

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему: «Оптимізація характеристик тест-системи за участі люмінесцентних бактерій *Photobacterium phosphoreum*»

Виконав: студент 2 курсу, групи МгБТ-21
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
високомолекулярних сполук
Іванна ПЕТРИЧЕНКО
Керівник: к.б.н., Ігор ГРЕЦЬКИЙ
Рецензент: к.б.н., Любов ЗЕЛЕНА

Київ 2022

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра

_____ Олена МОКРОУСОВА

«___» _____ 2022 року

ЗАВДАННЯ

НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Петриченко Іванни Ігорівни

1. Тема роботи: **Оптимізація характеристик тест-системи за участі люмінесцентних бактерій *Photobacterium phosphoreum***

Науковий керівник роботи Грецький Ігор Олександрович, к.б.н.
затверджені наказом закладу вищої освіти
від «04» жовтня 2022 року № 286.

2. Строк подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо характеристик микробних тест-систем; результати статистичного аналізу пошуку оптимальних параметрів для отримання найкращої відповіді люмінесцентних бактерій; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломної роботи (перелік питань, які потрібно розробити): вступ, огляд літератури, матеріали та методи, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Ім'я, прізвище та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Висновки	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання 12.09.2022 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Матеріали та методи		
4	Розділ 3 Еспериментальна частина		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи (чистовий варіант)		
7	Здача дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____ Іванна ПЕТРИЧЕНКО

Науковий керівник роботи _____ Ігор ГРЕЦЬКИЙ

Директор НМЦУПФ _____ Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Петриченко І.І. Оптимізація характеристик тест-системи за участі люмінесцентних бактерій *Photobacterium phosphoreum* – Рукопис.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 – Біотехнологія та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2022 рік.

Дипломну магістерську роботу присвячено дослідженню оптимізації аналітичних характеристик тест-системи за участі люмінесцентних бактерій *Photobacterium phosphoreum* для проведення оцінки біологічного впливу електромагнітного поля. Проведена статистична обробка даних планованого експерименту (розрахунок коефіцієнтів регресії, дисперсійний аналіз (ANOVA) і побудова поверхонь відгуку) з використанням бібліотеки DOE в програмі Statistica.

Досліджено характеристики люмінесценції на різному за густиною поживному середовищі за дії електромагнітного випромінювання та визначені основні показники роботи тест-системи за оптимальних умов.

Ключові слова: люмінесцентні бактерії, Photobacterium phosphoreum, біологічний вплив, тест-системи, біолюмінесцентний індекс, чутливість, динамічний діапазон.

ANNOTATION

Petrychenko I.I. Optimization of test system characteristics with the participation of luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum* - Manuscript.

Master's thesis in specialty 162 - Biotechnology and Bioengineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2022.

The master's thesis is devoted to the study of the optimization of the analytical characteristics of the test system with the participation of the luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum* for the evaluation of the biological impact of the electromagnetic field. Statistical processing of the data of the planned experiment was carried out (calculation of regression coefficients, analysis of variance (ANOVA) and construction of response surfaces) using the DOE library in the Statistica program.

The characteristics of luminescence in a nutrient medium of different density under the action of electromagnetic radiation were studied and the main performance indicators of the test system under optimal conditions were determined.

Key words: luminescent bacteria, Photobacterium phosphoreum, biological impact, test systems, bioluminescent index, sensitivity, dynamic range.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Тест-системи на основі мікробних клітин.....	12
1.2 Люмінесцентні бактерії, як чутливий елемент тест-системи.....	17
1.3. Характеристики клітинних біосенсорів.....	22
Висновки до розділу 1.	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	33
2.1 Об'єкт дослідження	33
2.2 Культивування бактерій	33
2.3 Вимірювання бактеріальної біолюмінесценції	35
2.5. Аналітичні характеристики тест-системи	40
2.6 Статистичний аналіз	41
Висновки до розділу 2	43
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	44
3.1 Оптимізація інтенсивності люмінесценції бактерій <i>P. phosphoreum</i> IMB B-7071	44
3.2. Характеристики тест-системи з <i>P. phosphoreum</i> IMB B-7071 в рідкому середовищі культивування	55
3.3. Характеристики тест-системи з <i>P. phosphoreum</i> IMB B-7071 на твердому середовищі культивування.....	57
3.4. Характеристики тест-системи з <i>P. phosphoreum</i> IMB B-7071 в напіврідкому середовищі.	61
Висновки до розділу 3:	64
ВИСНОВКИ	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	66
ДОДАТКИ	82

ВСТУП

Актуальність даної роботи полягає в пошуку оптимальних умов для роботи тест-системи з кращими характеристиками для біоіндикації впливу антропогенного електромагнітного випромінювання. Чинне законодавство Європейського Союзу (ЄС) вимагає, щоб якість та ступінь забруднення навколишнього середовища оцінювалися хімічними методами. Такі методи не враховують синергетичні чи антагоністичні взаємодії, які можуть впливати на біодоступність і токсичність забруднюючих речовин у навколишньому середовищі [1]. Біологічні тести — це методи оцінки токсичного впливу досліджуваних зразків на навколишнє середовище та скринінгу зразків навколишнього середовища перед детальним хімічним аналізом, який може зайняти багато часу, бути дорогим і не дає можливості проводити моніторинг [2]. Використання люмінесцентних мікроорганізмів набуло значного поширення протягом останніх десятиліть, оскільки біотести на токсичність були визнані основними тестами з хімічним аналізом [3-4]. Рівень люмінесценції *in vivo* відображає швидкість метаболізму бактерій і цілісність бактеріальних клітин [5].

В останні роки розробка цільноклітинних біосенсорів виявила зростаючий інтерес через здатність цілих клітин перетворювати складні субстрати за допомогою специфічних метаболічних шляхів [6] і через потенційне застосування цих біосенсорів для моніторингу типових сумарних параметрів, таких як токсичність [7], біологічна потреба в кисні [8] та інші, в наслідок того, що ксенобіотичні сполуки [9] або важкі метали [10] не може бути відстежено за допомогою датчиків на основі ферментів. Загальна перевага мікробних біосенсорів полягає в тому, що живі клітини постійно відновлюють свою інтегровану ферментну діяльність і ферментні каскади. Це явна перевага в порівнянні з біосенсорами на основі лабільних елементів біологічного розпізнавання (наприклад, ферментів). З іншого боку, розробка таких

біосенсорів дозволяє використовувати іммобілізовані організми, які зберігають свій фізіологічний статус, і, таким чином, отримані результати представлятимуть природні реакції.

Загально визнано, що біотест надає інформацію про проблему заздалегідь до того, як відбудуться видимі зміни в природних екосистемах. Біологічний тест як метод, що доповнює біоіндикацію та аналітичний хімічний комплекс, має низку безперечних переваг. Біопробы дозволяють реєструвати негативні зміни за відносно слабких антропогенних навантажень. У реакції випробування підсумовується дія всіх біологічно шкідливих факторів, включаючи фізичні та хімічні ефекти [11].

Помітно підвищений інтерес до досліджень біоіндикації значною мірою зумовлений потребами практики та, потребою вдосконалення системи екологічного контролю. Визначення надійних та адекватних методів оцінки впливу електромагнітних полів на біологічні об'єкти набула особливої актуальності, оскільки за останні п'ятдесят років електромагнітний фон Землі зріс у тисячі разів, що пов'язано з використанням нових техногенних джерел електромагнітні поля (ЕМП) різних діапазонів частот. Це спричинило електромагнітне забруднення навколишнього середовища та створило проблему оцінки гострого впливу ЕМП в порівнянні з іншими факторами навколишнього середовища. Оскільки чутливість аналізу, як правило, обмежується границею визначення фізичного перетворювача, тому його вибір є надзвичайно важливим. У деяких випадках до недоліків відносять недостатньо високу стабільність біосенсорів на основі перетворювачів, але частіше за все - вузький лінійний діапазон концентрацій речовин, що визначаються. Крім того, робочі характеристики біосенсорів у значній мірі залежать від умов проведення аналізу, що потребує постійного врахування цього при складанні протоколів вимірів.

Таким чином, актуальним для усунення вищевказаних недоліків та можливості практичного використання лабораторних прототипів біосенсорів є проведення детального дослідження факторів, що покращують ефективність роботи біосенсорного пристрою, оптимізуючи при цьому основні аналітичні характеристики його роботи.

Мета дослідження - оптимізація характеристик тест-системи за участі люмінесцентних бактерій для біоіндикації електромагнітного випромінювання.

Ключові слова: люмінесцентні бактерії, *Photobacterium phosphoreum*, біологічний вплив, тест-системи, біолюмінесцентний індекс, чутливість, динамічний діапазон.

Виходячи з мети роботи, були поставлені такі завдання дослідження:

1. дослідити вплив компонентів поживного середовища та тривалості опромінення на інтенсивність біолюмінесценції і розробити рекомендації щодо їх оптимального вибору для створення біосенсорів до дії ЕМВ;
2. провести оптимізацію характеристик лабораторного прототипа біосенсора шляхом повного факторного експерименту;
3. визначити аналітичні характеристики тест-системи, заснованої на використанні люмінесцентних бактерій як чутливого елемента, в оптимальних умовах на поживному середовищі різної густини.

Об'єкт дослідження - біоіндикація дії ЕМВ тест-системою з покращеними чутливістю і стабільністю.

Предмет дослідження – оптимізація компонентів поживного середовища та тривалості опромінення для підвищення чутливості тест-системи за участі люмінесцентних бактерій.

Методи дослідження. Мікробіологічні, біотехнологічні, статистичні.

Наукова новизна.

У роботі знайшло подальший розвиток сенсорна система за участі люмінесцентних бактерій для біоіндикації ЕМВ. Вперше проведена оцінка

впливу компонентів поживного середовища та тривалості опромінення на інтенсивність біоломінесценції тест-системи до дії ЕМВ із використанням *P. phosphoreum* ІМВ В-7071.

Визначено аналітичні характеристики тест-системи, заснованої на використанні люмінесцентних бактерій як чутливого елемента, в оптимальних умовах на поживному середовищі різної густини.

Практичне значення.

Запропоновано шлях цілеспрямованої зміни аналітичних характеристик тест-системи із використанням *P. phosphoreum* ІМВ В-7071, зокрема чутливості до дії ЕМВ та динамічного діапазону вимірювань, та проведено їх аналіз.

Розроблено практичні рекомендації щодо оптимального вибору матеріалів при виготовленні біоселективного елемента тест-системи, якій використовується як основа люмінесцентних тест-систем.

Розроблена сенсорна система може бути використана в програмі лабораторних занять з дисципліни «Біосенсорні інтелектуальні системи» для студентів кафедри біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну.

Апробація. Основні результати роботи представлено на конференціях:

1. Міжнародна науково-практична конференція “*Перспективи розвитку науки, освіти і технологій в контексті євроінтеграції*”, м. Полтава, 18 серпня 2022 р.
2. XIII Всеукраїнська науково-практична конференція «*Біологічні дослідження – 2022*», м. Житомир, 10–11 жовтня 2022 р.
3. 1st International Scientific Conference «*Academics and Science Reviews Materials*» (November 10-11, 2022). Helsinki, Finland, 2022.

4. Міжнародна науково-практична конференція “*Наука, освіта, технології і суспільство: тенденції, виклики, перспективи*”, м. Житомир, 12 листопада 2022 р.
5. VIII Міжнародна науково-практична конференція «*Integration of scientific and modern ideas into practice*», 15-18 листопада 2022 р., Стокгольм, Швеція.

Публікації:

1. Міжнародна науково-практична конференція “*Наука, освіта, технології і суспільство: тенденції, виклики, перспективи*”, м. Житомир, 12 листопада 2022 р.
2. Міжнародна науково-практична конференції “*Перспективи розвитку науки, освіти і технологій в контексті євроінтеграції*”, м. Полтава, 18 серпня 2022 р.
3. XIII Всеукраїнська науково-практична конференція «*Біологічні дослідження – 2022*», м. Житомир, 10–11 жовтня 2022 р.
4. Ivanna Petrychenko, Ihor Hretskyi Biotesting of Radiofrequency Electromagnetic Radiation on *Photobacterium phosphoreum* Luminescence . Proceedings of the 1st International Scientific Conference «Academics and Science Reviews Materials» (November 10-11, 2022). Helsinki, Finland, 2022. Pp. 130-134. DOI: 10.5281/zenodo.7315918
5. Petrychenko Ivanna, Hretskyi Ihor Characteristics of Biotest for Electromagnetic Radiation with the Participation of Luminescent Bacteria *Photobacterium phosphoreum* . *Integration of scientific and modern ideas into practice*. Proceedings of the VIII International Scientific and Practical Conference. Stockholm, Sweden. 2022. Pp. 93-94. DOI: 10.46299/ISG.2022.2.8

Структура і обсяг. Дипломна магістерська робота складається зі вступу, трьох розділів, 27 рисунків, 6 таблиць, 5 формул, чотирьох висновків, списку з 106 використаних джерел та додатків.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Традиційний підхід до дослідження стану навколишнього середовища полягає у використанні методів хімічного аналізу, які з досить високою точністю дозволяють кількісно оцінювати присутність окремих політантів. Після зіставлення отриманих величин з нормативними гранично допустимими концентраціями (ГДК) можна зробити висновок про рівень забруднення і ступінь його небезпеки/безпеки. Обмеження подібного підходу полягають в тому, що кількість речовин, для яких розроблені методики визначення та обґрунтовані значення ГДК становить лише кілька сотень, в той час як загальна кількість вироблених людиною речовин і сполук незрівнянно вища [12].

Все більшого поширення набувають біохімічні аналізи, в яких як тест-об'єкт використовують цілі бактеріальні клітини (в суспензії), екстракти бактерій, ізольовані ферменти та інше.

Біосенсорні пристрої складаються з двох компонентів: елемента біологічного розпізнавання та перетворювача сигналу. Біоелементи можуть варіюватися від ферментів до рецепторів, нуклеїнових кислот, органел, антитіл і цілої клітини. Сенсорна система повинна містити характеристики, які роблять її специфічною, надійною, повторюваною, здатною отримувати дані в реальному часі та, в деяких конкретних випадках, портативною [13]. У зв'язку з цим біологічний сигнальний елемент може бути використаний у його нативній формі або генетично/біохімічно змінена версія може бути використана для розробки більш чутливого зонда, здатного націлюватися на конкретні аналіти. У цей геномний вік останній стає все більш популярним. Тим не менш, кожен із цих біологічних елементів залежить від взаємодії конкретного сигналу з перетворювачем, який може контролювати та кількісно визначити біологічний сигнал. Зазвичай перетворювачі включають електрохімічні, термічні, магнітні або оптичні інтерфейси для перетворення біологічного вхідного сигналу в

цифровий вихід. Тип датчика залежить від сигнального елемента, який використовується [14].

Розробка ефективних біосенсорів залежить від з'єднання біологічного чутливого елемента з відповідним датчиком. Біюмінесцентні біосенсори зазвичай поєднують біологічний вхід із елементом, здатним передавати світло, посилювати сигнал, розвивати цифрову відповідь і записувати відповідь.

Через розмір і сферу застосування біосенсорного елемента, а також за межами генетичного маніпулювання елементом, компонентом системи, який найбільше підходить для змін і покращень, є перетворювач. Зміни та прогрес у технологіях, що стосуються взаємодії біологічного введення з цифровим виходом, надали вченим багато інструментів для дослідження систем не лише з точністю до конкретності, але й у режимі реального часу та з автоматизацією.

1.1. Тест-системи на основі мікробних клітин.

Поняття «біосенсор» має дуже широке значення, найвживаніше – це аналітичний прилад, який перетворює біологічну відповідь в електричний сигнал [15].

Тест-об'єкт - організм, використовуваний при оцінці токсичності хімічних речовин, природних і стічних вод, ґрунтів, донних відкладень, кормів й ін.

Тест-об'єкти – так звані "датчики" сигнальної інформації про токсичність середовища й замітники складних хімічних аналізів, що дозволяють оперативно констатувати факт токсичності (отруйності, шкідливості) водного середовища ("так" або "ні"), незалежно від того, чи обумовлена вона наявністю однієї точно визначеної аналітично речовини або цілого комплексу аналітично не визначених речовин, який звичайно являють собою стічні води [16].

Тест-об'єкти з відомим ступенем наближення дають кількісну оцінку рівня токсичності забруднення водного середовища - стічних, скидних, циркуляційних і природних вод.

Важлива умова правильного проведення біотестування - використання генетично однорідних лабораторних культур, тому що вони проходять перевірки чутливості, утримуються в спеціальних, обговорених стандартами лабораторних умовах, що забезпечують необхідну подібність і відтворюваність результатів досліджень, а також максимальну чутливість до токсичних речовин.

Життєва функція або **критерій токсичності**, використовують в біотестуванні для характеристики відгуку тест-об'єкта на дію, що ушкоджує, середовища [17].

Тест-функції, що використовують як показники біотестування для різних об'єктів:

- для інфузорій, ракоподібних, ембріональних стадій молюсків, риб, комах - виживаність (смертність) тест-організмів;
- для ракоподібних, риб, молюсків - плідність, поява аномальних відхилень у ранньому ембріональному розвитку організму, ступінь синхронності дроблення яйцеклітин;
- для культур одноклітинних водоростей й інфузорій - загибель клітин, зміна (приріст або збиток) чисельності клітин у культурі, коефіцієнт ділення клітин, середня швидкість росту, добовий приріст культури;
- для рослин - енергія проростання насіння, довжина первинного кореня й ін.

Тривалість біотестування залежить від задачі, поставленої дослідником.

Гострі біотести, виконувані на різних тест-об'єктах по показниках виживаності, тривають від декількох хвилин до 24-96 годин.

Короткострокові - хронічні тести тривають протягом 7 діб й закінчуються, як правило, після одержання першого покоління тест-об'єктів.

Хронічні тести на загальну плідність ракоподібних, що охоплюють 3 покоління.

Інтегральна токсичність (integral toxicity), по визначенню Л. П. Брагинського, токсичність складних сумішей, стічних вод, багатокомпонентних факторів для водних організмів.

Кількісно інтегральна токсичність визначається як величина, зворотна максимальному розведенню (1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 і т.д.), при якому не спостерігається яких-небудь порушень життєво важливих функцій тест-організмів при 24-48 годинному біотестуванні.

Виражається в балах токсичності (БТ) цілими числами (2, 5, 10, 50, 100 і т.д.) відповідно величинам розведення.

Толерантність - витривалість (стійкість) організму до ушкоджуючих впливів.

Діапазон толерантності - межі коливань концентрацій токсичних речовин, при яких не відбувається порушень функцій організму.

Толерантний ліміт - кількісне вираження концентрації токсиканта, при якій гине або виживає 50% тест-організмів за 48 ч досліджу.

Токсикорезистентність - опірність живих організмів до впливу токсичних речовин.

Токсобність - здатність водних організмів існувати в токсичному середовищі, сорбуючи або використовуючи певну кількість токсичної речовини.

Токсикометрія - сукупність прийомів оцінки токсичності речовин. Основними прийомами токсикометрії є встановлення мінімально граничної концентрації (LC_0), летальної концентрації (LC_{50}), або дози (LD_{50}), і зони токсичної дії - діапазону токсичних концентрацій - від LC_0 до абсолютно летальної (LC_{100}) [18].

Біотестування, як правило, використовують до хімічного аналізу, тому що цей метод дозволяє провести експрес-оцінку природного середовища й виявити

"гарячі точки", що вказують на найбільш забруднені ділянки акваторії (території, полігона). На ділянках, де методами біотестування виявлені які-небудь відхилення й досліджуване середовище характеризується як токсичне, аналітичним шляхом необхідно встановити причини цього явища.

