics. *Radiochemistry-2015*, p. 399.

Gradov, 2015b – Gradov O.V. (2015b). Novel principle for design of CMOS-lab-on-a-chip: field-driven soft matter architecture with multiple analogue signal converters into optical signal for multiparametric analysis. In: *Actual problems of physical and functional electronics*, pp. 64–65.

[Gradov, 2016](#) – *Gradov O.V.* (2016). Multiparametric lab-on-a-chip for position sensitive biochemical and physico-chemical measurements. “Scientific Instruments Conference”, Moscow, Federal State Unitary Enterprise Experimental Factory of Scientific Engineering and Special Design Department of Russian Academy of Sciences, pp. 183–185.

[Gradov et al., 2017a](#) – *Gradov O.V., Skrynnik A.A., Jablokow A.G.* (2017). Dynamical time-lapse morphometry of mixomycetes on a chip. *Mycology in Russia*, 6:92–94.

[Gradov et al., 2017b](#) – *Gradov O.V., Zaytsev E.V., Skrynnik A.A., Jablov A.G.* (2017). Laser videomilliosmometry as a tool for osmotrophy analysis. *Mycology in Russia*, 6:94-96.

[Gradov, Notchenko, 2012a](#) – *Gradov O.V., Notchenko A.V.* (2012). Accessible morphohistochemical labs-on-a-chip based on different counting chambers' grids: microfluidic morphodynamical workstations. *Morphologia*, 6(1): 5-19.

[Gradov, Notchenko, 2012b](#) – *Gradov O.V., Notchenko A.V.* (2012). Spectrozonol lab-on-a-chip with RF broadcasting. In: FREME-2012, Vol. 3 (6): 63-68.

[Gradov, Notchenko, 2017](#) – *Gradov O.V., Notchenko A.V.* (2012). Indication of stages / phase of cytotomy by mapping isophot of specklogram and digital analysis of borderness. *Biomedical Engineering and Electronics*, 1(15): 106-110.

[Zavarzin, 2004](#) – *Zavarzin, G.A.* (2004). Lectures on natural landscape microbiology. Moscow, Science, 2004, 348 p.

[Notchenko, Gradov, 2011](#) – *Notchenko A.V., Gradov O.V.* (2011). Topological laser speckle analyzer of differentiation and proliferation activity during morphogenesis in cell cultures морфогенезі. *Morphologia*, 5(4): 10-19.

[Omelyanski, 1924](#) – *Omelyanskiy V.L.* (1924). Miscoorganisms as chemical reagents Leningrad. Sci, Chem.-Tech. Press, 1924, 54 p.

[Omelyanski, 1929](#) – *Omelyanskiy V.L.* (1929). Short course of general and soil microbiology. Moscow – Leningrad, OGIZ, 1929, 184 p.

[Omelyanski, 1940](#) – *Omelyanskiy V.L.* (1940). Praktical handbook for microbiologists. Moscow – Leningrad, Academy of sciences (USSR), 1940, 432 p.

[Pasteur, 1864](#) – *Pasteur L.* (1864). About atmospheric organized bodies. Saint Petersburg, Tschervyakov typography, 1864, 110 c.

[Rhiznichenko, Rubin, 1993](#) – *Rhiznichenko G.Y., Rubin A.B.* (1993). Mathematical models of production processes. Moscow State University Press, Moscow, 1993, 302 p.

[Rhiznichenko, Rubin, 2004](#) – *Rhiznichenko G.Y., Rubin A.B.* (2004). Biophysical dynamics of production processes. IKI, Moscow-Izhevsk, 2004. 464 p.

[Agnihotrudu, 1962](#) – *Agnihotrudu V.* (1962). A comparison of some techniques for the isolation of fungi from tea soils. *Mycopathologia*, 16(3), 235-242.

[Alatoom et al., 2011](#) – *Alatoom A.A., Cunningham S.A., Ihde S.M., Mandrekar J., Patel R.* (2011). Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 49(8): 2868-2873.

[Alexandrov et al., 2015](#) – *Alexandrov P., Notchenko A., Gradova M., Gradov O.* (2015). Simultaneous in situ detection of the optical fluorescence, fluorescence recovery kinetics after photobleaching & membrane ion flux on the electrophysiological lab-on-a-chip. *American Journal of Optics and Photonics*, 3(5):118–122.

[Alvarez-Buylla et al., 2012](#) – *Alvarez-Buylla A., Culebras E., Picazo J.J.* (2012). Identification of Acinetobacter species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol.*, 12(2): 345-349.

[Amantonico et al., 2010](#) – *Amantonico A., Urban P.L., Fagerer S.R., Balabin R.M., Zenobi R.* (2010). Single-cell MALDI-MS as an analytical tool for studying intrapopulation metabolic heterogeneity of unicellular organisms. *Anal. Chem.*, 82(17): 7394-7400.

[Avanzi et al., 2017](#) – *Avanzi I.R., Gracioso L.H., Baltazar M.D., Karolski B., Perpetuo E.A., do Nascimento C.A.* (2017). Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. *Envir. Sci. Pollut. Res. Int.*, 24(4): 3717-3726.

[Barreau et al., 2013](#) – *Barreau M., Pagnier I., La Scola B.* (2013). Improving the identification of anaerobes in the clinical microbiology laboratory through MALDI-TOF mass spectrometry. *Anaerobe*, 22: 123-125.

- [Bizzini et al., 2010](#) – Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G., Prod'hom G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journ. Clin. Microbiol.*, 48(5): 1549-1554.
- [Blair, 1943](#) – Blair I. D. (1943). Behaviour of the fungus *Rhizoctonia solani* Kiihn in the soil. *Annals of applied Biology*, 30(2), 118-127.
- [Boggio et al., 2011](#) – Boggio K.J., Obasuyi E., Sugino K., Nelson S.B., Agar N.Y., Agar J.N. (2011). Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact. *Exp. Rev. Proteom.*, 8(5): 591-604.
- [Brivio et al., 2005](#) – Brivio M., Tas N.R., Goedbloed M.H., Gardeniers H.J., Verboom W., van den Berg A., Reinhoudt D.N. (2005). A MALDI-chip integrated system with a monitoring window. *Lab Chip*, 5(4): 378-381.
- [Brown, 1958](#) – Brown J.C. (1958). Fungal mycelium in dune soils estimated by a modified impression slide technique. *Transactions of the British Mycological Society*, 41(1): 81-88.
- [Buchan et al., 2012](#) – Buchan B.W., Riebe K.M., Ledebner N.A. (2012). Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *Journ. Clin. Microbiol.*, 50(2): 346-352.
- [Budin et al., 2012](#) – Budin G., Chung H.J., Lee H., Weissleder R. (2012). A magnetic Gram stain for bacterial detection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(31): 7752-7755.
- [Chang et al., 2015](#) – Chang Q., Ornatsky O.I., Koch C.J., Chaudary N., Marie-Egyptienne D.T., Hill R.P., Tanner S.D., Hedley D.W. (2015). Single-cell measurement of the uptake, intratumoral distribution and cell cycle effects of cisplatin using mass cytometry. *Int. J. Cancer.*, 136(5): 1202-1209.
- [Chen et al., 2010](#) – Chen S.Y., Li K.I., Yu C.S., Wang J.S., Hu Y.C., Lai C.C. (2010). A radiate microstructure MALDI chip for sample concentration and detection. *Anal. Chem.*, 82(14): 5951-5957.
- [Chen et al., 2011](#) – Chen S.Y., Juang Y.M., Chien M.W., Li K.I., Yu C.S., Lai C.C. (2011). Magnetic iron oxide nanoparticle enrichment of phosphopeptides on a radiate microstructure MALDI chip. *Analyst*, 136(21): 4454-4459.
- [Chen et al., 2015](#) – Chen Y.S., Liu Y.H., Teng S.H., Liao C.H., Hung C.C., Sheng W.H., Teng L.J., Hsueh P.R. (2015). Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry Bruker Biotyper for identification of *Penicillium marneffei*, *Paecilomyces* species, *Fusarium solani*, *Rhizopus* species, and *Pseudallescheria boydii*. *Front. Microbiol.*, 6: 679.
- [Cheng et al., 2015](#) – Cheng W.C., Jan I.S., Chen J.M., Teng S.H., Teng L.J., Sheng W.H., Ko W.C., Hsueh P.R. (2015). Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Vibrio* species. *Journ. Clin. Microbiol.*, 53(5): 1741-1744.
- [Chesters & Thornton, 1956](#) – Chesters C. G., Thornton R.H. (1956). A comparison of techniques for isolating soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 39(3): 301-313.
- [Chien et al., 2016](#) – Chien J.Y., Lee T.F., Du S.H., Teng S.H., Liao C.H., Sheng W.H., Teng L.J., Hsueh P.R. (2016). Applicability of an in-House Saponin-Based Extraction Method in Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Bacterial and Fungal Species in Positively Flagged Blood Cultures. *Front. Microbiol.*, 7: 1432.
- [Chiu, 2014](#) – Chiu T.C. (2014). Recent advances in bacteria identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using nanomaterials as affinity probes. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(5): 7266-7280.
- [Cholodny, 1929](#) – Cholodny N. (1929). Zur Methodik der quantitativen Erforschung des bakteriellen Planktons. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. A*, 77: 179-193.
- [Cholodny, 1930](#) – Cholodny N. (1930). Über eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. *Archiv für Mikrobiologie*, 1(1): 620-652.
- [Cholodny, 1934](#) – Cholodny N.G. (1934). A soil chamber as a method for the microscopic study of the soil microflora. *Archives of Microbiology*, 5(1): 148-156.
- [Cholodny, 1936](#) – Cholodny N.G. (1936). Bodenstaubkulturen und die Mikroflora des Bodens. *Archiv für Mikrobiologie*, 7(1): 286-296.



Clark et al., 2013 – Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26(3): 547-603.

Coffman, 2014 – Coffman K. (2014). The Rossi-Cholodny Buried Slide Technique. 28 Oct. 2014. <https://prezi.com/mtrtaxf9brha/the-rossi-cholodny-buried-slide-technique/>

Cooke, 1956 – Cooke W.B. (1956). Colonization of artificial bare areas by microorganisms. *The Botanical Review*, 22(9): 613-638.

Cullimore, Pipe, 1980 – Cullimore D.R., Pipe A.E. (1980). Studying the activities of microorganisms in soil using slides. *Journal of Biological Education*, 14(3): 213-218.

Cunningham, Patel, 2013 – Cunningham S.A., Patel R. (2013). Importance of using Bruker's security-relevant library for Biotyper identification of Burkholderia pseudomallei, Brucella species, and Francisella tularensis. *J. Clin. Microbiol.*, 51(5): 1639-1640.

D'aeth, 1939 – D'aeth H.R.X. (1939). A survey of interaction between fungi. *Biological Reviews*, 14(2): 105-131.

De Bel et al., 2010 – De Bel A., Wybo I., Piérard D., Lauwers S. (2010). Correct implementation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in routine clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.*, 48(5): 1991.

Del Chierico et al., 2016 – Del Chierico F., Di Cave D., Accardi C., Santoro M., Masotti A., D'Alfonso R., Berrilli F., Urbani A., Putignani L. (2016). Identification and typing of free-living Acanthamoeba spp. by MALDI-TOF MS Biotyper. *Exp. Parasitol.*, 170: 82-89.

DeMarco and Ford, 2013 – DeMarco M.L., Ford B.A. (2013). Beyond identification: emerging and future uses for MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Clin. Lab. Med.*, 33(3): 611-628.