Використання біотестування висуває ряд вимог, дотримання яких необхідне для отримання достовірних результатів. Серед останніх можна назвати наступні: відносна швидкість проведення досліджень, отримання достатньо точних і відтворюваних результатів, присутність об'єктів, застосовуваних у біотестуванні у великій кількості і з однорідними властивостями, а також діапазон погрішності у порівнянні з іншими методами тестування не більше 20%.

Біосенсорні системи складаються з трьох частин [19]:

- біоселективного елемента (тканини, мікроорганізми, органели, клітинні рецептори, ферменти, антитіла, нуклеїнові кислоти, і т. д. (табл. 1.1))
- перетворювача (оптичний, п'єзоелектричний, електрохімічний, і т. д.), який перетворює сигнал, що з'являється в результаті взаємодії аналіту з біоселективним елементом, в інший сигнал, який простіше виміряти;
- пов'язаної електроніки, яка відповідає в першу чергу за відображення результатів в зручному для користувача вигляді.

Основні характеристики біосенсорів – чутливість, час відгуку, лінійний діапазон, межа виявлення, селективність і специфічність. Специфічною характеристикою біосенсора є час його життя – зменшення чутливості біосенсорів з часом через деструкцію біологічного матеріалу[20].

Головні переваги біосенсорів – їх універсальність, порівняно малий час відгуку, висока чутливість і селективність (визнається специфічністю використовуваних матеріалів), а також низька собівартість [21].

Основні компоненти біосенсорів

Біологічний компонент	Перетворювачі
Нуклеїнові кислоти	Оптичні
Коферменти	Флуоресцентні
Антитіла	Поглинаючі
Рецептори	Електрохімічні
Ферменти	Амперометричні
Ферментні системи	Потенціометричні
Мембрани	Кондуктометричні
Органели	П'єзоелектричні
Клітини	Калориметричні
Тканини	Акустичні
Організми	Механічні

В екології та біотехнології широке застосування знайшли біосенсорні тест-системи на основі цілих клітин мікроорганізмів [22]. Якщо існуючі методи експрес-оцінки токсичності мають свої обмеження, то сенсорні системи демонструють великий потенціал, тому в останні роки на їх основі створюють аналітичні інструментальні засоби для ефективного контролю в рамках екологічних програм [23]. Переваги застосування мікроорганізмів, такі як простота і низька вартість культивування, можливість цілеспрямованої зміни властивостей методами генної інженерії, широка субстратна специфічність, наявність простих і універсальних способів вимірювання активності ферментів за загальними показниками життєдіяльності клітини, дозволяють на їх основі створювати рецепторні елементи біосенсорів для вирішення широкого кола задач [24].

Мікробні сенсорні пристрої найчастіше представляють собою тест-системи, в яких біологічний компонент просторово відділений від реєструючого пристрою. Це пов'язано з тим, що реакції мікроорганізмів на зміну хімічного складу середовища досить повільні в порівнянні з реакціями ферментів або антитіл, оскільки опосередковані стадіями перенесення речовин через біологічні мембрани [25]. Тому доводиться створювати більш високу концентрацію живих

клітин, ніж дозволяє геометрія трансдьюсера. Це можуть бути біологічні реактори колонного або мембранного типу. Реакції мікробного окислення малоселективні, оскільки на відміну від індивідуальних ферментів одноклітинні організми здатні розкласти різні органічні речовини з близькою ефективністю [26].

Одна з сфер застосування мікробних сенсорів – визначення впливу речовин на клітину як модель багатоклітинного організму. Такі біосенсори застосовують в токсикологічних дослідженнях при оцінці середньосмертельної концентрації токсикантів, при пошуку індивідуальних доз антибіотиків, антимікробних і протигрибкових добавок до фарб і оздоблювальних матеріалів [27]. Нарешті, мікробні сенсори використовують для оцінки стану природних угруповань мікроорганізмів, наприклад, для контролю роботи біологічних очисних споруд [28].

Серед сенсорних систем з оптичним детектуванням відгуку від мікроорганізмів найбільш відомі тест-системи на основі люмінесцентних бактерій, що містять фермент люциферазу. У них чутливим параметром для визначення кількісної міри токсичності виступає інтенсивність біолюмінесценції, що дає можливість часто перевершити відомі біотести по швидкодії, точності, чутливості і простоті та дозволяє контролювати одночасно значну кількість токсикантів [29-30].

1.2 Люмінесцентні бактерії, як чутливий елемент тест-системи

Здатність випромінювати світло у видимій області широко представлена у рослинному і тваринному світі. Крім бактерій, відомі також гриби, найпростіші, кишковопорожнинні, черви, молюски та інші організми, які також здатні випромінювати світло. Здатність до біолюмінесценції багаторазово і, мабуть, незалежно виникала в ході еволюції. Про це свідчить мозаїчне поширення цієї ознаки по філогенетичному дереву. Проте, всі організми, що здатні

випромінюють світло, стоять на різних сходинках еволюції і мають однакову природу світіння. Їх біоломінесценція являє собою каталізовану специфічним ферментом хеміломінесцентну реакцію. Разом з тим механізми біоломінесцентних реакцій, як і їх компоненти, можуть значно відрізнятися [31].

Люмінесцентні бактерії регулярно виявляються в морських екосистемах у вигляді вільно мешкаючих форм, що існують на поверхні живих організмів і симбіонтів спеціальних світлових органів риб і кальмарів. При цьому представники більшості видів зазвичай виявляються більш ніж в одній еконіші [32].

У пробах морської води люмінесцентні мікроорганізми знаходяться в вільному (неприкріпленому до поверхонь) стані, що і дозволяє оцінювати їх як «вільно мешкаючи» форми. Кількісний та якісний склад бактеріальних популяцій досить варіабельний і визначається географічним положенням місця відбору проб, глибиною, порою року і ін. Найбільші кількості люмінесцентних мікроорганізмів характерні для прибережних вод, де їх вміст може варіювати від 10^3 до 6×10^6 кл/л, складаючи до 50% від всіх виявлених мікроорганізмів [33].

Люмінесцентні бактерії випромінюють світло в результаті хімічної реакції, під час якої хімічна енергія перетворюється на світлову. Люмінесцентні бактерії існують як симбіотичні організми, що переносяться всередині більшого організму, наприклад, багато глибоководних організмів, включаючи рибу-ліхтар, рибу-рибалку, деякі медузи, деякі молюски та вугор-глотанку. Світло генерується в результаті каталізованої ферментами реакції хеміломінесценції, в якій пігмент люциферин окислюється ферментом люциферазою. Деякі види люмінесцентних бактерій володіють кворум-сенсингом - здатністю визначати локальну популяцію за концентрацією хімічних месенджерів. Види, які мають кворумний сенсор, можуть вмикати та вимикати певні хімічні шляхи, як правило, люмінесценцію; таким чином, як тільки рівень популяції досягає певної точки, бактерії вмикають виробництво світла. Тепловий ефект реакції

становить 110 ккал * моль⁻¹; він складається з теплоти окиснення FMN Н₂ (40 ккал * моль⁻¹) і альдегіду (70 ккал * моль⁻¹) [34]. Сумарний тепловий ефект реакції перевершує енергію кванта біоломінесценції, рівну приблизно 60 ккал*моль⁻¹. В той же час видно, що окиснення відновленого флавіну енергетично недостатньо для випромінювання спостережуваного кванта світла [35].

Люмінесцентні бактерії при культивуванні на твердому чи рідкому поживному середовищі створюють видиме світіння, яке за своєю природою відрізняється від інших живих організмів. Справа в тому, що світіння колоній бактерій на твердому субстраті чи наважки клітин здається суцільним, не імпульсним, тривалість його визначається часом існування бактеріальної популяції.

Згідно з сучасними даними [36] до люмінесцентних бактерій відноситься різноманітна група мікроорганізмів, що володіє здатністю випромінювати світло в зелено-блакитній області спектру видимого діапазону. Дані бактерії виявляються в складі тільки одного класу – *Gamma*proteobacteria, що входить до відділу *Proteobacteria* домену *Bacteria* і включає в себе 17 видів, які відносяться до чотирьох родів: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Photorhabdus* [37].

Надцарство: *Bacteria*

Тип: *Proteobacteria*

Клас: *Gamma*proteobacteria

Ряд: *Vibrionales*

Родина: *Vibrionaceae*

Рід: *Photobacterium*

Вид: *Photobacterium phosphoreum*

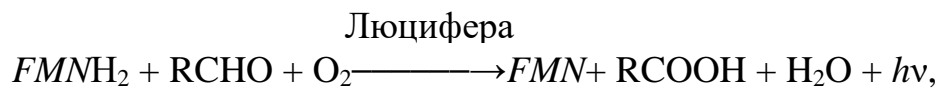
P. leiognathi

P. kishitanii

P. mandapamensis

Люмінесцентні бактерії при культивуванні на твердому чи рідкому поживному середовищі створюють видиме світіння, яке за своєю природою відрізняється від інших живих організмів. Будь-якої стимуляції для світіння бактерій не потрібно, оскільки це явище викликане внутрішньоклітинною хімічною реакцією – окисненням субстрату в присутності специфічного ферменту – люциферази [38].

Хімічною основою світіння бактерій є ферментативне відновлення ФМН $FMNH_2$ і дволанцюгового альдегіду $RCHO$ киснем повітря. Сумарне рівняння процесу може бути записано так [39]:



де FMN і $RCOOH$ – флавінмононуклеотид і карбонова кислота відповідно.

Бактеріальна люцифераза є гетеродимером з молекулярною масою приблизно 80 кДа. Компоненти біоломінесцентної реакції здатні реагувати і у відсутності ферменту, але ефективність хемілюмінесценції такого процесу на 10 порядків нижче.

Люмінесцентні бактерії регулярно виявляються в морських екосистемах у вигляді вільно мешкаючих форм, що існують на поверхні живих організмів і симбіонтів спеціальних світлових органів риб і кальмарів. При цьому представники більшості видів зазвичай виявляються більш ніж в одній еконіші [40].

У пробах морської води люмінесцентні мікроорганізми знаходяться в вільному (неприкріпленому до поверхонь) стані, що і дозволяє оцінювати їх як «вільно мешкаючи» форми. Кількісний та якісний склад бактеріальних популяцій досить варіабельний і визначається географічним положенням місця відбору проб, глибиною, порою року і ін. Найбільші кількості люмінесцентних

мікроорганізмів характерні для прибережних вод, де їх вміст може варіювати від 10^3 до 6×10^6 кл/л, складаючи до 50% від всіх виявлених мікроорганізмів [41].

Біолюмінесценція бактерій активно використовується при проведенні біотестування забруднення поверхневих водойм, промислових стоків і ґрунтів. Сконструйовані і трансгенні мікроорганізми з клонованими генами люмінесцентної системи різних природних люмінесцентних бактерій, що дозволило відмовитися від необхідності додавання хлорид натрію в досліджуваний розчин при використанні галофільних морських люмінесцентних мікроорганізмів і ще більше спростило процедуру біотестування [42].

Подальше вдосконалення біолюмінесцентних тест-систем пов'язано з конструюванням оригінальних штамів, що дозволяють визначати не тільки генотоксичність, але й інші біологічні ефекти хімічних забруднювачів. Розробляються основи створення бактеріальних біосенсорів, що виявляють специфічність реагування на певні групи екотоксикантів, зокрема на важкі метали, нафталін та саліцилат, гербіциди [43-45].

Бактеріальна біолюмінесценція має високу чутливість до дії різних інгібіторів біологічної активності: анестетиків, наркотиків, промислових отрут, пестицидів, отруйних і лікарських речовин [46, 47]. Відсутність специфічності робить перспективним застосування таких бактерій в екологічному моніторингу, де по впливу на живі бактерії визначається токсичність суми шкідливих речовин [48, 49]. Простота вимірювання люмінесценції, експрес метод (час аналізу 1–3 хв), висока чутливість (для різних класів сполук від 10^{-3} до 10^{-12} М), можливість автоматизації вимірювань і статистичної обробки даних забезпечує люмінесцентним бактеріям перевагу в порівнянні з іншими біологічними тестами [50-53].

Наявні інтегральні біотести з використанням живих організмів (парамецій, водоростей, дафній, риб і т.д.) мають ряд недоліків (трудомісткість,

погана відтворюваність результатів, тривалість аналізу, труднощі кількісної оцінки) [54, 56]. В основі цих методів лежить зміна інтенсивності люмінесценції біопрепаратів після впливу тої чи іншої аналізованої речовини. Концентрацію аналізованої речовини визначають шляхом вимірювання параметрів випромінювання. Біолюмінесцентним способом зараз можна визначити майже всі загально визнані в токсикології параметри для оцінки токсичності речовин [57].

В результаті, тести з використанням люмінесцентних бактерій за своєю чутливістю, точністю, швидкістю і простотою, зазвичай, перевершують існуючі аналоги, дозволяючи проводити одночасне, в тому числі у режимі реального часу, дослідження значної кількості проб [58].

Незважаючи на те, що технології біолюмінесцентного тестування на цей момент детально розроблені, стандартизовані та апробовані, спроби їх вдосконалення та розширення сфер застосування не припиняються.

Зокрема, одним з перспективних напрямків є використання люмінесцентних бактерій як біологічного детектора для оцінки впливу неіонізуючих ЕМВ антропогенного походження. Крім бактерій спроби використання явища біолюмінесценції для детектування впливу ЕМВ здійснювали на люмінесцентних грибах, динофлагелятах і світляках. В дослідженнях спостерігалась стимуляція люмінесценції або гасіння люмінесценції а іноді відсутність дії випромінювання на біолюмінесценцію.

1.3. Характеристики клітинних біосенсорів

Загальною особливістю клітинних біосенсорів є те, що вони використовують живі клітини як рецептори, на відміну від інших типів біосенсорів, які містять лише матеріали, отримані з живих істот. Стають доступними унікальні комбінації ферментів або високочутливих фізіологічних рецепторних механізмів, які присутні в інтактних клітинах, але їх неможливо

відтворити за допомогою ізольованих ферментів у біосенсорі. Ще однією перевагою має бути те, що матеріали можуть виконувати свої біологічні функції у своєму природному біологічному середовищі. За таких обставин біологічно активні сполуки можуть мати найкращу активність і тривалість життя, і вони навіть можуть регенеруватися або синтезуватися живими клітинами. Таким чином, можна очікувати кращої стабільності біосенсорів. Якщо живі клітини гинуть, у поведінці сенсора відбудуться різкі помітні зміни, а не повільний дрейф через розчинення рецепторів, характерний для інших типів. Загальні проблеми біосенсорів на основі живих клітин можна підсумувати таким чином [59]:

- Необхідно постійно підтримувати природні умови навколишнього середовища, в яких клітина може жити тривалий час, а це потребує суворого контролю за фізико-хімічними параметрами середовища.
- Метаболізм клітин повинен підтримуватися, і вони повинні постійно отримувати поживне середовище.
- Живі клітини повинні бути знерухомлені навколо або на поверхні перетворювача без обмеження їх біологічних функцій. У майбутньому слід використовувати супрамолекулярну або органічну хімію та клітинну мімікрію.
- Термін служби датчиків в основному визначається терміном служби клітин.

Особливі переваги використання клітинних біосенсорів полягають у наступному [60]:

- Вони менш чутливі до інгібування розчиненими речовинами та більш толерантні до субоптимальних значень рН і температури, ніж ферментні електроди, хоча вони не повинні перевищувати вузький діапазон у разі загибелі клітин.

- Можна очікувати довшого терміну служби, ніж у ферментативних датчиків.
- Вони набагато дешевші, оскільки активні клітини не потрібно ізолювати.

Оскільки клітинні біосенсори мають багато переваг (наприклад, тривалий запис неінвазивними способами, швидка реакція та легке виготовлення), вони мають широке застосування, включаючи фармацевтичний скринінг, клітинний аналіз, виявлення токсинів і моніторинг навколишнього середовища, а також записи *in vivo*; таким чином, вони також є перспективними в області моніторингу навколишнього середовища [61].

Незважаючи на те, що практичне застосування клітинних біосенсорів швидко розвивається, теоретичні основи їх роботи в багатьох випадках досі не повністю з'ясовані. Існують дискусії щодо механізмів збудження сигналу, методів формування сигналу та інтерпретації практично вимірних і теоретично очікуваних результатів. Розробка клітинних біосенсорів вимагає водночас проведення значних фундаментальних досліджень. Це одна з основних перешкод комерціалізації біосенсорів на основі клітин.

Незважаючи на успішні результати досліджень, клітинні біосенсори також мають деякі недоліки:

- Деякі типи клітинних біосенсорів можуть мати довший час відгуку, ніж ферментні сенсори.
- Їм потрібно більше часу, щоб повернутися до базового рівня після використання.
- Клітини містять багато ферментів, тому необхідно стежити за вибірковістю.

Біоломінесцентні сенсори на основі являють собою пристрої, що містять іммобілізовані ферменти або бактерії, що працюють спільно з детектором випромінювання. У певному сенсі такі датчики вже самі по собі є

біосенсорними пристроями, оскільки можуть бути використані безпосередньо для визначення вмісту АТФ, ФМН або НАД (НАДФ) [62].

Біоломінесцентні сенсори також мають свої переваги і недоліки. До переваг таких оптичних датчиків перед електрохімічними належать наступні моменти [63]:

1. У датчиках відсутній електрод порівняння (хоча часто потрібно порівняння показань датчика з еталонним джерелом світла).

2. Датчики безпосередньо не схильні до впливу електромагнітних полів.

3. Імобілізовані компоненти не обов'язково повинні безпосередньо контактувати з поверхнею датчика, тому тест-об'єкт може бути відносно легко замінений у разі його пошкодження.

4. Можливість використання одного датчика для реєстрації різних тест-реакцій (у найпростішому випадку - оцінка концентрації одного і того ж продукту, наприклад, колориметрично по двох максимумах поглинання; у більш складному варіанті - визначення за допомогою одного і того ж датчика різних з'єднань – продуктів реакції).

5. Вважається, що оптичні методи вимірювання тест-реакції мають набагато більший потенціал інформативності, ніж електрохімічні, оскільки з їх допомогою можна оцінити стан тест-об'єкта комплексно.

Недоліки оптичних датчиків такі [64]:

1. Вони придатні для реєстрації обмеженого кола речовин, які мають певні оптичні властивості.

2. Вимагають екранування фонових джерел освітлення.

3. Мають обмежений у порівнянні з електрохімічними датчиками діапазон визначених концентрацій (наприклад, перехід кольору більшості кислотноосновних індикаторів здійснюється в межах 1–2 од. рН, у той час як за допомогою скляного електрода показник кислотності визначається в межах від рН 0 до рН 14) .

4. Межі мініатюризації датчиків обмежені.
5. Під дією світла багато реагентів і тест-об'єктів інактивуються.
6. У цілому по швидкодії (швидкості встановлення стаціонарних показників при зміні концентрації аналізованого речовини) оптичні датчики поступаються електрохімічним.

Існує низка принципів можливостей використання мікроорганізмів для аналітичних цілей. Речовини, що впливають на життєдіяльність мікроорганізмів, можуть призвести до зміни швидкості виділення тепла або іншої функції, наприклад швидкості дихання, генерації мембранного потенціалу тощо. В інших випадках індукується певна ферментативна система, яка в клітинах мікроорганізмів може діяти подібно до ферменту капсулах. Специфічність такого мікро-реактора визначається ферментативною реакцією та проникністю клітинних мембран. У електрохімічних мікробних біосенсорах клітини мікроорганізмів захоплюються на поверхні потенціометричних (іоноселективних або газових) або амперометричних електродів. Під дією певних ферментативних систем клітин субстрати трансформуються в продукти, які й визначаються електрохімічним датчиком, або визначення ведеться за швидкістю споживання кисню [65]. Це їх властивість використано при створенні ряду мікробних сенсорів для визначення концентрації органічних сполук, біологічне окислення яких протікає зі споживанням кисню. Крім того, так звана біохімічна потреба в кисні є параметром, що характеризує ступінь забруднення води органічними сполуками. Таким чином, біосенсори, засновані на явищі споживання кисню мікроорганізмами, можуть використовуватись як для визначення вмісту конкретних речовин (у цьому випадку використовуються певні бактерії або окремі штами їх), так і для контролю якості води (за споживанням кисню, обумовленого наявністю цілого ряду різних органічних сполук).