Diaz, 2013 – Diaz L. (2013). Tecnica Cholodny Rossi, 23 September 2013. URL: <https://prezi.com/k25pm5dnejxf/tecnica-cholodny-rossi/>

Dupont et al., 2010 – Dupont C., Sivadon-Tardy V., Bille E., Dauphin B., Beretti J.L., Alvarez A.S., Degand N., Ferroni A., Rottman M., Herrmann J.L., Nassif X., Ronco E., Carbonnelle E. (2010). Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16(7): 998-1004.

Emara et al., 2017 – Emara S., Amer S., Ali A., Abouleila Y., Oga A., Masujima T. (2017). Single-Cell Metabolomics. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 965: 323-343.

Faron et al., 2015 – Faron M.L., Buchan B.W., Hyke J., Madisen N., Lillie J.L., Granato P.A., Wilson D.A., Procop G.W., Novak-Weekley S., Marlowe E., Cumpio J., Griego-Fullbright C., Kindig S., Timm K., Young S., Ledebor N.A. (2015). Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram-Negative Bacterial Isolates. *PLoS One.*, 10(11): E0141350-1 – E0141350-13.

Faryal, 2014 – Faryal A. (2014). Rossi-Cholodny technique. Introduction. 04 April 2014. URL: <https://faryalkhushik.wordpress.com/2014/04/04/rossi-cholodny-technique/>

Fiori et al., 2016 – Fiori B., D'Inzeo T., Giaquinto A., Menchinelli G., Liotti F.M., de Maio F., De Angelis G., Quaranta G., Nagel D., Tumbarello M., Posteraro B., Sanguinetti M., Spanu T. (2016). Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 54(3): 576-584.

Ford and Burnham, 2013 – Ford B.A., Burnham C.A. (2013). Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. *J. Clin. Microbiol.*, 51(5): 1412-1420.

Forest, 1962 – Forest, H. S. (1962). Analysis of the soil algal community. *Transactions of the American Microscopical Society*, 81(2): 189-198.

Fraser et al., 2016 – Fraser M., Brown Z., Houldsworth M., Borman A.M., Johnson E.M. (2016). Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Med. Mycol.*, 54(1): 80-88.

Fu et al., 2016 – Fu Q., Tang J., Cui M., Xing J., Liu Z., Liu S. (2016). Application of porous metal enrichment probe sampling to single cell analysis using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J. Mass Spectrom.*, 51(1): 62-68.

Gao et al., 2013 – Gao Y., Lin Y., Zhang B., Zou D., He M., Dong B., Hang W., Huang B. (2013). Single-cell elemental analysis via high irradiance femtosecond laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 85(9): 4268-4272.

Gholipour et al., 2008 – Gholipour Y., Nonami H., Erra-Balsells R. (2008). Application of pressure probe and UV-MALDI-TOF MS for direct analysis of plant underivatized carbohydrates in subpicoliter single-cell cytoplasm extract. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 19(12): 1841-1848.

Golbraikh et al., 2003 – Golbraikh E., Rapis, E.G., Moiseev S.S. (2003). On the crack pattern formation in a freely drying protein film. *Technical Physics*, 48(10), 1333-1337.

Gradov, 2012 – Gradov O. V. (2012). Digital lab-on-a-chip as analog of soil chambers & rossi-cholodny slides. *VII Int. Symp. CBAFFF (7-th Fr. Progr.)*: 17–18.

Gradov, 2017 – Gradov O. V. (2017). Multi-functional microprobe lab-on-a-chip based on the active-pixel sensor with the position-sensitive cassette masks assembled from discrete converters of different biophysical and biochemical parameters into the optical response signals [invited paper]. *International Journal of Modern Physics*, 2(1): 23–28.

Gradov and Jablovkov, 2016 – Gradov O. V., Jablovkov A. G. (2016). Novel morphometrics-on-a-chip: CCD- or CMOS-lab-on-a-chip based on discrete converters of different physical and chemical parameters of histological samples into the optical signals with positional sensitivity for morphometry of non-optical patterns. *Journal of Biomedical Technologies*, (2):1–29.

Grenfell et al., 2016 – Grenfell R.C., da Silva Junior A.R., Del Negro G.M., Munhoz R.B., Gimenes V.M., Assis D.M., Rockstroh A.C., Motta A.L., Rossi F., Juliano L., Benard G., de Almeida Júnior J.N. (2016). Identification of *Candida haemulonii* Complex Species: Use of ClinProTools to Overcome Limitations of the Bruker Biotyper(TM), VITEK MS(TM) IVD, and VITEK MS(TM) RUO Databases. *Front. Microbiol.*, 7: 940.

Guillaume-Gentil et al., 2017 – Guillaume-Gentil O., Rey T., Kiefer P., Ibáñez A.J., Steinhoff R., Brönnimann R., Dorwling-Carter L., Zambelli T., Zenobi R., Vorholt J.A. (2017). Single-Cell Mass Spectrometry of Metabolites Extracted from Live Cells by Fluidic Force Microscopy. *Anal. Chem.*, 89(9): 5017-5023.

Guo et al., 2014 – Guo L., Ye L., Zhao Q., Ma Y., Yang J., Luo Y. (2014). Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *J. Thorac. Dis.*, 6(5): 534-538.

Halim et al., 2009 – Halim V.A., Muck A., Hartl M., Ibáñez A.J., Giri A., Erfurth F., Baldwin I.T., Svatos A. (2009). A dual fluorescent / MALDI chip platform for analyzing enzymatic activity and for protein profiling. *Proteomics*. 9(1): 171-181.

Hammarström et al., 2014 – Hammarström B., Nilson B., Laurell T., Nilsson J., Ekström S. (2014). Acoustic trapping for bacteria identification in positive blood cultures with MALDI-TOF MS. *Anal Chem.*, 86(21): 10560-10567.

Harju et al., 2017 – Harju I., Lange C., Kostrzewa M., Maier T., Rantakokko-Jalava K., Haanperä M. (2017). Improved Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* and Other *S. mitis* Group Streptococci by MALDI Biotyper Using an Improved MALDI Biotyper Database Content and a Novel Result Interpretation Algorithm. *J. Clin. Microbiol.*, 55(3): 914-922.

Hartmann et al., 2015 – Hartmann E.M., Colquhoun D.R., Schwab K.J., Halden R.U. (2015). Absolute quantification of norovirus capsid protein in food, water, and soil using synthetic peptides with electrospray and MALDI mass spectrometry. *J. Haz. Mater.*, 286: 525-532.

He et al., 2010 – He Y., Li H., Lu X., Stratton C.W., Tang Y.W. (2010). Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *J. Clin. Microbiol.*, 48(11): 3888-3892.

Hirsch, Pankratz, 1970 – Hirsch P., Pankratz S. H. (1970). Study of bacterial populations in natural environments by use of submerged electron microscope grids. *J. Bas. Microbiol.*, 10(8), 589-605.

Hirte, 1965 – Hirte W. F. (1965). Arbeitsmethoden in der naturwissenschaftlichen und technischen Mikrobiologie. I. Die Anwendung der Verdünnungsplattenmethode zur Erfassung der Bodenmikroflora. 1. Der quantitative Nachweis. *Zentralbl. Bakteriol.*, 119: 429-447.

Hölscher et al., 2009 – Hölscher D., Shroff R., Knop K., Gottschaldt M., Crecelius A., Schneider B., Heckel D.G., Schubert U.S., Svatos A. (2009) Matrix-free UV-laser desorption / ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *Plant J.*, 60(5): 907-918.

Hossen et al., 2015 – Hossen M.A., Nagata Y., Waki M., Ide Y., Takei S., Fukano H., Romero-Perez G.A., Tajima S., Yao I., Ohnishi K., Setou M. (2015). Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: a single-cell MALDI-IMS approach. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(18): 5273-5280.

Hsueh et al., 2014 – Hsueh P.R., Kuo L.C., Chang T.C., Lee T.F., Teng S.H., Chuang Y.C., Teng L.J., Sheng W.H. (2014). Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 52(8): 3095-3100.

Hsueh et al., 2014 – Hsueh P.R., Lee T.F., Du S.H., Teng S.H., Liao C.H., Sheng W.H., Teng L.J. (2014). Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. *J. Clin. Microbiol.*, 52(7): 2371-2379.

Imanishi et al., 2017 – Imanishi S.Y., Nakayama T., Asukabe H., Harada K.I. (2017). Application of MALDI Biotyper to cyanobacterial profiling. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 31(4): 325-332.

Ivanova, 2016 – Ivanova B. (2016). Erratum to: Solid-state UV-MALDI mass spectrometric quantitation of fluroxypyr and triclopyr in soil. *Environ. Geochem. Health.*, 38(5): 1215.

Ivanova and Spiteller, 2015 – Ivanova B., Spiteller M. (2015). Solid-state UV-MALDI mass spectrometric quantitation of fluroxypyr and triclopyr in soil. *Environ. Geochem. Health.*, 37(3): 557-574.

Jablokov et al., 2015 – Jablokov A., Skrynnik A., Gradov O. (2015). Applications of tunable diode lasers and the tunable laser diode spectroscopy in tschachotin's microbeam setups for irradiation of biological tissues, cells and cellular compartments with positional selectivity. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 5(3): 74.

Jannasch, 1958 – Jannasch, H. W. (1958). Studies on planktonic bacteria by means of a direct membrane filter method. *Microbiology*, 18(3), 609-620.

Kim et al., 2017 – Kim S.W., Nho S.W., Im S.P., Lee J.S., Jung J.W., Lazarte J.M., Kim J., Lee W.J., Lee J.H., Jung T.S. (2017). Rapid MALDI biotyper-based identification and cluster analysis of *Streptococcus iniae*. *J. Microbiol.*, 55(4): 260-266.

Klepárník, 2013 – Klepárník K. (2013). Recent advances in the combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: from element to single-cell analysis. *Electrophoresis.*, 34(1): 70-85.

Kling, 2001 – Kling J. (2001). MALDI chip shot. *Anal Chem.*, 73(3): 68A, 70A.

Kok et al., 2013 – Kok J., Chen S.C., Dwyer D.E., Iredell J.R. (2013). Current status of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Pathology*, 45(1): 4-17.

Krismer et al., 2015 – Krismer J., Sobek J., Steinhoff R.F., Fagerer S.R., Pabst M., Zenobi R. (2015). Screening of *Chlamydomonas reinhardtii* Populations with Single-Cell Resolution by Using a High-Throughput Microscale Sample Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(16): 5546-5551.

Krismer et al., 2016 – Krismer J., Steinhoff R.F., Zenobi R. (2016). Single-cell MALDI Tandem Mass Spectrometry: Unambiguous Assignment of Small Biomolecules from Single *Chlamydomonas reinhardtii* Cells. *Chimia*, 70(4): 236-239.

Kumari N. Rossi Cholodney Tech. <http://www.authorstream.com/Presentation/ayesha2-1205282-rossi-cholodney-tech/>

Kurokawa et al., 2013 – Kurokawa S., Kabayama J., Fukuyasu T., Hwang S.D., Park C.J., Park S.B., del Castillo C.S., Hikima J., Jung T.S., Kondo H., Hirono I., Takeyama H., Aoki T. (2013). Bacterial classification of fish-pathogenic Mycobacterium species by multigene phylogenetic analyses and MALDI Biotyper identification system. *Mar. Biotechnol.*, 15(3):340-348.

Långmark et al., 2001 – Långmark J., Ashbolt N.J., Szewzyk U., Stenström T.A. (2001). Adequacy of in situ glass slides and direct sand extractions to assess the microbiota within sand columns used for drinking water treatment. *Canadian journal of microbiology*, 47(7): 601-607.