Бактеріальні біосенсори можна охарактеризувати з точки зору чутливості, межі виявлення, селективності, часу відгуку, стабільності, лінійного діапазону, терміну служби, відтворюваності та біосумісності [66].

Стабільність датчика важлива, особливо при вимірюванні низьких концентрацій досліджуваної речовини. Наприклад, при вимірюванні низьких концентрацій шум має бути нижчим, ніж очікувана зміна струму після додавання зразка. Перед використанням будь-якого датчика важливо знати лінійний діапазон вимірювання, щоб вимірювання було точним. Типові комерційно доступні датчики мають широкий лінійний діапазон 1 нМ–10 мкМ. Термін служби датчика та відтворюваність важливо знати під час використання датчика, і їх можна визначити шляхом частого калібрування, як описано вище. Біосумісність також надзвичайно важлива при виготовленні *in vivo*. У більшості застосувань межа виявлення, чутливість, вибірковість і час відгуку зазвичай є найважливішими вимогами, і вони будуть описані більш детально.

Чутливість і межа виявлення.

Чутливість датчика значною мірою залежить від площі поверхні датчика та матеріалів електродів, які використовуються в конструкції. Загалом кажучи, ця чутливість прямо пропорційна розміру електрода та стану поверхні, де електрод із малою площею поверхні зазвичай матиме меншу чутливість порівняно з електродом із більшою площею поверхні. Хоча чутливість датчика безумовно важлива, його межа виявлення часто важливіша для дослідника. Висока чутливість датчика не обов'язково означає низьку межу виявлення. Наприклад, високочутливий датчик може мати високий рівень фоновому шуму, що за високої концентрації може не бути проблемою. Однак за нижчих концентрацій вимірюванню може перешкоджати надмірний шум. Відповідно, при оцінці продуктивності датчика кінцева межа виявлення зазвичай більш критична, ніж чутливість [67].

Визначення чутливості

Важливим аспектом сенсора є досягнута чутливість, як пристрій може бути корисним у польових умовах, лише якщо він може виявити відповідні рівні забруднення. Щоб визначити межу виявлення (LOD), відповіді опромінених бактерій порівнювали із середнім значенням трьох фонових кривих. Для концентрацій 0,01 мг/л і 0,001 мг/л було нанесено середні значення двох експериментів. Загальний метод оцінки в аналітичній хімії, який підходить для нормально розподілених даних, полягає у визначенні відповіді як суттєво відмінної від фону, якщо вона перевищує середню відповідь фону плюс трикратне стандартне відхилення відповіді фону. Цей метод також є обов'язковим для відповідності стандарту ISO для специфікацій і випробувань продуктивності нових онлайн-сенсорів і обладнання для аналізу води [68]. Для нормально розподілених даних існує 99% впевненості, що відповідь вибірки є значущою.

Селективність.

Датчик практично марний, якщо він не захищений від перешкод від інших видів, які можуть бути присутніми в середовищі вимірювання. Селективність зазвичай контролюється як напругою, що прикладається між робочим електродом і електродом порівняння, так і селективною мембраною, яка використовується для покриття сенсора. Багато видів, присутні в біологічній матриці, легко окислюються при напрузі балансу, що використовується для виявлення NO (тобто 860 мВ проти Ag/AgCl). Датчик NO типу Кларка (наприклад, ISO-NOP) покритий газом проникною мембраною, отже селективність таких сенсорів у біологічних зразках надзвичайно висока. Отже, селективність традиційних датчиків покритих NO дуже низька. Датчики NO з покриттям також демонструють інші небажані характеристики, включаючи нестабільний фоновий струм, постійний дрейф базової лінії та розширені вимоги до поляризації. Ці проблеми суттєво обмежують використання електродів з вуглецевого волокна з покриттям Nafion для вимірювання NO.

Час реакції.

Час реакції та відновлення датчиків надзвичайно важливі для їх використання *in vivo*. Теоретично, оскільки швидкість перенесення маси на мікроелектроді дуже висока, він повинен мати час відгуку порядку мікросекунд. За наявності мембрани час відгуку тепер залежить від швидкості дифузії через мембрану, яка значною мірою залежить від природи мембрани, а також від її товщини. Час відгуку залежить не тільки від використовуваного електрода, але й від електроніки, яка використовується для зчитування струму. Наприклад, оскільки струм, який зчитується, зазвичай становить порядку пА, зазвичай застосовується електронний фільтр, який також уповільнює реакцію системи. Оскільки період напіврозпаду NO становить від кількох секунд до хвилин у біологічній системі, відповідь сенсора порядку 3–4 секунд працюватиме добре [69]. Це вказує на те, що навіть із сильним фільтром відповідь відбувається протягом кількох секунд, що відповідає часовому проміжку, необхідному для вимірювання. Щоб зменшити час відгуку датчиків, можна застосувати менше фільтрів, що призведе до втрати межі виявлення датчиків.

Вплив температури та рН на електроди.

Фонові струми всіх електродів чутливі до змін температури та рН. Залежно від типу електродів ефект може бути більшим або меншим. Електроди типу Clark дуже чутливі до зміни температури. Температурно-індукована відповідь цього типу датчика становить приблизно 50–100 нМ/°С, тоді як температурно-індукована відповідь мікроелектрода з вуглецевого волокна становить менше 10 нМ NO/°С. Таким чином, при вимірюванні необхідно одночасно ретельно контролювати температуру. Зміна рН також може викликати зміну фонового струму електродів. Зазвичай зміна рН на 1 може спричинити зміну струму на 50–100 пА на датчиках NO типу Кларка.

Одиниці вимірювання люмінесценції

Люмінесценцію майже завжди виміряють як «одиниці відносної яскравості» (RLU) [70]. Зв'язок між RLU та загальною кількістю випромінюваних фотонів є змінним і залежить від таких незначних факторів, як розмір і геометрію детектора(ів), а також параметри, які можуть або не можуть бути під безпосереднім контролем користувача, наприклад налаштування напруги фотопомножувача. Насправді з деякими інструментами взаємозв'язок навіть не є справді лінійним теоретично (хоча це загалом на практиці). Наприклад, гамма-лічильники вимагають високої чутливості, оскільки багато зразків випромінюють дуже мало радіоактивності, і в результаті лічильники часто мають проблеми з помилковими сигналами. Деякі інженери вирішують цю проблему за допомогою вважаючи подію «рахунком», лише якщо два фотони збуджують два окремі детектори протягом заданого інтервалу часу [71]. Це хороший підхід для підрахунку гамма-випромінювання, оскільки гамма-випромінювання, створене звичайними ізотопами, зазвичай має достатню енергію для вивільнення численні фотони від рідкого сцинтилятора, щоб єдина подія розпаду була виявлена та правильно інтерпретована. Однак, коли той самий інструмент використовується для вимірювання яскравості, ця «особливість» перетворюється на труднощі. Зараз відбувається реєстрація тільки якщо два фотони випромінюються майже одночасно і обидва виявлені [72]. Звичайно, це може спричинити проблему чутливості, але це також є спотворенням самої природи люмінесценції, у якій кожен фотон є сигналом. Це пояснюється тим, що коли швидкість випромінювання фотонів за проміжок часу в повільній реакції зменшується вдвічі, швидкість, з якою випромінюються два фотони за один проміжок часу, може становити лише одну чверть (половину в квадраті) первісне значення. (Якщо реакція досить швидка, щоб викликати сигнали у великій частці часових інтервалів, ефекти розведення є математично складнішими та не відрізняються від закону Бера [73] Цей ефект зазвичай не є серйозною проблемою для користувачів. цих інструментів, тому

що рідко виникає необхідність розбавляти реакцію після додавання люміногенних компонентів.

Висновки до розділу 1.

1. Розробка клітинних біосенсорів дозволяє отримати більш стабільні, ніж ферментативні, датчики з довшим терміном використання.

2. Одним з можливих варіантів створення біосенсорної системи може бути використання в сенсорному елементі люмінесцентних бактерій, які добре зарекомендували себе при оцінці хімічного забруднення навколишнього середовища.

3. Серед характеристик біосенсорів найбільш значущими є межа виявлення, чутливість, селективність і час відгуку, які є найважливішими вимогами і потребують вдосконалення і оптимізації.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження слугував штамп морських люмінесцентних бактерій *Photobacterium phosphoreum*, що зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером ІМВ В-7071.

Даний штамп раніше був виділений із чорноморського катрана *Squalus acanthias* та ідентифікований мікробіологічними методами.

Систематичне положення організму: *Bacteria*, *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Vibrionales*, *Vibrionaceae*, *Photobacterium*, *Photobacterium phosphoreum* [74].

2.2 Культивування бактерій

Люмінесцентні бактерії культивували глибинно у рідкому поживному середовищі наступного складу (г/л) [75]:

1. пептон - 5,0
2. дріжджовий екстракт - 1,0
3. NaCl - 30,0
4. Na₂HPO₄ - 5,3
5. KH₂PO₄·2H₂O - 2,1
6. (NH₄)₂HPO₄ - 0,5
7. MgSO₄·H₂O - 0,1
8. гліцерин - 3,0 мл / л
9. вода дистильована - до 1 л, рН 7,6±0,3

Тверде середовище одержували шляхом додавання 20,0 г/л агар-агару. Для отримання інокуляту використовували бактерії, відібрані з поодинокі колонії з чашки Петрі. Бактерії вирощували в 750 мл колбах з об'ємом

поживного середовища 100 мл у режимі постійного перемішування (145 об/хв) протягом 18 годин при температурі 22°C [76]. Кількість клітин встановлювали в лічильній камері Горяєва. Суспензію люмінесцентних бактерій розводили до концентрації 2×10^7 кл / мл. Надалі 1 мл отриманої суспензії переносили у мікропробірки типу «епендорф» об'ємом 1,5 мл для досліджень.

При вивченні люмінесценції бактерій на напіврідкому середовищі використовували комбінації бактеріальної суспензії і гелеутворюючих компонентів в об'ємному співвідношенні 1:1. Для створення гелевих композицій застосовували екзополісахаридполіакриламід (ЕПАА), екзополісахариди (ЕПС) ксантан і їх суміші [77].

Динаміку інтенсивності люмінесценції бактерій на твердому середовищі вивчали на окремих колоніях, вирощених в стандартних умовах. Інокулювання проводили краплями суспензії (2×10^7 кл/мл) однакового об'єму (10 мкл). Час культивування становив 21 добу.

Приготування поживного середовища виконується в три етапи, які нижче наведені у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Етапи приготування поживного середовища

Частина А / 300 мл.	Частина В / 300 мл.	Частина С / 300 мл.
NaCl - 30,0	Na ₂ HPO ₄ - 5,3	дріжджовий екстракт - 1,0
MgSO ₄ ·H ₂ O - 0,1	КН ₂ РО ₄ ·2Н ₂ О - 2,1	пептон - 5,0
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ - 0.5	
	гліцерин - 3,0 мл / л	

Частини А і В - стерилізація при 1,0 атм. Частина С - стерилізація при 0,5 атм.

Культивування здійснювали в колбах на 750 мл з об'ємом середовища 100 мл. Механічне перемішування рідини проводили на лабораторному струшувачі АБУ-6 зі швидкістю обертання 145 оборотів за хвилину. На початкових етапах

культивування вихідна оптична густина суспензії мікроорганізмів становила $OD_{670} = 0,1$.

Концентрацію бактерій в культуральному середовищі встановлювали згідно калібрувальної кривої за оптичною густиною (ОГ) суспензії, яку визначали за допомогою колориметр-нефелометра КФК-2-УХЛ 4.2 при довжині хвилі, яка відповідала максимуму пропускання світлофільтра 670 ± 10 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 3 мм. Отримані дані подавали в кількості клітин на мл (кл/мл). Відбір проб для вимірювання ОГ проводили кожні 2 години.

Вивчення впливу різних значень температури на емісійну активність досліджуваних бактерій проводили в діапазоні температур від 18 до 42°C за допомогою портативного термостата TDB-120 (Латвія) з точністю встановлення температури 0,1°C.

Кількість життєздатних клітин (КУО) – колоніє утворювальних одиниць) визначали шляхом висіву десятикратних серійних розведень бактеріальної суспензії на тверде поживне середовище з подальшим підрахунком колоній, що вирости.

Отримані результати і дані порівнювали зі значеннями інтактною культури *P. phosphoreum*, яку культивували за аналогічних умов.

2.3 Вимірювання бактеріальної біolumінесценції

Кількісну оцінку інтенсивності люмінесценції бактерій проводили за допомогою фотоелектронного помножувача ФЕП-115 – пристрою для дослідження швидкоплинних процесів і зчитування графічної інформації із сур'мяно-натрієво-цезієвим фотокатодом (рис. 2.1) [78]. Вибір саме ФЕП пов'язаний з метою досягнення максимальної чутливості до змін інтенсивності люмінесценції (Таблиця 2.2).



Рис. 2.1 – Фотоелектронний помножувач ФЭУ-115 для вимірювання інтенсивності бактеріальної люмінесценції

Таблиця 2.2

Характеристики фотоелектронного помножувача ФЭУ-115

Параметр	Умови	ФЭУ-115	Одиниці виміру
Чутливість фотокатода	при $U_{\text{жив}} = 160 \div 200$ В	$\geq 5 \times 10^{-5}$	А/лм
Анодна чутливість	при $U_{\text{жив}} = 1,3$ кВ	3	А/лм
	при $U_{\text{жив}} = 1,55$ кВ	10	
	при $U_{\text{жив}} = 1,75$ кВ	30	
Струм анода, найбільший	—	≤ 250	мкА
Темновий струм	при $U_{\text{жив}} = 1,55$ кВ	$\leq 5 \times 10^{-9}$	А
Межа лінійної спектральної характеристики	в імпульсному режимі	≥ 20	мА

Тривалість імпульсу анодного струму	—	≤ 10	нс
Час наростання імпульсу анодного струму	—	≤ 5	нс
Наробка	—	≥ 750	год

Інтенсивність люмінесценції виражали в значеннях біолюмінесцентного індексу – БІ, який розраховували за формулою 2.1 як відношення інтенсивності люмінесценції дослідного зразка (U_d) до інтенсивності світіння контрольного зразка (U_k):

$$БІ = U_d / U_k \quad (2.1)$$

У разі потрапляння БІ в діапазон 0,8–1,2 відн. од. або 80–120% аналізована проба оцінюється як нетоксична (допустимо токсична); при відхиленні від контролю більш ніж на 20%, але менше ніж на 50% зі значеннями $0,8 > БІ > 0,5$ або $1,5 > БІ > 1,2$ оцінка змінюється на «токсична» [79]. При перевищенні цих порогів робиться висновок про сильну токсичність аналізованих проб.

Іншим параметром, який часто визначається, є індекс токсичності (ІТ), що розраховується за формулою 2.2:

$$ІТ = (I_k - I_d) / I_k \times 100\%, \quad (2.2)$$

де I_d і I_k – інтенсивності світіння бактерій у дослідній і контрольній пробах, відповідно.

Граничними рівнями індексу токсичності при цьому є: $ІТ < 20$ (допустима ступінь токсичності), $20 < ІТ < 50$ (зразок токсичний) та $ІТ > 50$ (зразок сильно токсичний). Таким чином, за своїм змістом, даний параметр дозволяє

безпосередньо перетворювати значення інтенсивності люмінесценції в величини токсичності, що пояснює його використання в ряді методик, затверджених службами санітарно-епідеміологічного нормування [80].

Принцип роботи установки для вимірювання бактеріальної біолюмінесценції представлений на рисунку 2.2.

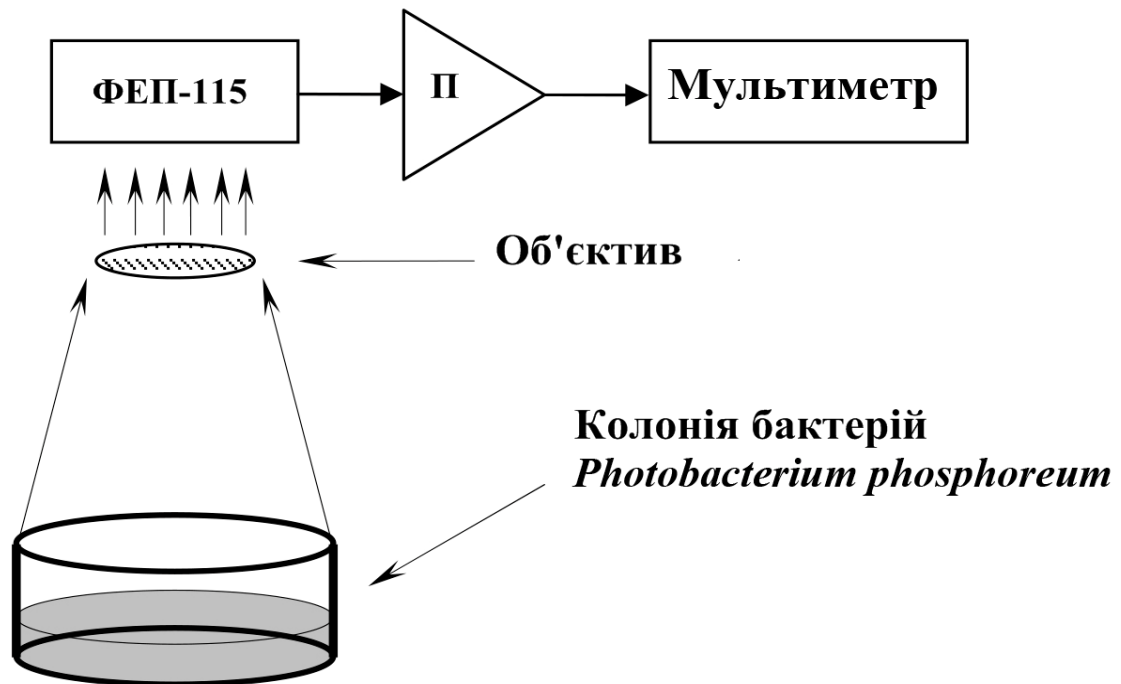


Рис. 2.2 – Принцип роботи експериментальної установки для вимірювання бактеріальної біолюмінесценції.

При вимірюванні інтегрального світлового потоку люмінесценція від зразка з бактеріями ($\lambda = 490$ нм) за допомогою світлосильного високоапертурного об'єктива ($A = 0,7$) фокусувалася на фотокатод ФЕП-115 із максимумом чутливості при 440–490 нм. Напруга живлення ФЕП становила $U = 1,3$ кВ при $I = 1,5$ мА. Анодний струм ФЕП посилювався прецизійним підсилювачем (П), що працює в режимі перетворювача струм-напруга. Вихідна напруга з підсилювача реєструвалася мультиметром з високим вхідним опором.

Методика визначення інтенсивності світіння полягала у вимірюванні люмінесценції бактерій в темній кімнаті. На першому етапі визначали рівень "темного" сигналу фотопомножувача – U_0 , потім під об'єктив поміщали зразок з бактеріями і вимірювали сигнал від зразка, бактерій *P. phosphoreum* ІМВ В-7071, – U_1 . Інтенсивність сигналу від бактерій перевершувала рівень "темного" сигналу більш ніж на два порядки. Для подальшого аналізу використовували різницю сигналів $U = U_1 - U_0$, яка була пропорційна інтенсивності бактеріального світіння [109].

2.4. Процедура опромінення ЕМВ

Процедуру опромінення бактерій ЕМВ проводили серійним апаратом, що широко використовуються в лікувальній фізіотерапевтичній практиці: апарат апарат для СМВ-терапії "Луч-11" (№543) (Таблиця 2.3). Відстань між антеною випромінювання і об'єктом впливу становила 5 см. Зразок з клітинами в рідкому середовищі з концентрацією 2×10^7 кл/мл опромінювали при екрануванні видимого світла. Обробку бактерій ЕМВ в залежності від мети дослідження проводили при потужності випромінювання до 15 Вт. Контрольні зразки знаходилися при аналогічних умовах без опромінення. Ефекти ЕМВ оцінювали по зміні інтенсивності люмінесценції. Для оцінки впливу теплових ефектів ЕМВ як додатковий контроль використовували неопромінені зразки які витримували під час експерименту при температурі 42°C (точність 0,1°C) в портативному термостаті TDB-120 (Biosan, Латвія).

Характеристики джерел випромінювання ЕМВ РЧ

Найменування апарату	Потужність, Вт	Частота випромінювання, МГц	Діапазон ЕМВ РЧ
«Луч-11»	15	2450	Ультрависокі частоти (УВЧ)

Вплив ЕМВ на бактерії визначали за оптимальних умов рН (6,5–8,5) і температури (18–25 °С).

Контрольні і опромінені клітини бактерій переносили в необхідній кількості в колби або в чашки Петрі для подальших досліджень.

Досліди проводили в приміщенні, екранованому від можливих додаткових джерел ЕМВ.

2.5. Аналітичні характеристики тест-системи

Ефективність роботи тест-системи визначали за її аналітичними характеристиками. Останні включали властивості аналітичного сигналу (величина і час відгуку) у відповідь на дію досліджуваного впливу, стабільність відповіді сенсорного елемента, чутливість, відтворюваність сигналу та інші [22-24].

Динамічний діапазон тест-системи визначали як інтервал між найбільшим і найменшим можливими значеннями досліджуваного фактора, що може бути вимірним за допомогою тест-системи.

Чутливість тест-системи обчислювали за формулою 2.3 як відношення аналітичного сигналу (ΔY) до амплітуди впливу (ΔX):

$$\alpha = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad (2.3)$$

Час відгуку визначали як тривалість одиничного вимірювання, що характеризувало швидкість проведення аналізу.

Операційна стабільність показувала стійкість відповіді тест-системи на одну і ту ж величину впливу при проведенні великої кількості послідовних вимірювань і тісно пов'язана з відтворюваністю. Операційну стабільність тест-системи визначали як відносне стандартне відхилення при багаторазовому вимірі стандартного зразка.

Довготривала стабільність характеризувала стійкість роботи тест-системи протягом тривалого періоду часу. Довготривалу стабільність визначали шляхом щоденного визначення величини відповіді сенсорного елемента на одну і ту ж величину впливу. За час стабільної роботи рецепторного елемента брали час, протягом якого величина сигналу становила не менше, ніж 30% від початкової. За 100% приймали відповідь тест-системи в перший день вимірювань.

2.6 Статистичний аналіз

Всі дослідження проводили не менш ніж у 3-х повторностях. Отримані дані обробляли статистично загальноприйнятими методами варіаційної статистики, враховуючи 95%-ий рівень достовірності за критерієм Стьюдента. Розрахунки, графіки, гістограми виконані за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2013.

Залежність інтенсивності світіння бактерій *P. phosphoreum* IMB B-7071 для оптимізації основних аналітичних характеристик оцінювали використовуючи методи регресіонного аналізу в теорії планування експерименту по повнофакторному плану 3к. Даний підхід дозволяє в рамках однієї моделі оцінити лінійні і квадратичні ефекти впливу факторів (X_1 , X_2 , X_3) на показник Y і висловити у вигляді рівняння регресії:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j>i}^n a_{ij} x_i x_j$$

де a_0 – константа, a_i - лінійний коефіцієнт, a_{ii} – квадратичний коефіцієнт, a_{ij} - коефіцієнт взаємодії другого порядку.

Статистична обробка даних планованого експерименту (розрахунок коефіцієнтів регресії, дисперсійний аналіз (ANOVA) і побудова поверхонь відгуку проводилась з застосуванням тріал-версії програми Statistica (TIBCO Software Inc., <https://www.tibco.com/>) з використанням бібліотеки DOE. Отримані коефіцієнти вважалися статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Висновки до розділу 2

1. Для приготування твердого поживного середовища використовували (пептон – 5,0; дріжджовий екстракт – 1,0; гліцерин – 3,0 мл/л; NaCl – 30,0; Na₂HPO₄ – 5,3; KН₂PO₄·2H₂O – 2,1; (NH₄)₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄·H₂O – 0,1; агар-агар – 20 г/л).

2. Оцінку інтенсивності люмінесценції бактерій проводили за допомогою фотоелектронного помножувача ФЕП-115 – пристрою, який зчитування графічної інформації із сур'мяно-натрієво-цезієвим та швидкоплинних процесів.

3. Для оптимізації основних аналітичних характеристик та статистичної обробка даних планованого експерименту (розрахунок коефіцієнтів регресії, дисперсійний аналіз (ANOVA) і побудова поверхонь відгуку) запропоновано застосувати тріал-версію програми Statistica (TIBCO Software Inc., <https://www.tibco.com/>) з використанням бібліотеки DOE.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для отримання ефективної мікробної тест-системи необхідне створення певних фізіологічних умов для існування бактерій, за допомогою яких можливо досягнення високих показників біоломінесцентної активності *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 та максимальної селективності і чутливості до досліджуваного фактору.

Ефективність тест-системи визначається її аналітичними характеристиками. Останні включають властивості аналітичного сигналу (величина і час відгуку) у відповідь на дію досліджуваного впливу, стабільність сенсору, лінійний діапазон детекції, чутливість, відтворюваність сигналу та інші. Ці основні показники визначають перспективність і рентабельність технологічного процесу [81, 82].

Оцінку операційних характеристик тест-системи проводили після опромінення бактерій ЕМВ у різних за консистенцією варіантах поживних середовищ: рідкому, твердому і напіврідкому. Бактеріальні клітини піддавалися впливу ЕМВ УВЧ діапазонів з потужністю 15 Вт протягом 15 хв.

3.1 Оптимізація інтенсивності люмінесценції бактерій *P. phosphoreum* ІМВ В-7071

Враховуючи, що ключовим показником від якого залежать аналітичні характеристики тест-системи для біотестування електромагнітного випромінювання є інтенсивність світіння, було вирішено провести оптимізацію концентрації компонентів поживного середовища, дріжджового екстракту та гліцерину, які безпосередньо впливають на інтенсивність та тривалість люмінесценції при найбільш значущому впливі ЕМВ УВЧ з тривалістю 5 хв і 15 хв.

У ході подальшої роботи була проведена оптимізація *in silico* параметрів математичної моделі *P. phosphoreum* на дію ЕМВ в присутності компонентів

поживного середовища. Дослідження проводили за планом повного факторного експерименту 3^3 . (таб. 3.1). План експерименту, а також варіанти поєднання факторів приведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.1

**Фактори математичної моделі для оцінки впливу опромінення ЕМВ
УВЧ**

Фактори	Рівні факторів		
	1	0	+1
Концентрація дріжджового екстракту (X_1), г/л	1	3	5
Концентрація гліцерину (X_2), г/л	1	3	5
Час опромінення ЕМВ (X_3), хв	0	5	15

Таблиця 3.2

Матриця планування експерименту за планом ПФЕ

№	Рівні факторів оптимізації			параметр оптимізації
	X_1	X_2	X_3	luminescence
1	-1	-1	-1	Y_1
2	-1	-1	0	Y_2
3	-1	-1	+1	Y_3
4	-1	0	-1	Y_4
5	-1	0	0	Y_5
6	-1	0	+1	Y_6
7	-1	+1	-1	Y_7
8	-1	+1	0	Y_8
9	-1	+1	+1	Y_9

№	Рівні факторів оптимізації			параметр оптимізації
	X_1	X_2	X_3	luminescence
10	-1	0	-1	Y_{10}
11	-1	0	0	Y_{11}
12	-1	0	+1	Y_{12}
13	0	0	-1	Y_{13}
14	0	0	0	Y_{14}
15	0	0	+1	Y_{15}
16	-1	+1	-1	Y_{16}
17	-1	+1	0	Y_{17}
18	-1	+1	+1	Y_{18}
19	+1	0	-1	Y_{19}
20	+1	0	0	Y_{20}
21	+1	0	+1	Y_{21}
22	+1	0	-1	Y_{22}
23	+1	0	0	Y_{23}
24	+1	0	+1	Y_{24}
25	+1	+1	-1	Y_{25}
26	+1	+1	0	Y_{26}
27	+1	+1	+1	Y_{27}

Примітка:

X_1 - Концентрація дріжджового екстракту, г/л

X_2 - Концентрація гліцерину, г/л

X_3 - Час опромінення ЕМВ, хв

План експерименту з вивчення змін інтенсивності світіння *P. phosphoreum* від тривалості ЕМВ при різних концентраціях компонентів поживного середовища, а також варіанти поєднання чинників і отримані результати наведені в табл. 3.3

Таблиця 3.3

Матриця планування експерименту за планом ПФЕ

№	Фактори оптимізації			параметр оптимізації
	X_1	X_2	X_3	luminescence
1	1,000000	1,000000	0,000000	5,30
2	1,000000	1,000000	5,000000	7,40
3	1,000000	1,000000	15,000000	1,30
4	1,000000	3,000000	0,000000	8,60
5	1,000000	3,000000	5,000000	9,00
6	1,000000	3,000000	15,000000	3,50
7	1,000000	5,000000	0,000000	7,40
8	1,000000	5,000000	5,000000	10,10
9	1,000000	5,000000	15,000000	4,50
10	3,000000	1,000000	0,000000	10,00
11	3,000000	1,000000	5,000000	12,40
12	3,000000	1,000000	15,000000	5,70
13	3,000000	3,000000	0,000000	9,80
14	3,000000	3,000000	5,000000	12,10
15	3,000000	3,000000	15,000000	5,70
16	3,000000	5,000000	0,000000	8,70

№	Фактори оптимізації			параметр оптимізації
	X_1	X_2	X_3	luminescence
17	3,000000	5,000000	5,00000	10,40
18	3,000000	5,000000	15,00000	6,20
19	5,000000	1,000000	0,00000	8,70
20	5,000000	1,000000	5,00000	10,90
21	5,000000	1,000000	15,00000	7,50
22	5,000000	3,000000	0,00000	13,10
23	5,000000	3,000000	5,00000	15,20
24	5,000000	3,000000	15,00000	8,70
25	5,000000	5,000000	0,00000	14,30
26	5,000000	5,000000	5,00000	15,50
27	5,000000	5,000000	15,00000	7,90

Примітка:

X_1 - Концентрація дріжджового екстракту, г/л

X_2 - Концентрація гліцерину, г/л

X_3 - Час опромінення ЕМВ, хв

Рівень значущості ефектів (лінійних, квадратичних і ефектів взаємодії) визначали методом дисперсійного аналізу (ANOVA), який показав, що концентрація дріжджового екстракту (X_1), концентрація гліцерину (X_2) і час опромінення ЕМВ (X_3) має достовірний ($p \leq 0,02$) вплив на інтенсивності біолюмінесценції (таб.3.4).

Таблиця 3.4

**Результати дисперсійного аналізу (ANOVA) залежності інтенсивності
світіння бактерій від факторів та їх взаємодії**

Фактори	Сума квадратів	Ступені свободи	Середня сума	F	p
(1) Yeast extract L+Q	109,1832	2	54,59162	31,65144	0,000002
(2) Glicerol L+Q	18,4710	2	9,23550	5,35461	0,015722
(3) Irradiation time L+Q	156,0896	2	78,04481	45,24927	0,000000
1*2	0,5633	1	0,56333	0,32661	0,575139
1*3	0,0004	1	0,00036	0,00021	0,988687
2*3	0,4292	1	0,42921	0,24885	0,624281
Помилка	29,3212	17	1,72478		
Загальна сума квадратів	316,9341	26			

Примітка:

L - Лінійні ефекти фактора;

Q - Нелінійні (квадратичні) ефекти фактора;

«*» -позначення поєднаної дії декількох факторів.

Для візуальної оцінки ефектів дисперсійного аналізу на рис. 3.5 представлена діаграма Парето, на якій ефекти розташовані по спадаючій абсолютної величини значень. Дана діаграма показує, що максимальним достовірним впливом володіє лінійний ефект концентрації дріжджового екстракту та тривалості опромінення ЕМВ, а мінімальним - ефект концентрації гліцерину.

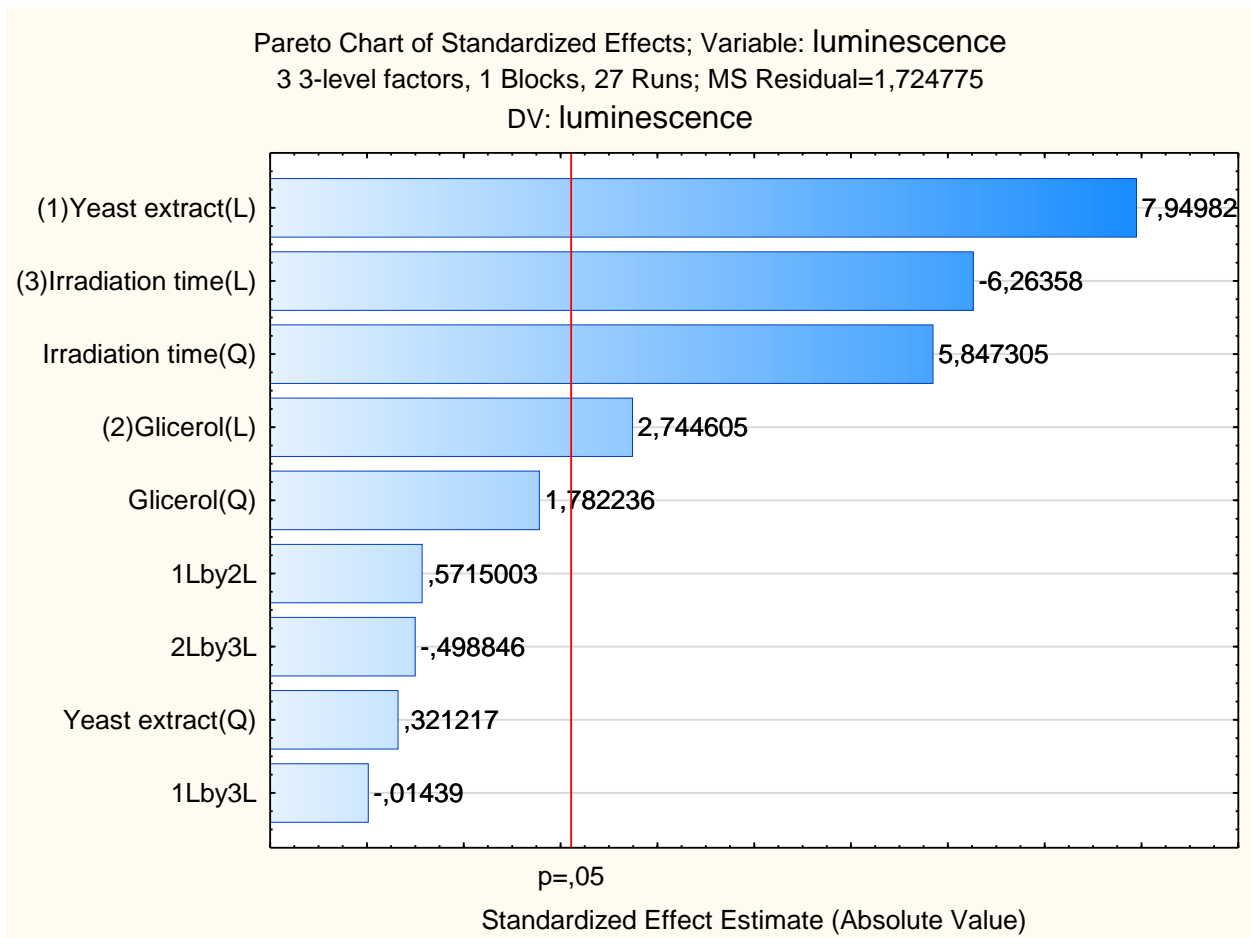


Рис. 3.5– Вплив досліджуваних факторів на інтенсивність світіння *P.phosphoreum*

У ході аналізу вихідних даних отримано рівняння регресії (таб.3.5), яке має вигляд квадратичного полінома другого порядку з урахуванням тільки статистично достовірних ефектів:

$$Y = 8,669 + 4,965 X_1 + 1,714 X_2 - 3,887 X_3 + 3,192 X_3^2$$

З отриманої моделі виходить, що концентрація дріжджового екстракту виявилася найбільш важливим фактором ($F = 31,4$ $p \leq 0,001$), зі збільшенням якого інтенсивність світіння *P.phosphoreum* повинна лінійно збільшуватися (рис. 3.6.) При цьому збільшення тривалості ЕМВ ($F = 26,9$ $p \leq 0,001$), при постійних інших факторах, повинно призводити до нелінійного зниження інтенсивності біоломінесценції (рис. 3.7).

Результати регресійного аналізу залежності інтенсивності світіння бактерій від факторів та їх взаємодії, $R^2=0,90742$

	Effect	Std.Err.	t(17)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	8,669	0,255	33,988	0,000	8,131	9,207
(1)Yeast extract(L)	4,965	0,624	7,949	0,000	3,647	6,283
Yeast extract(Q)	0,172	0,536	0,321	0,7519	-0,958	1,303
(2)Glicerol(L)	1,714	0,624	2,744	0,013	0,396	3,032
Glicerol(Q)	0,955	0,536	1,782	0,092	-0,175	2,086
(3)Irradiation time(L)	-3,877	0,619	-6,263	0,000	-5,183	-2,571
Irradiation time(Q)	3,192	0,545	5,847	0,000	2,040	4,344
1L by 2L	0,433	0,758	0,571	0,575	-1,161	2,033
1L by 3L	-0,010	0,744	-0,014	0,988687	-1,58163	1,56020

Згідно поверхні відгуку біоломінесценції бактерій *P. phosphoreum* (рис. 3.8) негативний вплив ЕМВ на інтенсивність світіння при збільшенні концентрація дріжджового екстракту значно зменшується. Отримані дані дозволяють стверджувати що стресовому характеру впливу ЕМВ УВЧ на світіння бактерій протистоїть розвитку у *P. phosphoreum* адаптації до неіонізуючих ЕМВ при даних рівнях впливу.



Рис. 3.6 – Діаграма середніх впливу концентрації дріжджового екстракту.