Lee et al., 2017 – Lee H.S., Shin J.H., Choi M.J., Won E.J., Kee S.J., Kim S.H., Shin M.G., Suh S.P. (2017). Comparison of the Bruker Biotyper and VITEK MS Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Systems Using a Formic Acid Extraction Method to Identify Common and Uncommon Yeast Isolates. *Ann. Lab. Med.*, 37(3): 223-230.

Lévesque et al., 2015 – Lévesque S., Dufresne P.J., Soualhine H., Domingo M.C., Bekal S., Lefebvre B., Tremblay C. (2015). A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. *PLoS One*, 10(12): e0144878.

Li et al., 2000 – Li L., Garden R.W., Sweedler J.V. (2000). Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling. *Trends Biotechnol.* 18(4): 151-160.

Li et al., 2017 – Li X., Chen X., Tan J., Liang X., Wu J. (2017). Palladium modified porous silicon as multi-functional MALDI chip for serum peptide detection. *Analyst*, [in press]

Lohmann et al., 2013 – Lohmann C., Sabou M., Moussaoui W., Prévost G., Delarbre J.M., Candolfi E., Gravet A., Letscher-Bru V. (2013). Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS systems for yeast identification by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 51(4):1231-6.

Mach, 2012 – Mach J. (2012). Mass spectrometry imaging with single-cell resolution: spatial distribution of lipids in cotton seeds. *Plant Cell*, 24(2): 371.

Mancini et al., 2013 – Mancini N., De Carolis E., Infurnari L., Vella A., Clementi N., Vaccaro L., Ruggeri A., Posteraro B., Burioni R., Clementi M., Sanguinetti M. (2013). Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J. Clin. Microbiol.*, 51(7): 2453-2457.

Marko et al., 2012 – Marko D.C., Saffert R.T., Cunningham S.A., Hyman J., Walsh J., Arbefeville S., Howard W., Pruessner J., Safwat N., Cockerill F.R., Bossler A.D., Patel R., Richter S.S. (2012). Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, 50(6): 2034-2039.

Masujima, 2009 – Masujima T. (2009). Live single-cell mass spectrometry. *Anal. Sci.*, 25(8): 953-960.

McElvania TeKippe and Burnham., 2014 – McElvania TeKippe E., Burnham C.A. (2014). Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 33(12): 2163-2171.

McElvania Tekippe, 2013 – McElvania Tekippe E., Shuey S., Winkler D.W., Butler M.A., Burnham C.A. (2013). Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J. Clin. Microbiol.*, 51(5): 1421-1427.

Moon et al., 2013 – Moon H.W., Lee S.H., Chung H.S., Lee M., Lee K. (2003). Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *J. Med. Microbiol.*, 62(Pt 9): 1301-6.

Moshynets et al., 2011 – Moshynets O.V., Koza A., Dello Sterpaio P., Kordium V. A., Spiers A.J. (2011). Up-dating the Cholodny method using PET films to sample microbial communities in soil. *Biopolymers & Cell*, 27 (3): 199-205.

Nair, 1970 – Nair N. G. (1979). Studies on the behaviour of mushroom spores in relation to the epidemiology of virus disease. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30(6): 1123-1132.

Neupert et al., 2005 – Neupert S., Predel R., Russell W.K., Davies R., Pietrantonio P.V., Nachman R.J. (2005). Identification of tick periviscerokin, the first neurohormone of Ixodidae: single cell analysis by means of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 338(4): 1860-1864.

Ngan et al., 2012 – Ngan G.J., Lin R.T., Teo J.W. (2012). Utility of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometer in a clinical microbiology laboratory. *Pathology*, 44(5): 493-496.

Notchenko and Gradov, 2013 – Notchenko A. V. and Gradov O. V. (2013). Elementary morphometric labs-on-a-chip based on hemocytometric chambers with radiofrequency culture identification and relay of spectrozonal histochemical monitoring. *Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine*, 2(1).

Oganessian et al., 2015 – Oganessian V.A., Notchenko A.V., Gradov O.V. (2015). Multispectral topological laser speckle analyzers of proliferation and differentiation activity during morphogenesis based on tunable laser diodes and spectrometric fingerprinting of the cell cycle stages. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 5(3): 75.

Ong et al., 2015 – Ong T.H., Kissick D.J., Jansson E.T., Comi T.J., Romanova E.V., Rubakhin S.S., Sweedler J.V. (2015). Classification of Large Cellular Populations and Discovery of Rare Cells Using Single Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem.*, 87(14): 7036-7042.

Oppenheimer and ZoBell, 1952 – Oppenheimer C.H., ZoBell C.E (1952). Bacterial populations in seawater as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.*, 4: 128-139.

Orehov, Gradov, 2017 – Orehov T. C. and Gradov O. V. (2017). Spectroscopic tunable laser rheogoniometer for weissenberg effect observation in condensed milk products as liquids with nonnewtonian viscosity. In: *AERC 2017: 11th Annual European Rheology Conference & 26th Nordic Rheology Conference (April 3 – 6, 2017; Copenhagen, Denmark)*, volume 1, pages 104–105. Copenhagen, Denmark.

Orehov et al., 2016 – Orehov F. K., Jablovkov A. G., Skrynnik A. A. (2016). Hybridization of laser-induced spectrofluorescence analysis (LIFS), matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry (MALDI), fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and fluorescence loss in photobleaching (FLIP) microtechnics. *Journal of Biomedical Technologies*, (2): 42–52.

Passarelli and Ewing, 2013 – Passarelli M.K., Ewing A.G. (2013). Single-cell imaging mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 17(5): 854-859.

Patel, 2013 – Patel R. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin. Chem.*, 59(2): 340-342.

Patel, 2013 – Patel R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin. Infect. Dis.*, 57(4): 564-572.

Perdian et al., 2010 – Perdian D.C., Cha S., Oh J., Sakaguchi D.S., Yeung E.S., Lee Y.J. (2010). In situ probing of cholesterol in astrocytes at the single-cell level using laser desorption ionization mass spectrometric imaging with colloidal silver. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24(8): 1147-1154.

Pipe, Cullimore, 1980 – Pipe A.E., Cullimore D.R. (1980). An implanted slide technique for examining the effects of the herbicide diuron on soil algae. *Bull. Environment. Contam. Toxicol.*, 24(1): 306-312.

Prasad, 1977 – Prasad M. (1977). Microbial Society and its Activity in the Soil. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie*, 132(7): 659-665.

Rapis, 1995 - Rapis E.G. (1995). The self-organization of protein. *Technical Physics Letters*, 21: 321-324.

Rapis, 2000 – Rapis E.G. (2000). Self-assembly of cluster protein films (allotropic nonequilibrium noncrystalline modification) during the process or their condensation. *Technical Physics*, 45(1): 121-131.

Rapis, 2001 – Rapis E. (2001). Properties and symmetry of the solid cluster phase of protein. *Technical Physics*, 46(10): 1307-1313.

Rapis, 2002 – Rapis E. (2002). A change in the physical state of a nonequilibrium blood plasma protein film in patients with carcinoma. *Technical Physics*, 47(4): 510-512.

Rapis, 2004 - Rapis E. (2004). Self-organization and supramolecular chemistry of protein films from the nano-to the macroscale. *Technical Physics*, 49(4): 494-498.

Rapis, 2005 - Rapis E. (2005). On the problem of nucleation (cell formation) in self-organization of protein nanostructures in vitro and in vivo. *Technical physics*, 50(6): 780-786.

Rapis, 2005 – Rapis E. (2005). Relaxation of the energy of the protein colloidal solution arising at drying in open and closed systems. *Technical physics*, 50(9): 1236-1238.

Rapis, 2006 – Rapis E. (2006). Nonequilibrium state of self-organized protein nanostructures. *Technical physics*, 51(2): 268-273.

Rapis, 2007 - Rapis E. (2007). On the nonequilibrium phase transition in protein. *Technical Physics*, 52(6): 787-792.

[Rapis, 2008](#) – *Rapis E.* (2008). Evolutionary aspect of protein self-organization. *Technical Physics*, 53(6), 783-788.

[Rapis, Gasanova, 1991](#) – *Rapis E.G., Gasanova G.* (1991). Autowave process in the dynamics of phase transition in a protein film. *Technical physics*, 36(4): 406-412.

[Rawlins et al., 2015](#) – *Rawlins C.M., Salisbury J.P., Feldman D.R., Isim S., Agar N.Y., Luther E., Agar J.N.* (2015). Imaging and Mapping of Tissue Constituents at the Single-Cell Level Using MALDI MSI and Quantitative Laser Scanning Cytometry. *Meth. Mol Biol.*, 1346: 133-149.

[Rhizoctonia solani, biology and pathology, 1970](#) – Parmeter, J. R. (Ed.). (1970). *Rhizoctonia solani, biology and pathology*. Univ of California Press. 1970

[Richter et al., 2012](#) – *Richter C., Hollstein S., Woloszyn J., Kaase M., Gatermann S.G., Szabados F.* (2012). Evaluation of species-specific score cut-off values for various *Staphylococcus* species using a MALDI Biotyper-based identification. *J. Med. Microbiol.*, 61(Pt 10): 1409-16.

[Rodríguez-Sánchez et al., 2016](#) – *Rodríguez-Sánchez B., Ruiz-Serrano M.J., Ruiz A., Timke M., Kostrzewa M., Bouza E.* (2016). Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 54(4): 1144-1147.

[Rubakhin and Sweedler, 2008](#) – *Rubakhin S.S., Sweedler J.V.* (2008). Quantitative measurements of cell-cell signaling peptides with single-cell MALDI MS. *Anal. Chem.*, 80(18): 7128-7136.

[Saffert et al., 2011](#) – *Saffert R.T., Cunningham S.A., Ihde S.M., Jobe K.E., Mandrekar J., Patel R.* (2011). Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, 49(3): 887-892.

[Santos et al., 2016](#) – *Santos I.C., Hildenbrand Z.L., Schug K.A.* Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 141(10): 2827-2837.

[Schmidt et al., 2014](#) – *Schmidt A.M., Fagerer S.R., Jefimovs K., Buettner F., Marro C., Siringil E.C., Boehlen K.L., Pabst M., Ibáñez A.J.* (2014). Molecular phenotypic profiling of a *Saccharomyces cerevisiae* strain at the single-cell level. *Analyst*, 139(22): 5709-17.

[Schmitt et al., 2013](#) – *Schmitt B.H., Cunningham S.A., Dailey A.L., Gustafson D.R., Patel R.* (2013). Identification of anaerobic bacteria by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with on-plate formic acid preparation. *J. Clin. Microbiol.*, 51(3): 782-686.

[Schober et al., 2012](#) – *Schober Y., Guenther S., Spengler B., Römpf A.* (2012). Single cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.*, 84(15): 6293-6297.

[Schulthess et al., 2014](#) – *Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M.* (2014). Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 52(4): 1089-1097.

[Schulthess et al., 2014](#) – *Schulthess B., Ledermann R., Mouttet F., Zbinden A., Bloemberg G.V., Böttger E.C., Hombach M.* (2014). Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 52(8): 2797-2803.

[Schulthess et al., 2016](#) – *Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden A., Mouttet F., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M.* (2016). Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Fastidious Gram-Negative Rods. *J. Clin. Microbiol.*, 54(3): 543-548.

[Seng et al., 2010](#) – *Seng P., Rolain J.M., Fournier P.E., La Scola B., Drancourt M., Raoult D.* (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.*, 5(11): 1733-1754.

[Seng et al., 2013](#) – *Seng P., Abat C., Rolain J.M., Colson P., Lagier J.C., Gouriet F., Fournier P.E., Drancourt M., La Scola B., Raoult D.* (2013). Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 51(7): 2182-2194.