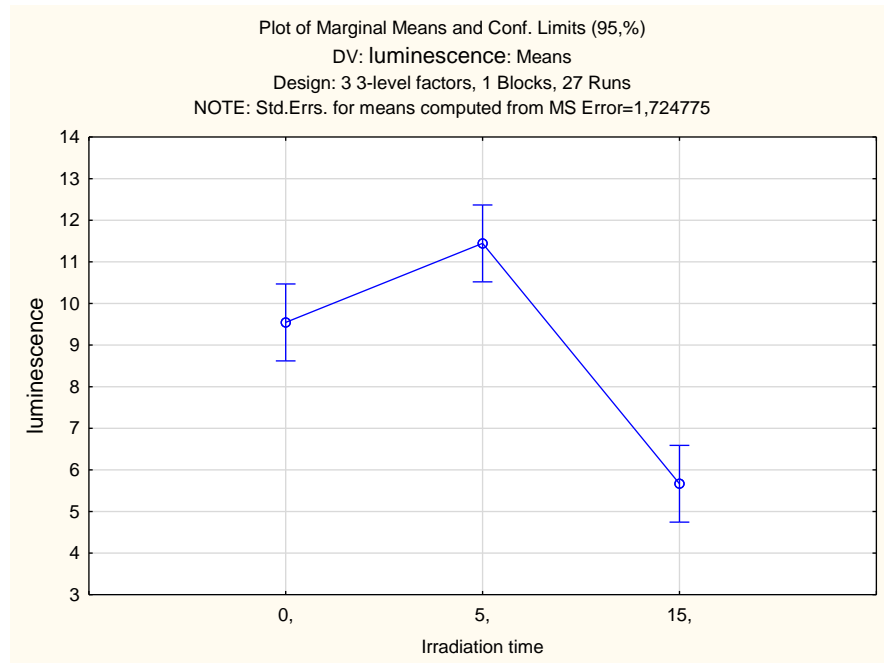


Рис. 3.7 – Діаграма середніх впливу тривалості ЕМВ.

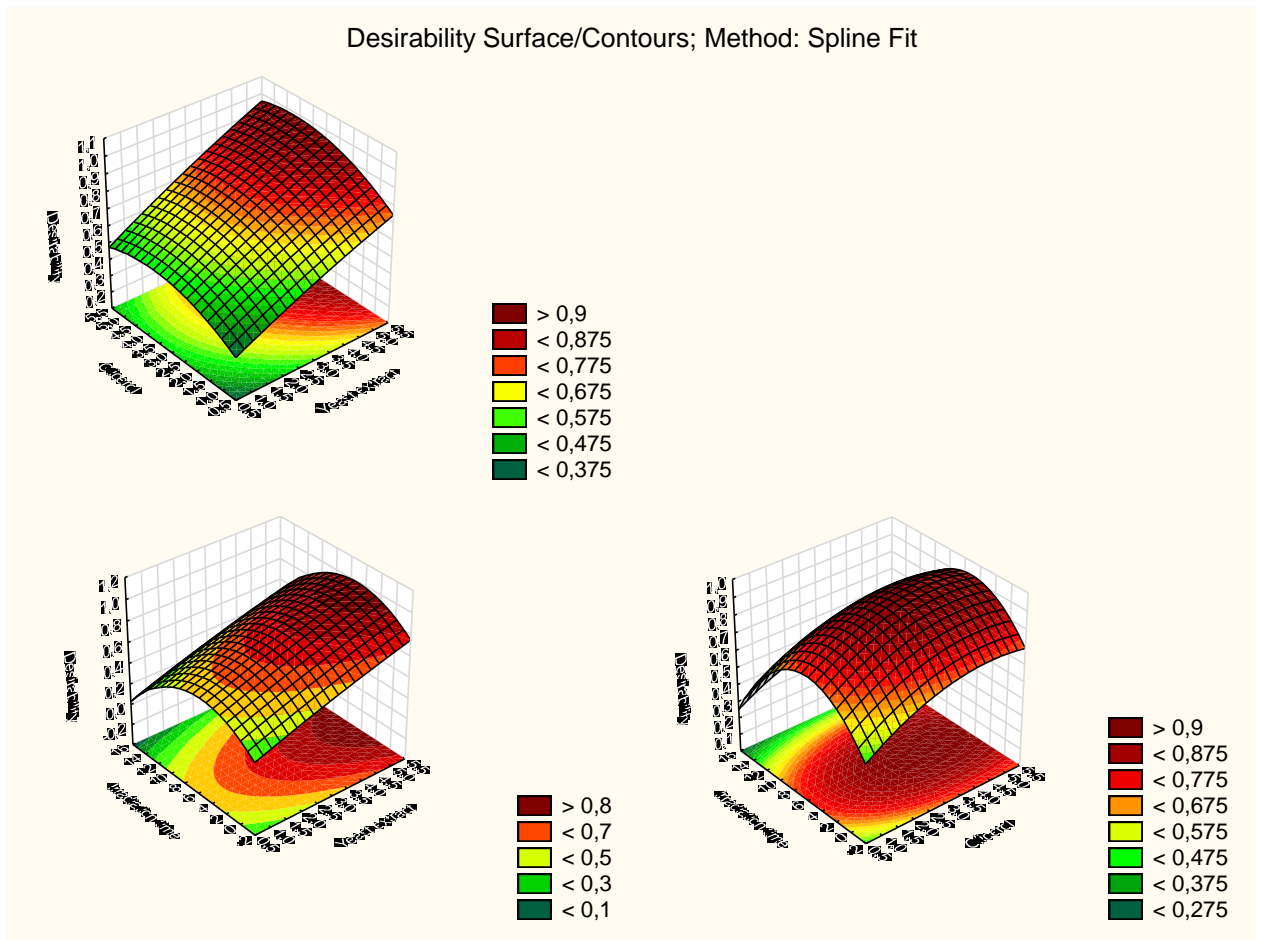


Рис. 3.8 – Поверхні відгуку люмінесценції *P. phosphoreum* як функції від досліджуваних факторів.

Оптимальними розрахунковими величинами для досліджених факторів по результатах аналізу поверхні відгуку в рамках нашої експериментальної роботи виявилися: концентрація дріжджового екстракту - 5 г/л; концентрація гліцерину – 4 г/л; час опромінення ЕМВ – 3,75 хв (Рис. 3.9).

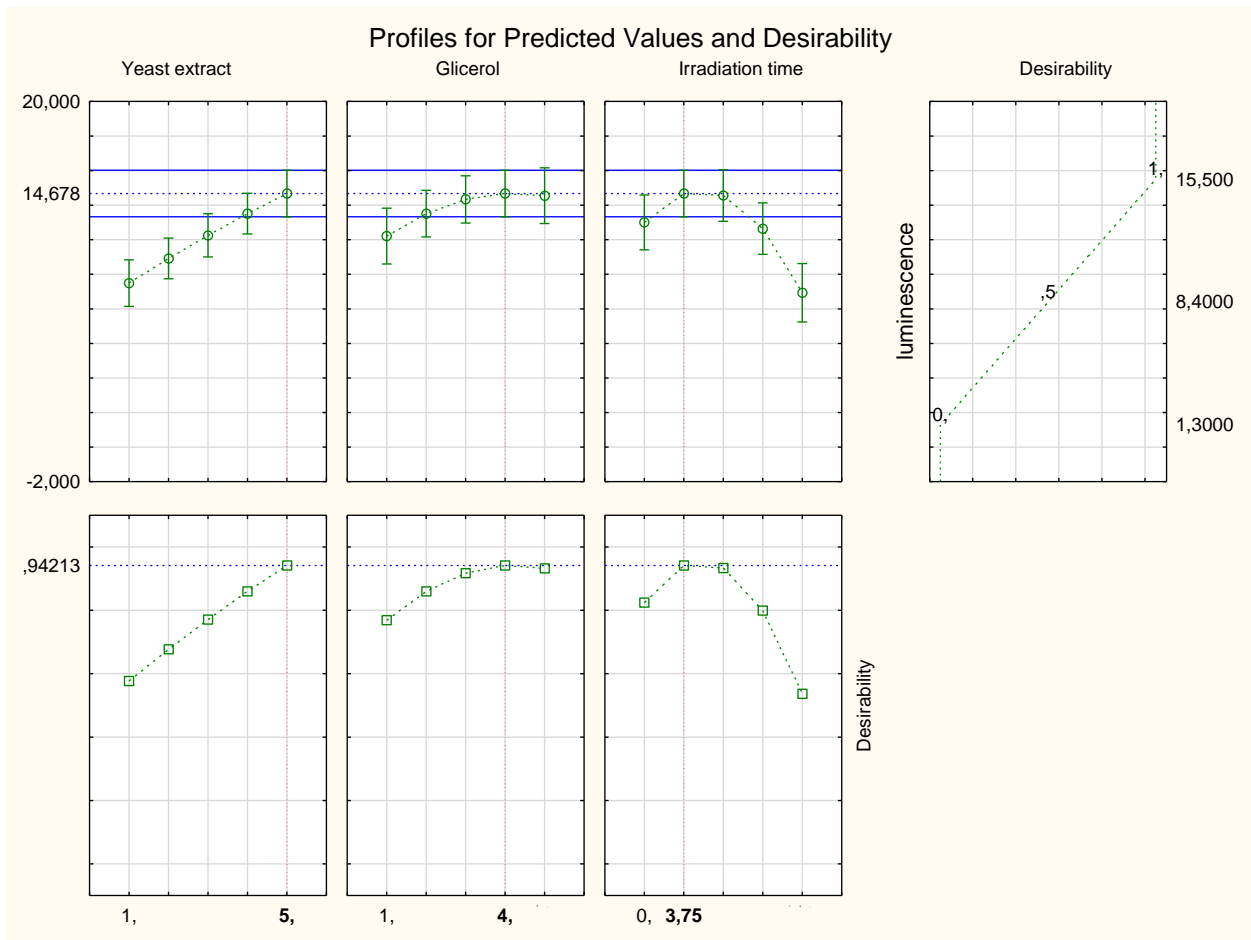


Рис. 3.9 – Профілі прогнозованих значень для отримання оптимальних значень біоломінесценції *P. phosphoreum*.

В результаті проведеної роботи показано, що стресовий характер досліджуваних рівнів впливу ЕМВ УВЧ на світіння бактерій призводить до розвитку у *P. phosphoreum* адаптації за участі дріжджового екстракту, зменшуючи негативний вплив ЕМВ на світіння. Розрахункова максимальна інтенсивність біоломінесценції при даних рівнях впливу визначена при концентрації дріжджового екстракту - 5 г/л; концентрації гліцерину – 4 г/л і тривалості опромінення ЕМВ – 3,75 хв.

3.2. Характеристики тест-системи з *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 в рідкому середовищі культивування

При вивченні люмінесценції суспензії бактеріальних клітин у рідкому середовищі була зафіксована найбільш висока з усіх варіантів інтенсивність світіння, яка прямо пропорційно залежала від чисельності бактерій. Але при цьому тривалість максимального рівня світіння культури була найменшою і мала зворотно пропорційну залежність від густини бактеріальної суспензії. Це пов'язано з особливостями споживання кисню бактеріями в рідкому середовищі, що підтверджено літературними даними [84].

Дослідження впливу ЕМВ РЧ на люмінесцентні бактерії *P. phosphoreum* проводили за різного часу дії ЕМВ УВЧ. Перераховуючи тривалість опромінення в енергетичне навантаження (ЕН) за формулою $ЕН = P \times t$ отримали дозові залежності біолюмінесценції *P. phosphoreum* за різного часу дії ЕМВ ДВЧ і УВЧ (рис. 3.10).

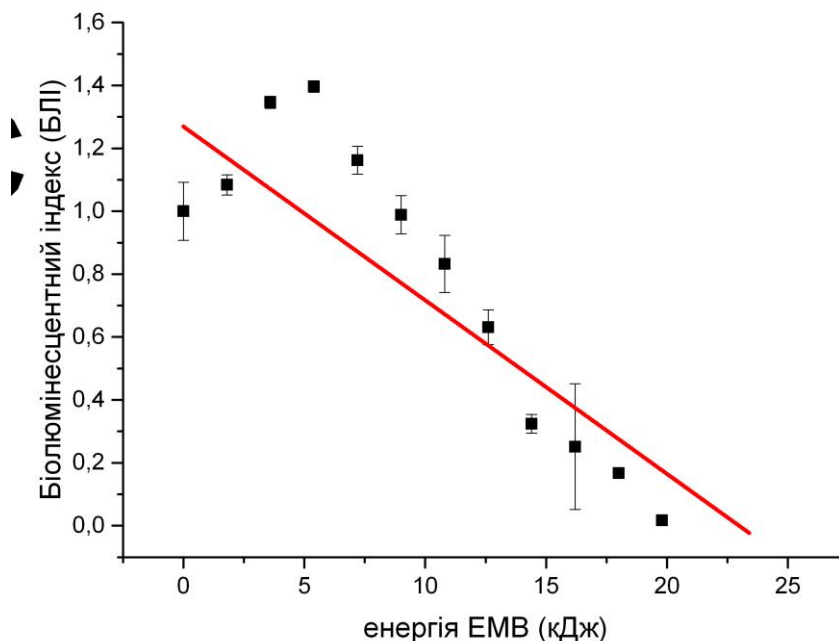


Рис. 3.10. Дозова залежність люмінесценції *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 у рідкому середовищі від ЕМВ УВЧ.

Динамічний діапазон біосенсора склав відстань між 5,6 кДж і 22,0 кДж енергетичного навантаження в якому можливо визначення впливу ЕМВ РЧ.

Коефіцієнт чутливості визначили як відношення абсолютної зміни біоломінесцентного індексу до приросту енергетичного навантаження впливу:

$$\alpha = 0,05 \text{ кДж}^{-1}$$

При зазначеному впливі межу виявлення ЕМВ визначали як енергетичне навантаження, що викликає зміну на 0,20 одиниці біоломінесцентного індексу. Для ЕМВ УВЧ діапазонів з потужністю 15 Вт межа виявлення склала 5,6 кДж.

При дослідженні найменший час вимірювання значущої зміни БІ складав 5 хв.

Операційна стабільність показує стійкість відповіді сенсора на одну і ту ж величину впливу при проведенні великої кількості послідовних вимірювань і тісно пов'язана з метрологічною характеристикою збіжністю (відтворюваністю).

Операційна стабільність сенсорів характеризується відносним стандартним відхиленням при багаторазовому вимірі стандартного зразка і залишкової активності (% від початкової) біосенсора після декількох послідовних вимірювань протягом певного періоду часу (табл 3.6).

Для визначення операційної стабільності було проведено 10 послідовних вимірів відповіді сенсора на 5 хв дії ЕМВ (рис. 3.11).

Таблиця 3.6

Дані з операційної стабільності люмінесценції *P. phosphoreum* при впливі ЕМВ РЧ на рідкому середовищі

	Біоломінесцентний індекс	Стандартне відхилення БІ,	Відносне стандартне відхилення, %
ЕМВ ДВЧ	1,22	0,142	11,7
ЕМВ УВЧ	1,48	0,185	12,5

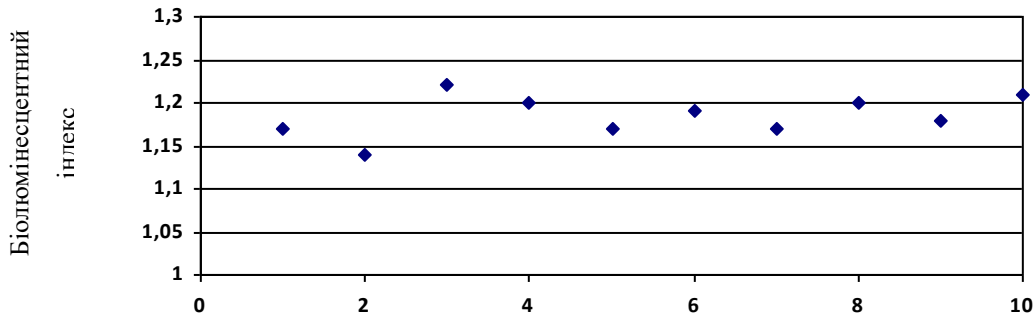


Рис. 3.11. Операційна стабільність біосенсора.

Таким чином, зафіксована максимальна інтенсивність люмінесценції при найменш тривалому світінні не дозволяє рекомендувати робочий елемент біосенсора на рідкому середовищі для подальшого використання.

3.3. Характеристики тест-системи з *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 на твердому середовищі культивування

Використання для культивування *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 твердого середовища дозволило провести моніторинг зміни інтенсивності бактеріального світіння в оптимальних для їх розвитку умов.

Аналіз динаміки світіння в різні терміни культивування бактерій показав, що зі збільшенням часу культивування зникала гармонійна складова з періодом ~60 хвилин і спостерігалось зменшення амплітуди виявлених періодів. Це може бути наслідком зниження метаболічних процесів в старіючої бактеріальної культури. Диференціація клітин в зростаючої колонії відбивалася і на інтенсивності їх люмінесценції. Клітини, представлені в периферійній зоні росту, молодші, з активним метаболізмом, демонстрували яскраве світіння. У той час як центральна частина колонії, складалася з менш життєздатних клітин, що фіксувалось в зніженні інтенсивності світіння (рис 3.12). Експерименти, проведені нами раніше з цією культурою в умовах рідкого поживного середовища, показали, що максимальне світіння клітин припадало на

експоненційну фазу їх росту [85]. Ці дані підтверджують відоме положення про те, що бактеріальна люмінесценція є інтегральним показником активності метаболічних процесів, які протікають у клітині [86]. У дослідах із світінням колоній *P. phosphoreum* ІМВ В-7071, незважаючи на просторово-часову гетерогенність клітин у колонії, загальний рівень світіння в розглянутий період залишався незмінним, в зв'язку з приростом досліджуваної біомаси [87].

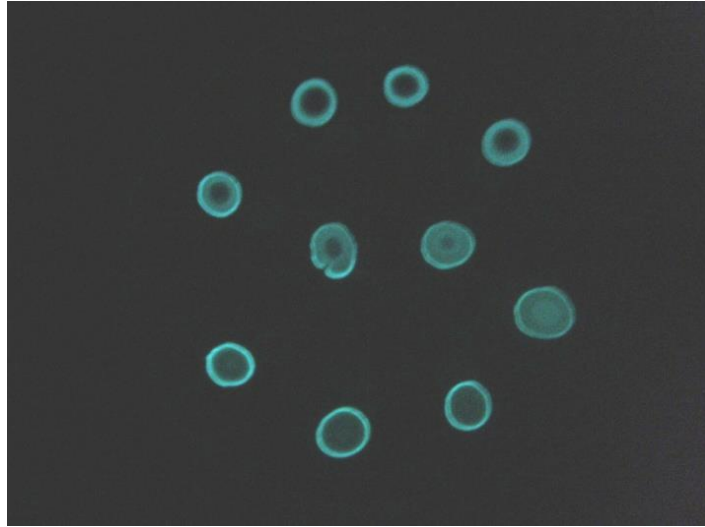


Рис. 3.12. Фотографія диференційованих бактеріальних колоній *P. phosphoreum* ІМВ В-7071

Дослідження впливу ЕМВ РЧ на поодиноких колоніях бактерії *P. phosphoreum* проводили за різного часу дії ЕМВ УВЧ. Отримано дозові залежності біолюмінесценції *P. phosphoreum* від енергетичного навантаження (ЕН) дії ЕМВ УВЧ (рис. 3.13).

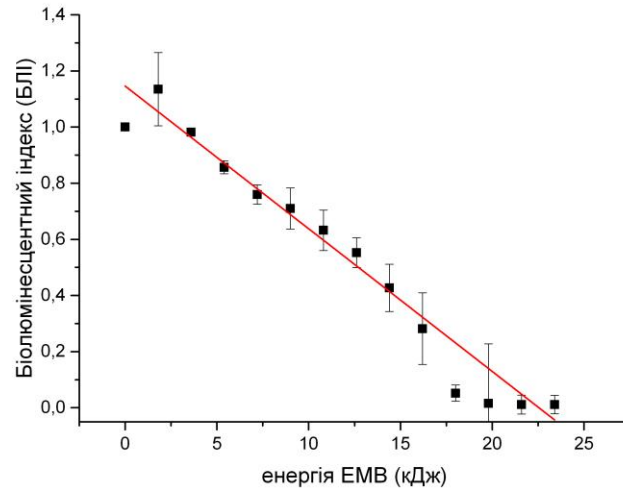


Рис. 3.13. Дозова залежність люмінесценції *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 від ЕМВ УВЧ на твердому середовищі.

Отриману залежність люмінесценції, характерну для клітин *P. phosphoreum*, можна виразити через рівняння лінійної кривої:

$$BI = 1,18 - 0,04 EN ,$$

Динамічний діапазон біосенсора склав відстань між 4,5 кДж і 23,0 кДж енергетичного навантаження в якому можливо визначення впливу ЕМВ РЧ.

Коефіцієнт чутливості визначили як відношення абсолютної зміни біолюмінесцентного індексу до приросту енергетичного навантаження впливу:

$$\alpha = 0,04 \text{ кДж}^{-1}$$

При зазначеному впливі межу виявлення ЕМВ визначали як енергетичне навантаження, що викликає зміну на 0,20 одиниці біолюмінесцентного індексу. Для ЕМВ ДВЧ і УВЧ діапазонів з потужністю 15 Вт межа виявлення склала 4,5 кДж.

При дослідженні найменший час вимірювання значущої зміни БЛІ складав 5 хвилин.

Довготривала стабільність є характеристикою самого рецепторного елемента та залежить від фізіологічного стану і способу іммобілізації клітин. Довготривала стабільність характеризує стійкість роботи сенсора протягом тривалого періоду часу.

Довготривалу стабільність визначали шляхом щоденного визначення величини відповіді сенсора на одну і ту ж величину впливу. За час стабільної роботи рецепторного елемента брали час, протягом якого величина сигналу становила не менше 30% від початкової. За 100% приймали відповідь біосенсора в перший день вимірювань (рис 3.14).

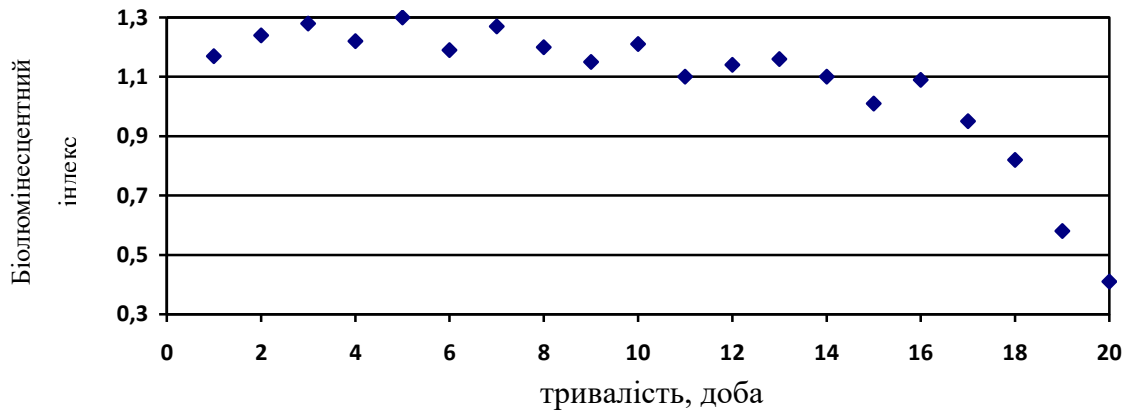


Рис. 3.14. Довготривала стабільність люмінесценції *P. phosphoreum* на твердому середовищі.

Висока активність клітин *P. phosphoreum* зберігається до 28 дня після початку культивування на твердому середовищі.

Таким чином, отримані результати на твердому середовищі культивування, при порівнянні з даними люмінесценції в рідкому середовищі, зафіксували більшу стабільність та довготривалість люмінесценції *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 при майже однакової чутливості до дії ЕМВ.

3.4. Характеристики тест-системи з *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 в напіврідкому середовищі.

Для збільшення біомаси люмінесцентних бактерій використовують складні поживні середовища, до вмісту яких входять такі компоненти як пептон, дріжджовий екстракт, рибні та м'ясні витяжки та ін. [88]. Недоліком таких поживних середовищ є складність їх виготовлення і відносно висока вартість компонентів. У зв'язку з цим, актуальним є розробка та здешевлення середовища для підвищення тривалості і стабільності високої активності люмінесцентних мікроорганізмів.

Однією з необхідних вимог до якості мікробних препаратів є їх здатність зберігати високу активність біоагента протягом тривалого часу. Дослідження тривалості світіння бактерій при культивуванні в різних за складом гелевих середовищах показало суттєву перевагу суміші ЕПАА і ЕПС ксантан 30% + 70%.

Пошук оптимального вмісту гелів для композиції, яка б забезпечувала високу життєздатність і світіння люмінесцентних бактерій при зберіганні протягом місяця, проводили після внесення в стерильні флакони (в співвідношенні 1:1) суспензії бактерій 10^{10} кл/мл та суміші з різною концентрацією гелю ЕПАА і ксантану.

При дослідженні інтенсивності люмінесценції *P. phosphoreum* на гелевому середовищі також вивчалась динаміка змін рівня люмінесценції в часі. При цьому спостерігалось спочатку максимальна люмінесценція для даної культури, потім його помітне повільне зниження. (Рис. 3.15).

Дослідження впливу ЕМВ РЧ на люмінесценцію *P. phosphoreum* в гелевому середовищі проводили за різного часу дії ЕМВ УВЧ. Отримано дозові залежності біолюмінесценції *P. phosphoreum* від енергетичного навантаження ЕМВ УВЧ (рис. 3.15).

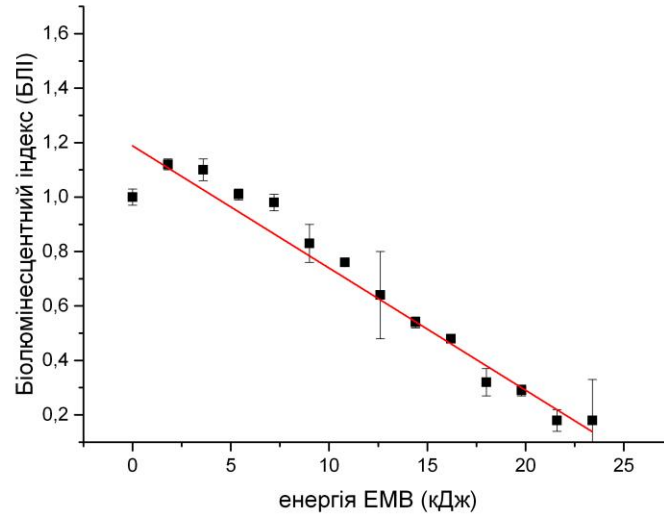


Рис. 3.15. Дозова залежність люмінесценції *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 від ЕМВ УВЧ на гелевому середовищі

Отриману залежність люмінесценції, характерну для клітин *P. phosphoreum*, можна виразити через рівняння лінійної кривої:

$$BI = 1,21 - 0,04 EN ,$$

Динамічний діапазон біосенсора склав відстань між 4,5 кДж і 23,0 кДж енергетичного навантаження в якому можливо визначення впливу ЕМВ РЧ.

Коефіцієнт чутливості визначили як відношення абсолютної зміни біолоюмінесцентного індексу до приросту енергетичного навантаження впливу:

$$\alpha = 0,04 \text{ кДж}^{-1}$$

При зазначеному впливі межу виявлення ЕМВ визначали як енергетичне навантаження, що викликає зміну на 0,20 одиниці біолоюмінесцентного індексу. Для ЕМВ УВЧ діапазонів з потужністю 15 Вт межа виявлення склала 4,5 кДж. При дослідженні найменший час вимірювання значущої зміни БІ складав 5 хв.

Таким чином, гелеві композиції на основі ЕПАА і природного ЕПС ксантан є перспективними компонентами для пролонгації терміну зберігання і

стабілізації властивостей люмінесцентних мікробних препаратів, а також підвищення інтенсивності бактеріальної люмінесценції.

Висновки до розділу 3:

1. Показано, що при досліджуваних рівнів впливу ЕМВ УВЧ на світіння бактерій *P. phosphoreum* максимальна інтенсивність біоломінесценції при даних рівнях впливу визначена при концентрації дріжджового екстракту - 5 г/л; концентрації гліцерину – 4 г/л і тривалості опромінення ЕМВ – 3,75 хв.

2. Використання для сенсорного елементу рідкого середовища обмежено нетривалим світінням при максимальній інтенсивності люмінесценції, в той час як біоломінесценція на твердому середовищі демонструє більшу стабільність та довготривалість при майже однакової чутливості до дії ЕМВ.

3. За показниками інтенсивності люмінесценції бактерій у напіврідкому середовищі аналітичні характеристики подібні твердому середовищу. Гелева композиція є більш економною за складом та оптимальною для тривалого зберігання *P. phosphoreum*.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що при досліджуваних рівнів впливу ЕМВ УВЧ на світіння бактерій *P. phosphoreum* максимальна інтенсивність біоломінесценції при даних рівнях впливу визначена при концентрації дріжджового екстракту - 5 г/л; концентрації гліцерину – 4 г/л і тривалості опромінення ЕМВ – 3,75 хв.

2. Використання для сенсорного елементу рідкого середовища обмежено нетривалим світінням при максимальній інтенсивності люмінесценції, в той час як біоломінесценція на твердому середовищі демонструє більшу стабільність та довготривалість при майже однакової чутливості до дії ЕМВ.

3. За показниками інтенсивності люмінесценції бактерій у напіврідкому середовищі аналітичні характеристики подібні твердому середовищу. Гелева композиція є більш економною за складом та оптимальною для тривалого зберігання *P. phosphoreum*.

4. Визначені аналітичні властивості тест-систем для проведення біотестування ЕМВ: динамічний діапазон біосенсора від 4,5 кДж до 23 кДж енергетичного навантаження, коефіцієнтом чутливості 0,04 кДж-1 та швидкістю проведення аналізу 5 хвилин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dewhurst R.E., Wheeler J.R., Chummun K.S. et al. The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban groundwater quality. *Chemosphere*. 2002. 47. P. 547–554.
2. Forget G., Sanchez-Bain A., Arkhipchuk V. et al. Preliminary data of a single-blind multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring. *Environ. Toxicol.* 2000. 15. P. 362–369.
3. Deryabin D.G., Karimov I.F. Simultaneous evaluation of chemiluminescence and bioluminescence in a phagocytic system. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. 147. P. 349–352.
4. Farre M., Barcelo D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trac-Trend Anal. Chem.* 2003. 22. P. 299–310.
5. El-Alawi Y.S., Huang X.D., Dixon D.G., et al. Quantitative structure-activity relationship for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002. 21. P. 2225–2232.
6. D'Souza S.F. Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2001. 16. P. 337–353.
7. Divritsioti M.H., Karalemas I.D., Georgiou C.A., et al. Flow injection analysis system for l-lysine estimation in foodstuffs using a biosensor based on lysine oxidase immobilization on a gold-poly (m-phenylenediamine) electrode. *Anal. Lett.* 2003. 36. P. 1939–1963.
8. Liu X.M., Germaine K.J., Ruan D. Whole cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Sensors*. 2010. 10. P. 1377–1398.

9. Beyersdorf-Radeck B., Riedel K., Karlson U. et al. Screening of xenobiotic compounds degrading microorganisms using biosensor techniques. *Microbiol. Res.* 1998. 153. P. 239–245.
10. Petanen T., Romantschuk M. Use of bioluminescent bacterial sensors as an alternative method for measuring heavy metals in soil extracts. *Anal. Chim. Acta.* 2002. 456. P. 55–61.
11. Ravikumar S. et al. Engineered microbial biosensors based on bacterial two-component systems as synthetic biotechnology platforms in bioremediation and biorefinery. *Microbial cell factories.* 2017. №. 1. P. 62-69.
12. Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity. *Environ. Toxicol.* 2002. V.17. № 3. P. 291–296.
13. Girotti S. et al. Bioindicators in environmental monitoring: Bioluminescent bacteria, algae and honeybees . Proceedings of the 14th International Conference on Environmental Science and Technology. Rhodes, Greece, 2015. P. 3-5.
14. Trott D. et al. Comparative evaluation of a bioluminescent bacterial assay in terrestrial ecotoxicity testing. *Journal of Environmental Monitoring.* 2007. V. 9. № 1. P. 44-50.
15. Turner A., Karube I., Wilson G. S. Biosensors: fundamentals and applications. Oxford University Press, 1987. 786 p.
16. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda MJ, Barceló D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal Bioanal Chem.* 2006. V. 386. № 4. P. 1025–1041.
17. Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Microbial biosensors. *Analytica chimica acta.* 2006. V.568. №1. P. 200–210.
18. Riedel K. et al. Microbial sensors: fundamentals and application for process control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 1989. V.44. №2. P. 85–106.

19. Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. К.: Наукова думка, 2006. 256 с.
20. Hu J., Gao G., Xia S. Development of a mediator-type bioelectrochemical sensor based on polypyrrole immobilized ferricyanide and microorganisms for biochemical oxygen demand fast detection. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2015. V.10. №11. P. 9695–9705.
21. Malhotra B.D., Chaubey A. Biosensors for clinical diagnostics industry . *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2003. V.91. №1. C. 117–127.
22. Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Microbial biosensors . *Analytica chimica acta.* 2006. V.568. №1. P. 200–210.
23. Riedel K., Renneberg R., Scheller F. Adaptable microbial sensors . *Analytical letters.* 1990. V.23. №5. P. 757–770.
24. D'souza S.F. Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.* – 2001. V.16. №6. P. 337–353.
25. Lee S. et al. A novel microbial sensor using luminous bacteria. *Biosensors and Bioelectronics.* 1992. V.7. №4. C. 273–277.
26. Efremenko E.N. et al. Biosensors based on the luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* immobilized in polyvinyl alcohol cryogel for the monitoring of ecotoxicants. *Applied biochemistry and microbiology.* 2014. V.50. №5. P. 477.
27. Shaw J.J. et al. Use of bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment. *Applied and Environmental Microbiology.* 1992. V.58. №1. P. 267–273.
28. Wilson T., Hastings J.W. Bioluminescence. Annual review of cell and developmental biology. 1998. V.14. №1. P. 197–230.
29. Hastings J.W., Johnson C.H. Bioluminescence and chemiluminescence . *Methods in enzymology.* 2003. V. 360. P. 75–104.

30. Hastings J.W. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *Journal of Molecular Evolution*. 1983. V.19. №5. P.309–321.
31. Nealson K.H., Hastings J.W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 1979. V.43. №4. P. 406–518.
32. Haddock S.H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the sea . *Annual Review of Marine Science*. 2010. №2. P. 443–493.
33. Moline M.A. et al. Bioluminescence in the sea. *Subsea optics and imaging* . 2013. P. 134–170.
34. Young R.E. Oceanic bioluminescence: an overview of general functions. *Bulletin of Marine Science*. 1983. V.33. №4. P. 829-845.
35. Ng W.L., Bassler B.L. Bacterial quorum-sensing network architectures . *Annual review of genetics*. 2009. V.43. P. 197–222.
36. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*. 2001. V.55. №1. P. 165-199.
37. Haygood M., Allen S. Luminous bacteria. Journey to Diverse Microbial Worlds: Adaptation to Exotic Environments. 2000. P. 269-285.
38. Waters C.M., Bassler B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. V.21. P. 319–346.
39. González J.E., Keshavan N.D. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006. V.70. №4. P. 859–875.
40. Hughson F. Bacterial quorum sensing .*The FASEB Journal*. 2009. V. 23. №. 1 Supplement. P. 426.1–426.1.
41. Frische K., Schwarzbauer J., Ricking M. Structural diversity of organochlorine compounds in groundwater affected by an industrial point source . *Chemosphere*. 2010. V.81. №4. P. 500–508.
42. Kim S.K. et al. Continuous water toxicity monitoring using immobilized *Photobacterium phosphoreum*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 2003. V.8. №2. P. 147–150.

43. Hastings J.W., Nealson K.H. Bacterial bioluminescence. *Annual Reviews in Microbiology*. 1977. V.31. №1. P. 549–595.
44. Van Dyk T.K. et al. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Applied and environmental microbiology*. 1994. V.60. №5. P. 1414–1420.
45. Yates I.E., Porter J.K. Bacterial bioluminescence as a bioassay for mycotoxins. *Applied and environmental microbiology*. 1982. V.44. №5. P. 1072–1075.
46. Gellert G. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2000. V.45. №1. P. 87–91.
47. Thomulka K.W., McGee D.J., Lange J.H. Use of the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1993. V.51. №4. P. 538–544.
48. Heitzer A. et al. Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. V.60. №5. P. 1487–1494.
49. Choi S.H., Gu M.B. A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*. 2002. V.17. №5. P. 433–440.
50. Lee J.H. et al. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis . *Biosensors and Bioelectronics*. 2005. V.21. №3. P. 500–507.
51. Gil G.C. et al. A biosensor for the detection of gas toxicity using a recombinant bioluminescent bacterium. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000. V.15. №1. P. 23–30.
52. Di Lorenzo M. et al. A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters . *Water research*. 2009. V.43. №13. P. 3145–3154.

53. Choi S.H., Gu M.B. A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*. 2002. V.17. №5. P. 433–440.
54. Sakaguchi T. et al. Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells-immobilized chip. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. V.22. №7. P. 1345–1350.
55. Liu C. et al. Cell-based biosensor for measurement of phenol and nitrophenols toxicity. *Talanta*. 2011. V.84. №3. P. 766-770.
56. Belkin S. et al. A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants. *Water Research*. 1997. V.31. №12. P. 3009–3016.
57. Polyak B. et al. Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxicants: system optimization. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2001. V.74. №1. P. 18–26.
58. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 2016. V. 934. P. 22–35.
59. Reeve B. et al. How synthetic biology will reconsider natural bioluminescence and its applications. *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology*. 2014. V. 2. P. 3–30.
60. Ozawa T. *Luminescent Sensors for Single-Cell Analysis*. Progress in Photon Science. – Springer International Publishing, 2017. P. 97–107.
61. Ravikumar S. et al. Engineered microbial biosensors based on bacterial two-component systems as synthetic biotechnology platforms in bioremediation and biorefinery. *Microbial cell factories*. 2017. V. 16. №. 1. P. 62–69.
62. Thouand G., Marks R.S. (ed.). *Bioluminescent Microbial Biosensors: Design, Construction, and Implementation*. CRC Press, 2016. 219 p.

63. Park M., Tsai S.L., Chen W. Microbial biosensors: engineered microorganisms as the sensing machinery . *Sensors*. 2013. V. 13. №. 5. P. 5777–5795.
64. Xu T. et al. Microbial Indicators for Monitoring Pollution and Bioremediation. *Microbial biodegradation and bioremediation*. 2014. P. 115–132.
65. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia Magna straus* і *Ceriodaphnia affinis lilljeborg* (Cladocera, Crustacea). ДСТУ 4173-2003 (ISO 6341: 1996, MOD). К.: Держстандарт України. [Чинний від 2003-07-01]. 22 с.
66. Осмалений М.С. та ін. Комплексна оцінка токсичності водних зразків за допомогою рослинних і тваринних тест-організмів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 16. С. 74–77.
67. Nasuhoglu D. et al. Development of a Facile and High-Throughput Bioluminescence Assay Using *Vibrio fischeri* to Determine the Chronic Toxicity of Contaminated Samples. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2017. V. 98. №. 2. P. 196–203.
68. Esimbekova E.N., Kondik A.M., Kratasyuk V.A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity. *Environmental monitoring and assessment*. 2013. № 1. P. 1–8.
69. Fernández-Piñas F. et al. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms . *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology*-Volume 2. Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 65-135.
70. Johnson B.T. Bacteria in Ecotoxicology: Microtox Basic . *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. – Springer Netherlands, 2013. P. 125–136.
71. De Zwart D., Slooff W. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. *Aquatic toxicology*. 1983. V. 4. №. 2. P. 129–138.
72. Somasundaram L. et al. Application of the Microtox system to assess the toxicity of pesticides and their hydrolysis metabolites. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 1990. V. 44. №. 2. P. 254–259.