[Shabalín et al., 1994](#) – *Shabalín V.N., Shatokhina S.N., Dutov V.V., Trapeznikova M.F., Morozov A.P., Mitroshnikov A.N.* et al. (1994). U.S. Patent No. 5,366,899. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

[Shabalin, Shatokhina, 1996](#) – *Shabalin V.N., Shatokhina S.N.* (1996). Autogenous rhythms and self-organization of biological fluids. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 122(4): 967-973.

[Shabalin, Shatokhina, 2007](#) – *Shabalin V. N., Shatokhina S. N.* (2007). Diagnostic markers in the structures of human biological liquids. *Singapore medical journal*, 48(5): 440.

[Shan et al., 2002](#) – *Shah H.N., Keys C.J., Schmid O., Gharbia S.E.* (2002). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Clin. Infect. Dis.*, 35(Suppl 1): S58-S64.

[Shimizu et al., 2002](#) – *Shimizu M., Levi-Schaffer F., Ojima N., Shingaki T., Masujima T.* (2002). A single-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectroscopic assay of the cell-maturation process. *Anal. Sci.*, 18(2): 107-108.

[Skrynnik, 2015](#) – *Skrynnik A.* (2015). Laser scanning biological microscope for non-invasive studies of the cell structures without fluorescent dyes. In: *Super-resolution in different dimensions*, page 87. OJSC "Human Stem Cell Institute," Moscow, Russia Moscow, Russia.

[Sogawa et al., 2011](#) – *Sogawa K., Watanabe M., Sato K., Segawa S., Ishii C., Miyabe A., Murata S., Saito T., Nomura F.* (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem.*, 400(7): 1905-1911.

[Sulochana, 1952](#) – *Sulochana C.B.* (1952). Soil conditions and root diseases. *Proceedings: Plant Sciences*, 36(6), 234-242.

[Szabados et al., 2010](#) – *Szabados F., Woloszyn J., Richter C., Kaase M., Gatermann S.* (2010). Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database. *J. Med. Microbiol.*, 59(Pt 7): 787-790.

[Theel et al., 2012](#) – *Theel E.S., Schmitt B.H., Hall L., Cunningham S.A., Walchak R.C., Patel R., Wengenack N.* (2012). Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 50(9): 3093-3095.

[Tsirogianni et al., 2005](#) – *Tsirogianni E., Aivaliotis M., Karas M., Tsiotis G.* (2005) Detection and characterisation of catechol 2,3-dioxygenase in an indigenous soil pseudomonad by MALDI-TOF MS using a column separation. *Biodegradation*, 16(2): 181-186.

[Uhlik et al., 2011](#) – *Uhlik O., Strejcek M., Junkova P., Sanda M., Hroudova M., Vlcek C., Mackova M., Macek T.* (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry- and MALDIbiotyper-based identification of cultured biphenyl-metabolizing bacteria from contaminated horseradish rhizosphere soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(19): 6858-6866.

[van Veen et al., 2010](#) – *van Veen S.Q., Claas E.C., Kuijper E.J.* (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 48(3): 900-907.

[Veloo et al., 2016](#) – *Veloo A.C., de Vries E.D., Jean-Pierre H., Justesen U.S., Morris T., Urban E., Wybo I., van Winkelhoff A.J.* (2016). The optimization and validation of the Biotyper MALDI-TOF MS database for the identification of Gram-positive anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Infect.*, 22(9): 793-798.

[Walker et al., 2012](#) – *Walker B.N., Stolee J.A., Vertes A.* (2012). Nanophotonic ionization for ultratrace and single-cell analysis by mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 84(18): 7756-7762.

[Wang et al., 2013](#) – *Wang X.H., Zhang G., Fan Y.Y., Yang X., Sui W.J., Lu X.X.* (2013). Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laserdesorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *Journ. Microbiol. Meth.*, 92(3): 231-235.

[Wang et al., 2016](#) – *Wang H., Chen Y.L., Teng S.H., Xu Z.P., Xu Y.C., Hsueh P.R.* (2016). Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinical and Environmental Isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Front. Microbiol.*, 7: 4151-415-8.

[Wang et al., 2016b](#) – *Wang H., Fan Y.Y., Kudinha T., Xu Z.P., Xiao M., Zhang L., Fan X., Kong F., Xu Y.C.* (2016). A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems for

Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. *J. Clin. Microbiol.*, 54(5): 1376-1380.

Welker and Moore, 2011 – Welker M., Moore E.R. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34(1): 2-11.

Wilson et al., 2017 – Wilson D.A., Young S., Timm K., Novak-Weekley S., Marlowe E.M., Madisen N., Lillie J.L., Ledebor N.A., Smith R., Hyke J., Griego-Fullbright C., Jim P., Granato P.A., Faron M.L., Cumpio J., Buchan B.W., Procop G.W. (2017). Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinically Important Bacteria and Yeasts. *Am J Clin Pathol.* 2017 [in press]

Wimmer et al., 2012 – Wimmer J.L., Long S.W., Cernoch P., Land G.A., Davis J.R., Musser J.M., Olsen R.J. (2012). Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. *J. Clin. Microbiol.*, 50(7): 2452-2444.

Wojewoda et al., 2013 – Wojewoda C. {Education Committee of the Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientists} (2013). Pathology consultation on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for microbiology. *Am. Journ. Clin. Pathol.*, 140(2): 143-148.

Xiao et al., 2014 – Xiao D., Zhang H., He L., Peng X., Wang Y., Xue G., Su P., Zhang J. (2014). High natural variability bacteria identification and typing: Helicobacter pylori analysis based on peptide mass fingerprinting. *J. Proteomics.*, 98: 112-122.