73. Jennings V.L.K., Rayner-Brandes M. H., Bird D. J. Assessing chemical toxicity with the bioluminescent *Photobacterium* (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water research*. 2001. V. 35. № 14. P. 3448–3456.

74. Katsev A.M. Utilities of luminous bacteria from the Black Sea. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2002. 38(2). P.189-192.

75. Ast J.C., Dunlap P.V. Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group. *Environmental Microbiology*. 2006. 7(10). P. 1641-1654.

76. Gretskiĭ I.A. Investigation of physiological features of luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2014. 76(3). P. 42-47.

77. Пат. 60348 UA, МПК С2 С12N1/20 Композиція для інокуляції насіння бобових рослин на основі бульбочкових бактерій та липкогена ЕПАА. Р.І. Гвоздяк, О.О. Литвинчук, Л.М. Ващенко, С.К. Воцелко, Л.А. Пасічник, Г.С. Сарібеков, В.П. Гнідець опубл.15.10.2003, Бюл. №10

78. Peters A. C., Thomas L., Wimpenny J. W. T. Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature. *FEMS microbiology letters*. 1991. V. 77. №. 2-3. P. 309-314.

79. Makiguchi N., Arita M., Asai Y. Optimum cultural conditions for strong light production by *Photobacterium phosphoreum*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 1980. V.26. №2. P. 75-84.

80. Lee B. S. et al. Statistical optimization of bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* KCTC2852. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2001. V.92. №1. P. 72-76.

81. Watanabe H. et al. Luminescence and respiratory activities of *Photobacterium phosphoreum* competition for cellular reducing power. *Journal of biochemistry*. 1975. V. 77. №. 6. P. 1147-1155.

82. Светящиеся бактерии / И.И. Гительзон, Е.К. Родичева, С.Е. Медведева и др. – Новосибирск: Наука, 1984. 279с.

83. Makiguchi N., Arita M., Asai Y. Optimum cultural conditions for strong light production by *Photobacterium phosphoreum*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 1980. V.26. №2. P. 75-84.

84. Gabriel G.V.M., Viviani V.R. Preparation and Assay of Simple Light off Biosensor Based on Immobilized Bioluminescent Bacteria for General Toxicity Assays. *Bioluminescence: Methods and Protocols*. 2016. P. 217-223.

85. Jouanneau S. et al. Main Technological Advancements in Bacterial Bioluminescent Biosensors Over the Last Two Decades. *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology*. V.3. Springer International Publishing, 2015. P. 101-116.

86. Thapa A. et al. Development of a biosensor using *Photobacterium* Spps. For the detection of environmental pollutants. *Bio-engineering for Smart Technologies (BioSMART)*, 2017 2nd International Conference. IEEE, 2017. P. 1-3.

87. McCown R.E. et al. Exploring the effect of electromagnetic fields on dinoflagellate bioluminescence. *Proceedings of MTS/IEEE*. 2005. P. 285–292.

88. Williams C.F. et al. The separated electric and magnetic field responses of luminescent bacteria exposed to pulsed microwave irradiation. *Applied Physics Letters*. 2016. V.109. №. 9. P. 93-101.

ДОДАТКИ



Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції
«Перспективи розвитку науки, освіти та технологій в контексті євроінтеграції»

СЕКЦІЯ 5. ЮРИДИЧНІ НАУКИ SECTION 5. LEGAL SCIENCES	42
<i>Потапчук В. О.</i> ОДИНИЧНІ ЗЛОЧИНИ І ЇХ ВИДИ	42
СЕКЦІЯ 6. МЕДИЧНІ НАУКИ SECTION 6. MEDICAL SCIENCES	43
<i>Зайцев В. І., Ілюк І. І., Кушнір С. В., Марчук О. А., Ежнед М. А.</i> СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА МІСЦЕ ЖУРАВЛИНИ У ЛІКУВАННІ ІНФЕКЦІЙ СЕЧОВИХ ШЛЯХІВ	43
<i>Кравченко Т. Ю., Копійка Г. К., Зарецька В. В.</i> КОМПЛЕКСНА РЕАБІЛІТАЦІЯ ДІТЕЙ З СИНДРОМОМ ПОДРАЗНЕНОГО КИШЕЧНИКА	45
<i>Титаренко О. В., Титаренко О. А., Лісовецька В. С.</i> ЕТИОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ШУМУ У ВУХАХ.....	46
<i>Суворкіна А. О.</i> ЗАСТОСУВАННЯ ГІПНОСУГЕСТИВНОЇ ТЕРАПІЇ В КОРЕКЦІЇ ТИНІТУСА	47
<i>Сивий С. М., Рожковська Н. М., Ситнікова В. О.</i> ВПЛИВ ЕНДОМЕТРІОЗУ НА ПЕРЕБІГ ВАГІТНОСТІ.....	49
<i>Тагунова І. К., Богданов К. Г., Андреев О. В.</i> РОЗВИТОК НАУКИ, МЕДИЧНОЇ ОСВІТИ В КОНТЕКСТІ ЄВРОІНТЕГРАЦІЇ	50
СЕКЦІЯ 7. ФАРМАЦЕВТИЧНІ НАУКИ SECTION 7. PHARMACEUTICAL SCIENCES	52
<i>Гавришук Л. М., Печенюк В. І.</i> МОДЕЛЮВАННЯ АНТИТОКСОПЛАЗМОЇДНОЇ АКТИВНОСТІ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК МЕТОДОМ QSAR.....	52
СЕКЦІЯ 8. БІОЛОГІЧНІ НАУКИ SECTION 8. BIOLOGICAL SCIENCES	54
<i>Григорук І. Ю.</i> ВІРУСИ, ЩО УРАЖУЮТЬ МАЛЬВУ	54
<i>Данилів С. І.</i> МЕДИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ <i>CALLISIA FRAGRANS</i> L.	55
<i>Петриченко І. І.</i> ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ БАКТЕРІЙ В БІОТЕСТУВАННІ.....	57

Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції
«Перспективи розвитку науки, освіти та технологій в контексті євроінтеграції»

<i>Якимів І. І.</i> ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЖУРАВЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ	58
СЕКЦІЯ 9. СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІ НАУКИ SECTION 9. AGRICULTURAL SCIENCES	60
<i>Дмитрик П. М.</i> ЛІКАРСЬКІ ЛІСОВІ ФІТОЦЕНОЗИ, ЯК ЕЛЕМЕНТ РОСЛИННОСТІ ПРИДНІСТРОВСЬКОГО ПОКУТТЯ	60
СЕКЦІЯ 10. ТЕХНІЧНІ НАУКИ SECTION 10. TECHNICAL SCIENCES	62
<i>Бондаренко А. О.</i> ІННОВАЦІЙНИЙ ПІДХІД ДО ОСВОЄННЯ ОБВОДНЕНИХ РОДОВИЩ НЕРУДНИХ ПІСКІВ	62
<i>Дорофєєв О. А.</i> ВИПРОБОВУВАННЯ МАТЕРІАЛІВ ІЗ ВНУТРІШНІМ ТЕРТЯМ В УМОВАХ ОСЕСИМЕТРИЧНОГО НАПРУЖЕННЯ	63
<i>Незамай Б. С.</i> МЕТОДИКА ПРОГНОЗУВАННЯ ЯКОСТІ ПРОГРАМНИХ ЗАСОБІВ	65
<i>Пилипюк Т. М.</i> ОСОБЛИВОСТІ ВИВЧЕННЯ ЛІНІЙНИХ АЛГОРИТМІВ СТУДЕНТАМИ ФІЗИКО-МАТЕМАТИЧНОГО ПРОФІЛЮ	66
<i>Кравець О. Я.</i> СТВОРЕННЯ МОРФОМЕТРИЧНИХ КАРТ НА ОСНОВІ ЦИФРОВОЇ МОДЕЛІ РЕЛЬЄФУ	67
<i>Франчук В. П., Анциферов О. В.</i> МЕТОДИКА РОЗРАХУНКУ ЗУСИЛЛЯ В ПРИВОДІ ВЕРТИКАЛЬНОГО ВІБРАЦІЙНОГО МЛИНА	69
<i>Троханяк В. І.</i> ВДОСКОНАЛЕННЯ СИСТЕМИ ВЕНТИЛЯЦІЇ У ПТАШНИКУ	71
СЕКЦІЯ 11. ІСТОРИЧНІ НАУКИ SECTION 11. HISTORICAL SCIENCES	73
<i>Шологон Л. І.</i> ДЖЕРЕЛА ОСОБОВОГО ПОХОДЖЕННЯ З ІСТОРІЇ УКРАЇНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО РУХУ ГАЛИЧИНИ ДРУГОЇ ПОЛОВИНИ ХІХ – ПОЧАТКУ ХХ СТОЛІТТЯ У ФОНДАХ АРХІВНИХ УСТАНОВ УКРАЇНИ	73

УДК 579.663.1

Петриченко І. І.

студент-магістр,

кафедра біотехнології, шкіри та хутра,

Київський національний університет технологій і дизайну

ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ БАКТЕРІЙ В БІОТЕСТУВАННІ

Люмінесценція – властивість речовини випромінювати світло під впливом збуджуючих факторів, як правило, без підвищення температури.

Біоломінесценція у видимій області спектру є загадковим природним явищем. Біоломінесценція виникає, коли окислення дрібномолекулярного люциферину каталізується ферментом люциферазою з утворенням збудженого стану, який випромінює світло. Здатність випромінювати світло у видимому спектрі характерна для живих організмів, які можна знайти на кожній гілці дерева еволюції. Водночас більшість люмінесцентних організмів населяє водні екосистеми. Біологічне значення люмінесценції для багатьох із цих організмів досі незрозуміле; а біоломінесценція продовжує приваблювати дослідників. Особливий інтерес представляє можливість використання цієї властивості для вирішення різноманітних базових і прикладних задач. Загроза підвищення рівня забруднення навколишнього середовища ставить завдання вирішити одну з важливих прикладних задач – розробку експрес-методів оцінки забруднення.

Застосування бактеріальної люмінесценції в токсикології почалося з використання сяючих бактерій для екологічного моніторингу, і вони широко використовуються досі [1-3]. Ці методи дозволили визначити забруднення навколишнього середовища шляхом порівняння інтенсивності випромінювання світла бактерій у контролі зі зразками.

Біоломінесцентний аналіз є одним з найбільш перспективних експрес-методів біологічного моніторингу навколишнього середовища, оскільки люмінесцентна система має високу чутливість навіть до мікро кількостей забруднюючих речовин. Біотести на основі бактерій, що світяться, дають інтегральну оцінку токсичності і часто перевершують інші відомі тест-системи по швидкості, точності, чутливості і простоті. Ферменти бактеріальної люмінесцентної системи також використовуються при розробці високочутливих аналітичних методів практичного призначення.

Реакція біоломінесценції зараз регулярно використовується для аналізу генів, виявлення білок-білкових взаємодій, високопродуктивного скринінгу (HTS) при відкритті ліків, гігієнічного контролю, аналізу забруднення в екосистемах і візуалізації *in vivo* у дрібних ссавців. Віддаляючись від зондування та візуалізації, останні основні моменти застосування біоломінесценції в біомедицині включають індуковане біоломінесценцією фоторозблокування малих молекул, фотодинамічну терапію на основі біоломінесценції (PDT) і використання біоломінесценції для контролю нейронів.

Люмінесцентний метод дослідження якості харчових продуктів відрізняється високою чутливістю і швидкістю аналізу та знаходить все більш широке застосування у практиці ветеринарно-санітарної експертизи і санітарно-епідеміологічного нагляду. Чутливість люмінесцентних методів досить висока у порівнянні із хімічним аналізом або абсорбційними дослідженнями. Крім того, люмінесцентний аналіз повністю відповідає вимогам експрес-методу.

При дослідженні харчових продуктів люмінесцентний аналіз можна використовувати для встановлення фальсифікації продуктів або їх відсутності. Люмінесцентний аналіз допомагає визначити початкову ступінь псування продуктів харчування. З його допомогою неважко зробити висновок про якість продуктів і, отже, попередити виникнення харчових отруєнь.

На даний момент, при збільшеному імпорті продовольства та збільшенню кількості дрібних вітчизняних виробників сільгосппродукції, цей простий і досить точний метод набуває особливої актуальності.

Для збудження люмінесценції використовують ультрафіолетові промені. При цьому відбувається поглинання короткохвильового ультрафіолетового випромінювання досліджуваною речовиною з подальшим випусканням променів з більшою довжиною хвилі (світіння досліджуваного об'єкта) [4].

Список літератури

1. Girotti, S.; Ferri, E.N.; Fumo, M.G.; Maiolini, E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Acta*, 2008, 608, 2-29.
2. Fernández-Piñas, F.; Rodea-Palomares, I.; Leganés, F.; González-Pleiter, M.; Angeles Muñoz-Martín, M. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2014, 145, 65-135.
3. Xu, T.; Close, D.; Smartt, A.; Ripp, S.; Saylor, G. Detection of organic compounds with whole-cell bioluminescent bioassays. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2014, 144, 111-151
4. Girotti, S.; Ferri, E.N.; Fumo, M.G.; Maiolini, E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Anal. Chim. Acta*, 2008, 608, 2-29.

УДК 634.73:54.06

Якимів І. І.

викладач кафедри фармацевтичного управління,
технології ліків та фармакогнозії,

Івано-Франківський національний медичний університет

ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЖУРАВЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

Плоди, особливо представників родини *Ericaceae*, належать до найкращих харчових джерел біологічно активних сполук. Вони мають типовий смак і часто володіють антиоксидантними властивостями, і тому становлять великий інтерес для дієтологів і харчових технологів. Рід *Vaccinium* родини *Ericaceae* налічує понад 450 видів у Європі, Північній Америці, Центральній Америці, Центральній та Південно-Східній Африці, Мадагаскарі, Японії та Азії [2]. Чорниця (*Vaccinium myrtillus*), брусниця (*Vaccinium vitis-idaea*) та журавлина (*Vaccinium macrocarpon*, *V. oxycoccos*) найбільше відомі і популярні ягоди цього роду.

Багато дослідників зосередили свою увагу на «великій журавлині» або «американській журавлині». (*Vaccinium macrocarpon* Aits), яка є характерною для північно-східної частини США та широко комерційно висаджена в Британській Колумбії, Канаді. Також брусниця або «кам'яна журавлина» (*Vaccinium vitis-idaea*), родом із Північної Америки та Європи, є значно менш відомою культурою. Але дотепер лише незначні дослідження стосувалися європейської журавлини (*Vaccinium oxycoccos* L.), зазвичай відомої як маленька журавлина або болотна журавлина [2].

У порівнянні з великою журавлиною, географічне поширення журавлини європейської значно ширше. Зустрічається в лісових районах Європи, Азії та Північної Америки. Цей чагарник широко промислово культивується в Росії та Естонії, а також Литві [4]. Це є вічнозелений чагарник з повзучими стеблами, що росте на торфі на низько дренуваних ділянках. В європейських умовах зазвичай зустрічається на сфагнових болотах у північно-західній частині Європейського континенту аж до Північної Азії та Японії. Журавлина дозріває в кінці серпня до вересня і може зберігатися на рослинах до весни. Ягоди мають рожевий, червоний або темно-червоний колір, сильний кислий смак і можуть бути грушоподібної, яйцеподібної, круглої, овальної, сплюсненої або циліндричної форми.



Житомирський державний університет імені Івана Франка



Університет зі столітньою історією та тисячолітніми традиціями

Міністерство освіти і науки України
Житомирський державний університет імені Івана Франка

Сертифікат

Цей документ засвідчує, що

**Петриченко Іванна
Ігорівна**

взяла участь

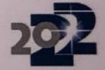
у XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції
«Біологічні дослідження – 2022»

Проректор з наукової і міжнародної роботи



Тетяна БОЦЯН

10 жовтня 2022 року
Житомир



вул. Митрофанівська, 40 м. Житомир, Україна, 10008
т.ф. +380 412 43-14-17 e-mail: zu@zu.edu.ua

СЕКЦІЯ 13. БІОТЕХНОЛОГІЯ

<i>А. Р. Баня, І. В. Семенюк, О. В. Карпенко</i> ФІТОРЕМЕДІАЦІЯ ҐРУНТУ, ЗАБРУДНЕНОГО ДИЗЕЛЬНИМ ПАЛИВОМ, З РОСЛИНАМИ, МІКРОБНИМ ПРЕПАРАТОМ ТА АКТИВАТОРАМИ	200
<i>В. С. Басюк, Ю. В. Максименко</i> СТВОРЕННЯ БІОМАТЕРІАЛІВ ШЛЯХОМ РОЗШИРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО КОДУ	202
<i>Є. А. Воронов, О. І. Сідашенко, К. І. Тимчій</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ РОДУ <i>LACTOBACILLUS</i> , ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ	204
<i>М. В. Гордієнко, Ю. В. Максименко</i> ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ У ВИГОТОВЛЕННІ КИСЛОМОЛОЧНОЇ ПРОДУКЦІЇ	206
<i>А. Г. Комісаренко, С. І. Михальська, В. М. Кіурчій, В. В. Бурлак</i> ОЦІНКА ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) ЗА ЗМІНАМИ РІВНЯ ПРОЛІНУ	207
<i>Л. С. Кушнір, Ю. В. Максименко</i> ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЙ-ПРОДУЦЕНТІВ НЕЗАМІННИХ АМІНОКИСЛОТ У БІОТЕХНОЛОГІЇ	210
<i>М. О. Маліношевська, О. А. Шидловська</i> МЕТОДИ СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК СРІБЛА ТА ЦЕРІУ	213
<i>А. В. Онофрійчук, В. В. Онофрійчук</i> ЕКОЛОГІЧНІ ТА ЕНЕРГЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВИРОБНИЦТВА БІОГАЗУ ІЗ ВІДХОДІВ ТА ПОБІЧНИХ ПРОДУКТІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ	216
<i>І. О. Перико</i> НАНОМАТЕРІАЛИ НА ОСНОВІ СИНТЕТИЧНИХ ПЕПТИДІВ: ВЛАСТИВОСТІ ТА ШЛЯХИ ЗАСТОСУВАННЯ	218

<i>I. I. Petrychenko</i>	
БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ РЕЗОНАНСНИЙ ПЕРЕНОС ЕНЕРГІЇ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ БАКТЕРІЙ	221
<i>C. П. Прилуцький</i>	
ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНОЛОГІЙ ТРАНСГЕНЕЗУ ЕУКАРІОТІВ У ГЕНЕТИЧНІЙ ІНЖЕНЕРІЇ	222
<i>A. M. Prokopalo, H. C. Sheglova, O. V. Karpenko, V. I. Lubeneць</i>	
КОМПОЗИЦІЙНІ НАНОЧАСТИНКИ РАМНОЛІПІДІВ ІЗ ТІОЕСТЕРАМИ	224
<i>M. P. Rogova, V. I. Kovalenko, I. M. Voloshina</i>	
ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТОК ОКСИДУ ТИТАНУ ТА ОКСИДУ ЦИНКУ ЯК СОНЦЕЗАХИСНИХ ФІЛЬТРІВ	226
<i>Ю. О. Хмельницька, О. А. Шидловська</i>	
ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГУ РНІВ, ВИДІЛЕНОГО З <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i>	229
<i>О. Ю. Чернобров</i>	
ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ РОСЛИН <i>MUSCARI</i> <i>ARMENIACUM LEICHTLIN EX BAKER IN VITRO</i>	231
<i>I. Petrychenko</i>	
BIO-LUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER FOR MEASURING BACTERIA LUMINESCENCE	233
СЕКЦІЯ 14. СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ПАРАЗИТОЛОГІЇ	
<i>Д. О. Ананенко, І. О. Погоріла</i>	
ЛЯМБЛІОЗ В УКРАЇНІ	235
<i>А. Ю. Філіпова, О. В. Павлюченко</i>	
ІНВАЗІЙНІ ХВОРОБИ ЛЮДИНИ ТА ЇХ ПРОФІЛАКТИКА	238
<i>Д. Р. Шербанюк, І. О. Погоріла</i>	
РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ІКСОДОВИХ КЛІЩІВ В УКРАЇНІ	240
СЕКЦІЯ 15. ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ ТА ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	

УДК 577.366

БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ РЕЗОНАНСНИЙ ПЕРЕНОС ЕНЕРГІЇ ДЛЯ ВИМІРЮВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ БАКТЕРІЙ

І. І. Петриченко

Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Немировича-Данченка, 2, Київ, 01011, Україна

Біолоюмінесценція - випромінювання світла організмом або лабораторною біохімічною системою, отриманою з організму. Для позначення аналізів, заснованих на цьому явищі, найчастіше використовується механізм біолоюмінесцентного резонансного перенесення енергії (БРЕТ) [1].

БРЕТ – це механізм, що описує передачу енергії між однією світло випромінюючою молекулою (зазвичай люциферазою) і світлочутливою молекулою (зазвичай флуоресцентним білком), і найчастіше використовується для позначення аналізів, заснованих на цьому явищі. Для вимірювання БРЕТ необхідний інструмент для вибору довжини хвилі, а для конкретних конструкцій детектора можуть знадобитися світловоди.

Різниця в інтенсивності біолоюмінесценції спостерігається в групах світних бактерій з різною рухливістю. Для вимірювання бактеріальної люмінесценції використовуються різні технічні пристрої.

Фотоелектронні помножувачі (ФЕП) служать детекторами при виявленні люмінесценції. ФЕП відрізняються за своєю чутливістю (найнижчий сигнал, який можна виявити), рівнем шуму та здатністю вимірювати інші режими виявлення. Багато люмінесцентних вимірювальних приладів постачаються з універсальним ФЕП, який зчитує люмінесценцію, а також інші режими виявлення. Їх перевагами є низькі вимоги до простору і вартості, незважаючи на високу чутливість. Можливість вимірювання дуже слабких сигналів забезпечується оптимізованими оптичними системами. Такою оптимізованою системою є оптичний тракт вільного повітря в поєднанні з оптичним модулем люмінесценції плюс, який використовується в мікропланшетних рідерах PHERAstar FSX [2].

Для деяких застосувань потрібно детектувати тільки світло певної довжини хвилі. Це досягається за допомогою оптичних фільтрів або монохроматорів, розміщених на шляху світла. Вимірювання БРЕТ потребують вибору довжини хвилі, оскільки два сигнали надходять від одного і того ж зразка. Один фільтр пропускає світло, що надходить від донорської

люциферази, а другий - світло, що надходить від акцепторного флуорофора. Це дозволяє розрізнати світло, що надходить від люциферази, і світло, що надходить від флуорофора [3].

Люмінесцентні мікропланшетні аналізи часто є більш чутливими, ніж їхні аналоги, засновані на інших механізмах. Наприклад, люмінесцентні ІФА є більш чутливими, ніж колориметричні, а люмінесцентні аналізи життєздатності є більш чутливими, ніж аналізи на основі абсорбції. Крім того, вони пропонують рішення для широкого спектру біологічних питань. Завдяки своїй чутливій природі, вони широко використовуються для високопродуктивних застосувань, які зазвичай працюють з малими об'ємами і, отже, з малими кількостями аналіту. Перевага використання люмінесценції, не пов'язаної з високотемпературною технологією, полягає в наявності гомогенних аналізів на основі принципу додавання та вимірювання, що робить аналізи легкими та швидкими для обробки. Крім того, різноманітні люмінесцентні аналізи в режимі реального часу дозволяють проводити кількісну оцінку клітинних процесів в міру їх протікання.

Література

1. Kaku T. et al. Enhanced brightness of bacterial luciferase by bioluminescence resonance energy transfer. *Scientific Reports*. 2021. №11.1. P. 1–10.
2. Peters C. Increasing throughput with dual emission AlphaLISA® assay and Simultaneous Dual Emission detection. *BioTechniques*. 2016. №60.3. P. 150.
3. Tadesse H. et al. Recent Review on Chemiluminescence Reaction, Principle and Application on Pharmaceutical Analysis. *International Scholarly Research Notices*. 2013. P. 1–12.



INTEGRATION OF SCIENTIFIC AND MODERN IDEAS INTO PRACTICE

9.	Алгухова А.В., Сагіна Ю.В. ДО ПИТАННЯ ПРО КОМП'ЮТЕРНУ ГРАФІКУ ЯК ОСНОВУ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ДАНИХ	66
10.	Алгазієва А.Д., Ібраєва Ж.Е. ПОЛИГРАФІЯЛЬК ФОЛЬГАМЕН БЕДЕРЛЕУ САПАСЫНЫҢ ТҮПТЕУ ҚАТЫРМАСЫНЫҢ КӨРСЕТКІШТЕРІНЕ ТӘУЕЛДІЛІГІ	68
11.	Данилюк М.М., Данилюк Я.В. МУЗИЧНО-КУЛЬТУРНІ ТРАДИЦІЇ СЛОБОЖАНЩИНИ ЩОДО ВИХОВАННЯ ТВОРЧОЇ МОЛОДІ	75
12.	Кушн Т.В. МИСТЕЦЬКІ ЖУРНАЛИ НІМЕЧЧИНИ: ОСОБЛИВОСТІ КОНТЕНТУ	78
13.	Новожилова П., Хізневич Р. БЛИЗЬКИЙ ПРОСТІР У ПРОЕКТУВАННІ РЕКЛАМНИХ ВЕБ- САЙТІВ	81
BIOLOGY		
14.	Нгуьhoruk I. ANALYS OF MALVA MOSAIC VIRUS	88
15.	Melnyk A. ВИКОРИСТАННЯ БІНАРНИХ ВЕКТОРІВ У СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ	90
16.	Petrychenko I., Hretskyi I. CHARACTERISTICS OF BIOTEST FOR ELECTROMAGNETIC RADIATION WITH THE PARTICIPATION OF LUMINESCENT BACTERIA PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM	93
17.	Кіричченко І.О. ОСНОВНІ ЗАСАДИ ФОРМУВАННЯ ПОНЯТТЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ В ШКІЛЬНОМУ КУРСІ БІОЛОГІЇ ТА ЕКОЛОГІЇ	95

INTEGRATION OF SCIENTIFIC AND MODERN IDEAS INTO PRACTICE

CHEMISTRY		
18.	Distanov V., Zaliska T., Klimets A., Kadochkina V. SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF 9-SUBSTITUTED 3,4-PERYLENE DICARBOXYLIC ACID	100
19.	Базалюк Л.В. МОДИФІКАЦІЯ ГУМОВОЇ КРИХТИ ПЕРОКСИДОМ ВОДНЮ	106
ECONOMY		
20.	Drobotia Y., Zadan A. УПРАВЛІННЯ КРЕДИТНИМ ПОРТФЕЛЕМ БАНКУ В РЕАЛІЯХ ДИЦІТАЛІЗАЦІЇ	111
21.	Fedko S., Kryukovska O., Gonchar R. ECONOMIC EFFICIENCY FROM LABOR PROTECTION MEASURES AT THE WATER TREATMENT PLANT	114
22.	Miashkykh I. PROBLEMS OF STRATEGIC MANAGEMENT OF COMPETITIVENESS OF POTENTIAL AND COMPETITIVE ADVANTAGES OF THE ENTERPRISE	121
23.	Улко У., MANAGEMENT OF LAND (SOIL) RESOURCES BASED ON THE DEVELOPMENT OF PROJECTS ON BIOLOGICALIZATION OF AGRICULTURAL PRODUCTION	123
24.	Ільків Л.А. СОСВІРІВНИЦТВО В УКРАЇНІ: РИЗИКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ	127
25.	Артемчук Є.А. ВПЛИВ ВІЙНИ РФ ПРОТИ УКРАЇНИ НА ФОНДОВІ РИНКИ ЄВРОПИ	131
26.	Атаманчук З.А., Машелонська А.С. РОЗВИТОК ЕЛЕКТРОННОЇ КОМЕРЦІЇ У КОНТЕКСТІ СУЧАСНИХ ІНТЕГРАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	135

**CHARACTERISTICS OF BIOTEST FOR
ELECTROMAGNETIC RADIATION WITH THE
PARTICIPATION OF LUMINESCENT BACTERIA
*PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM***

Petrychenko Ivanna,

master's student

Kyiv National University of Technologies and Design

Hretskyi Ihor,

PhD in Biology,

Associate Professor of the Department of Biotechnology, Leather and Fur
Kyiv National University of Technologies and Design

Bio luminescence intensity of luminous bacteria is an integral parameter of their metabolism which makes this phenomenon a very attractive for the use as a potential very sensitive indicator of changing environment and the presence of toxic pollutants. The advantages of the bioluminescent assays are high sensitivity, rapid response times and easy instrumental record.

There are express methods of quantitative determination of toxicity based on measuring a decrease in luminescence intensity of bacteria after addition of toxic compounds in water samples. One of the perspective directions of expansion of bioluminescent analysis is its use to assess the degree of biological action of radiofrequency electromagnetic radiation (RF-EMR).

The relevance of this problem is growing due to the constant increase in the number and diversity of sources of RF-EMR which leads to almost overall exposure of RF-EMR on living organisms.

This requires simple, high-sensitivity biological test systems that provide reproducibility of the results and are suitable for mass analyzes. Such systems include bacterial luminescent test systems that are already being used to evaluate the toxicity of various chemicals.

The IMV B-7071 strain of the luminous marine bacterium *P. phosphoreum* from the culture collection of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine was used as an object of the study.

Bacterial biomass was grown for 8 hours in liquid medium composed of (g/l): peptone - 5.0, yeast extract - 1.0, NaCl - 30.0, Na₂HPO₄ - 5.3, KH₂PO₄ x 2H₂O - 2.1, (NH₄)₂HPO₄ - 0.5, MgSO₄ x H₂O - 0.1, glycerol - 3.0 ml x L⁻¹ in 750 ml flasks with 100 ml of medium at 145 rpm and 22°C. The bacterial suspension of the same volume and concentration (V = 1 ml, 10⁷ cells/ml) was exposed to irradiation from different RF-EMR sources.

As a source of RF-EMR we used the commercial device: "Ray-11" (Medical Equipment Factory, Russian Federation). The distance between the emissivity antenna and object of influence was 5 cm. RF-EMR effect was estimated by the change in the

BIOLOGY
INTEGRATION OF SCIENTIFIC AND MODERN IDEAS INTO PRACTICE

intensity of luminescence. The control tests were carried out in the same conditions without irradiation. The exposure duration of 5 and 15 min was chosen as the most affected on bacteria luminescence changes.

Experimental luminometer setup based on photomultiplier tube (FEU-115M, 1400 V) was used to register the bioluminescence intensity. The luminescence intensity changes of the sample described as bioluminescence index - BI. BI was calculated as a ratio of the luminescence intensity of the test sample (I_t) to the luminescence intensity of the control sample (I_c):

$$BI = I_t/I_c$$

The results of the impact of RF-EMR on bacteria luminescence showed the luminescence intensity dependence on the power and exposure duration. Exposure to power of 15 W of RF-EMR led to nonlinear dependence between the luminescence intensity and the exposure duration. Luminescence intensity analysis of 5 min of irradiation of RF-EMR 15 W power revealed an increase in the intensity of luminescence by 22% in comparison with control. Upon further RF-EMR irradiation after 15 minutes from the start, it was observed a decrease in bioluminescence by 67% in comparison with control.

The marked dependence demonstrated the effects of stimulation and inhibition of luminescence intensity under RF-EMR influence on bacteria. These data demonstrate significant changes in the luminescence intensity under the action of power 15 W due to heating of the medium.

The use of solid medium IMV B-7071 for cultivation of *P. phosphoreum* allowed to monitor changes in the intensity of bacterial luminescence in optimal conditions for their development. The results obtained in the course of this work indicate that the luminescence dependence characteristic of *P. phosphoreum* cells can be expressed through the equation of a linear curve

$$BI = 1.18 - 0.04 EN,$$

The dynamic range of the biosensor was the distance between 4.5 kJ and 23.0 kJ of energy load in which it is possible to determine the effect of RF-EMR.

The sensitivity coefficient was defined as the ratio of the absolute change in the bioluminescent index to the increase in the energy load of the impact:

$$\alpha = 0.04 \text{ kJ}^{-1}$$

Under the specified exposure, the RF-EMR detection limit was defined as the energy load that causes a change of 0.20 units of the bioluminescent index. For EMR of the UHF bands with a power of 15 W, the detection limit was 4.5 kJ.

In the study, the shortest time for measuring a significant change in BI was 5 minutes.

Long-term stability is a characteristic of the receptor element itself and depends on the physiological state and method of cell immobilization. Long-term stability characterizes the stability of the sensor over a long period of time.

Thus, as shown in our study, luminescence intensity of *P. phosphoreum* IMV B-7071 bacterial cells is an indicator of the RF-EMR biotropic impact that can be used to create a biosensor device for biological evaluation of non-ionizing electromagnetic radiation.



publisher.agency

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

THIS TO CERTIFY THAT

Ivanna Petrychenko

master's student, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine

HAS PARTICIPATED WITH THE PAPER ENTITLED

**Biotesting of Radiofrequency Electromagnetic Radiation on Photobacterium
phosphoreum Luminescence**

at the 1st International Scientific Conference «Academics and Science Reviews Materials»
(November 10-11, 2022). Helsinki, Finland

Chief Editor Sari Selänne

12 November 2022

Biotesting of Radiofrequency Electromagnetic Radiation on *Photobacterium phosphoreum* Luminescence

Ivanna Petrychenko

master's student, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine

Ihor Hretskyi

PhD, Associate Professor of the Department of Biotechnology, Department of Biotechnology, Leather and Fur, Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, Ukraine

Bacterial bioluminescence is a reaction of luminous bacteria that involves a luciferase-catalyzed oxidation caused by action of an enzyme called bacterial luciferase, encoded by *lux* gene [1]. Bioluminescence intensity of luminous bacteria is an integral parameter of their metabolism which makes this phenomenon a very attractive for the use as a potential very sensitive indicator of changing environment and the presence of toxic pollutants [2]. The advantages of the bioluminescent assays are high sensitivity, rapid response times and easy instrumental record [3].

There are express methods of quantitative determination of toxicity based on measuring a decrease in luminescence intensity of bacteria after addition of toxic compounds in water samples [4-6]. One of the perspective directions of expansion of bioluminescent analysis is its use to assess the degree of biological action of radiofrequency electromagnetic radiation (RF-EMR) [7, 8].

The relevance of this problem is growing due to the constant increase in the number and diversity of sources of RF-EMR which leads to almost overall exposure of RF-EMR on living organisms.

This requires simple, high-sensitivity biological test systems that provide reproducibility of the results and are suitable for mass analyzes. Such systems include bacterial luminescent test systems that are already being used to evaluate the toxicity of various chemicals [9].

The IMV B-7071 strain of the luminous marine bacterium *P. phosphoreum* from the culture collection of the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine was used as an object of the study.

Bacterial biomass was grown for 8 hours in liquid medium composed of (g/l): peptone - 5.0, yeast extract - 1.0, NaCl - 30.0, Na₂HPO₄ - 5.3, KH₂PO₄ x 2H₂O - 2.1, (NH₄)₂HPO₄ - 0.5, MgSO₄ x H₂O - 0.1, glycerol - 3.0 ml x L⁻¹ [10] in 750 ml flasks with 100 ml of medium at 145 rpm and 22°C. The bacterial suspension of the same volume and concentration (V = 1 ml, 10⁷ cells/ml) was exposed to irradiation from different RF-EMR sources.

As a source of RF-EMR we used the commercial devices: "Ray-11" (Medical Equipment Factory, Russian Federation). The distance between the emissivity antenna and object of influence was 5 cm. RF-EMR effect was estimated by the change in the intensity of luminescence. The control tests were carried out in the same conditions without irradiation. The exposure duration of 5 and 15 min was chosen as the most affected on bacteria luminescence changes.

Experimental luminometer setup based on photomultiplier tube (FEU-115M, 1400 V) was used to register the bioluminescence intensity. The luminescence intensity changes of the sample

«Academics and Science Reviews Materials» (November 10-11, 2022). Helsinki, Finland

described as bioluminescence index - BI [11]. BI was calculated as a ratio of the luminescence intensity of the test sample (I_t) to the luminescence intensity of the control sample (I_c):

$$BI = I_t/I_c.$$

To assess influence of RF-EMR on *Photobacterium phosphoreum*, luminescence intensity was analyzed after irradiation (under different RF-EMR bands). Bacterial cells were exposed to VHF EMR, UHF EMR power of 15 W and EHF EMR power of 100 μ W for 15 min. The results of the impact of RF-EMR on bacteria luminescence showed the luminescence intensity dependence on the power and exposure duration

Exposure to power of 15 W (VHF and UHF EMR) led to nonlinear dependence between the luminescence intensity and the exposure duration. Luminescence intensity analysis of 5 min of irradiation of VHF EMR 15 W power revealed an increase in the intensity of luminescence by 22% in comparison with control. The 15 min treatment with VHF EMR resulted in significant decrease up to 68% the luminescence intensity in comparison with control.

The similar tendency was observed after exposure to UHF. 5 min UHF EMR influence with 15 W power on bacterial cells led to an increase in luminescence intensity by 45% from the baseline. Upon further UHF EMR irradiation after 15 minutes from the start, it was observed a decrease in bioluminescence by 67% in comparison with control.

The marked dependence demonstrated the effects of stimulation and inhibition of luminescence intensity under RF-EMR influence on bacteria. These data demonstrate significant changes in the luminescence intensity under the action of power 15 W due to heating of the medium.

The use of a solid medium for the cultivation of *P. phosphoreum* IMV B-7071 made it possible to monitor changes in the intensity of bacterial luminescence under optimal conditions for their development. The results obtained in the course of this work indicate that the dependence of luminescence characteristic of *P. phosphoreum* cells can be expressed through the equation of a linear curve:

$$BI = 1.18 - 0.04 * EMR \text{ Energy},$$

The dynamic range of the biosensor was the distance between 4.5 kJ and 23.0 kJ of energy load in which it is possible to determine the impact of RF-EMR.

The sensitivity coefficient was determined as the ratio of the absolute change in the bioluminescence index to the increase in the energy load of the impact:

$$\alpha = 0.04 \text{ kJ}^{-1}$$

At the specified exposure, the EMF detection limit was defined as the energy load that causes a change of 0.20 units of the bioluminescence index. For EMR VHF and UHF bands with a power of 15 W, the detection limit was 4.5 kJ.

In the study, the shortest time to measure a significant change in BLI was 5 minutes. Long-term stability is a characteristic of the receptor element itself and depends on the physiological state and method of cell immobilization. Long-term stability characterizes the stability of the sensor's operation over a long period of time.

Thus, as shown in our study, luminescence intensity of *P. phosphoreum* IMV B-7071 bacterial cells is an indicator of the RF-EMR biotropic impact that can be used to create a biosensor device for biological evaluation of non-ionizing electromagnetic radiation.