Xiong et al., 2016 – Xiong C., Zhou X., He Q., Huang X., Wang J., Peng W.P., Chang H., Nie Z. (2016). Development of Visible-Wavelength MALDI Cell Mass Spectrometry for High-Efficiency Single-Cell Analysis. *Anal. Chem.*, 88(23): 11913-11918.

Yan et al., 2011 – Yan Y., He Y., Maier T., Quinn C., Shi G., Li H., Stratton C.W., Kostrzewa M., Tang Y.W. (2011). Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system. *Journ. Clin. Microbiol.*, 49(7): 2528-2532.

Yang et al., 2016 – Yang T., Gao D., Jin F., Jiang Y., Liu H. (2016). Surface-printed microdot array chips coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for high-throughput single-cell patterning and phospholipid analysis. *Rapid Comm. Mass Spectrom. Suppl.* 1: 73-79.

Zaytsev et al., 2015 – Zaytsev E.V., Orehov F. K., Gradov O. V. (2015). Spectral laser freezing point depression osmometers for medical biochemical/biophysical measurements & automatic recording of physico-chemical dynamics & reaction-diffusion kinetics of biocrystallization using multi-wavelength tunable diode laser modules. In: *AERC 2017: 11th Annual European Rheology Conference & 26th Nordic Rheology Conference (April 3 – 6, 2017; Copenhagen, Denmark)*.

### **“MALDI-FLIP-on-a-chip” и “MALDI-FRAP-on-a-flap”:** новые технологии для почвенной микробиологии и биогеохимии. Часть 1: К вопросу о возможности мультипараметрического фингерпринтинга на MALDI-чипе (Приглашенный материал)

А.Г. Яблоков <sup>a,\*</sup>, А.А. Скрынник<sup>a</sup>, Ф.К. Орехов <sup>a</sup>, Ф.А. Насиров <sup>a</sup>, О.В. Градов <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Гальперина Российской Академии Наук, Российская Федерация

**Аннотация.** Разрабатывается комплекс технологий почвенно-микробиологических и агрохимических мониторинговых исследований на активном чипе, включающий в себя ряд принципиально новых систем и методов. Во-первых, создаётся активный КМОП-чип, совмещающий в себе принципиальные особенности: почвенных камер и пластинок

\* Корреспондирующий автор

Адреса электронной почты: [retromicroscopy@gmail.com](mailto:retromicroscopy@gmail.com) (А.Г. Яблоков)



обрастания Росси-Холодного, MALDI-мишени, счётных клеточных камер с координатными сетками, микрофлюидных фракционных коллекторов для MALDI MS, гранулометрических окулярных геологических счетчиков, приборов для капиллярной микроскопии Перфильева-Габе (на микрофлюидных принципах), безлинзового контактного микроскопа на чипе по Озкану. Во-вторых, вводится «тройная мультипараметрическая идентификация», основанная на совмещенном анализе: морфометрических и спектроколориметрических (визуализируемых в форме псевдоспектра на палитре) / спектрофлуориметрических данных безлинзовой микроскопии, масс-спектров MALDI-биотайпинга (особо интересно анализируемых в случае FT-ICR и смежных техник, в которых форму обработки исходных данных задает пользователь – вплоть до кепстральных и нойслетных обработок), сигнала с электродных сеток; в результате чего получается пул естественных дескрипторов – несуррогатных педологических физико-химических ключей, фиксируемых естественным путём (а не считыванием штрих-кода с идентификаторами), и имеющих самостоятельную ценность для «data mining»-а как «big data». В третьих, вводится компаративный анализ данных в рамках алгоритмики SOGDA («тогда и только тогда, когда все сигналы в комплексе при сличении с базой опорных “фингерпринтов” дают идентично высокую вероятность отнесения исследуемого образца к данному типу почв или некоторому микробному сообществу либо конкретной систематической нише, чип идентифицируется как носитель соответствующего данному определению образца; при полном отсутствии идентификации по мажоритарному дескриптору или комплексу его переменных – решение о классификации принято на основе базовых данных быть не может»). В-четвертых, созданы установки контроля и калибровки чипа: поляризационно-микрофотометрическая установка реконструкции профилей яркости {«3D Luminance Surface»} с параллельным отображением результатов вектороскопии, установка для счета частиц с осциллографической регистрацией при видеомикроскопии на основе микроскопа люминесцентного МЛД-2 (модернизируемого в оптической части), стенд поверки и калибровки чипов с применением стробоскопического осциллографа-рефлектометра с дискретностью до наносекундного диапазона. Пятое, для упрощения и улучшения эргономичности сбора данных вводим телеметрию активных чипов с радиочастотной идентификацией и ресивером с точной подстройкой (в ранних версиях – ручной с использованием агометрических или потенциометрических органов подстройки; в современных – с трэкинг-генератором на скалярной или, что коректнее с позиций фазового анализа, векторной технологии сбора и обработки данных); возможно использовать данные телеметрируемого (в жестком реальном времени) сигнала после оцифровки без сжатия как источники кинетических дескрипторов процессов на интерфейсах «чип-почва» (используя алгоритмы обработки радиосигнала, близкие к использовавшимся нами для FT-ICR при MALDI-MS на чипе). Шестое, делается возможным FRAP- или FLIP- анализ микрофлоры после выемки чипа, совмещённый с MALDI или иными LDI (соответственно, не матрично-опосредованными, не МА – «matrix assisted») при использовании лазеров с перестраиваемой длиной волны или нескольких лазеров в едином тракте для обеспечения флуоресценции и выжигания красителей при FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) или же FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching). Седьмое, как наиболее желательный и оптимальный, хотя и дорогостоящий частный случай предшествующего пункта, производится интеграция диодных лазеров/DPSS для Photobleaching-а непосредственно в корпус чипа при закладке в почву для проведения регулярного FRAP-мониторинга *in situ* (или *in vivo* – для почвенных микроорганизмов).

**Ключевые слова:** FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching), MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), “BIOTYPER”, CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy), LoC (Lab-on-a-Chip).