

# МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ МОНІТОРИНГУ ЗМІН ІНТЕНСИВНОСТІ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

Невгад В.В.<sup>1</sup>, Грецький І.О.<sup>2</sup>, Громозова Е.Н.<sup>2</sup>, Горго Ю.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, [evleria18283848@gmail.com](mailto:evleria18283848@gmail.com), [yugorgo@ukr.net](mailto:yugorgo@ukr.net)

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України

**Вступ.** Існує багато праць, що варіації геомагнітного поля мають високу ступінь подібності з динамікою змін багатьох мікробіологічних та клітинних систем та процесів, особливо під час магнітних бур [1]. Використання мікробіологічних біосенсорів за моніторингу геомагнітної активності дає змогу дослідити різні біологічні ефекти під час варіацій геомагнітного поля та для біотестування дії неіонізуючого електромагнітного випромінювання [2]. Тому біодатчики з використанням люмінесценції бактерій привертають особливу увагу, оскільки люмінесценція є ферментативним процесом, пов'язаним із загальним метаболізмом клітини, який реагує на зміни навколишнього середовища [3]. Попередньо проведені експериментальні дослідження зв'язків між геомагнітною активністю й інтенсивністю люмінесценції бактерій *Photobacterium phosphoreum* показали статистично значущу зворотну залежність з коефіцієнтом кореляції  $R = -0,51$  ( $p < 0,01$ ) [4]. Проте вивчення специфічного впливу геомагнітного поля на інтенсивність бактеріальної люмінесценції вимагає автоматизованих тривалих паралельних вимірювань в реальному часі і в єдиному просторі [5].

Метою даної роботи є розробка методики проведення моніторингу змін інтенсивності люмінесценції *Photobacterium phosphoreum* IMV В-7071 для співставлення з одночасним моніторингом флуктуацій геомагнітного поля.

**Матеріали та методи.** В ферментері використано штам морських бактерій *P. phosphoreum*, здатних до світіння. Штам зареєстровано в депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України під номером IMV В-7071. Даний штам був виділений з чорноморського катрана *Squalus acanthias*. Культивування люмінесцентних бактерій проводили на щільному поживному середовищі такого складу (г/л): пептон – 5,0; дріжджовий екстракт – 1,0; NaCl – 30,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 5,3; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O – 2,1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5; MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O – 0,1; гліцерин – 3,0 мл/л, агар-агар – 20 г/л, вода дистильована – до 1 л, рН 7,6 [5]. В ферментері використовували добову культуру мікроорганізмів, вирощену на твердому поживному середовищі та поміщену в світлозахисний термостат.

Розроблена методика виміру інтенсивності люмінесценції передбачає приготування суспензії бактеріальних клітин, яку поміщали в хімічний стакан та розміщували під об'єктивом фотолюмінометру [5]. Отриманий сигнал підсилювали та реєстрували за допомогою мультиметру UK-830LN. Вимірювання біолюмінесценції бактерій проводили через 5 хвилин після встановлення зразку під об'єктивом приладу. Дослідження інтенсивності

світіння бактерій відбувалося в темній кімнаті. На першому етапі проводили вимір рівня "темного сигналу" фотопомножувача –  $U_0$ , потім під об'єктив поміщали зразок з бактеріями і вимірювали сигнал від зразку з бактеріями *Photobacterium phosphoreum* –  $U_1$ . Інтенсивність сигналу від зразку з бактеріями перевершувала рівень "темного сигналу", як правило, більш ніж в два рази. Для подальшого аналізу використовували різницю сигналів  $U = U_1 - U_0$ , який був пропорційний інтенсивності бактеріального світіння. Для оцінки інтенсивності люмінесценції використовували фотопомножувач ФЕП-115. Для статистичної обробки набору даних інтенсивності біоломінесценції бактерій було використане програмне забезпечення Microsoft Office Excel 2010.

Проте вивчення інтенсивності бактеріальної люмінесценції цим методом дозволяло вимірювати біоломінесценцію за незначні проміжки часу [4].

**Результати та обговорення.** Для розроблення методики довготривалого вимірювання інтенсивності біоломінесценції культури бактерій за варіювання інтенсивності геомагнітного поля було досліджено залежність бактеріальної люмінесценції від зміни температури, рН поживного середовища, концентрації NaCl та культивування на синтетичному і гелевому середовищах. Відмічено, що максимальний рівень світіння спостерігався в діапазоні температур від 10 до 28 °C і рН від 5,5 до 9,1. У разі підвищення температури вище 28 °C чи зміни рН середовища відзначено значне зниження світіння, а у разі досягнення 35 °C спостерігали необоротну втрату люмінесценції. Для отримання достовірного результату при довготривалих експериментальних вимірах біоломінесценції було проведено визначення умов стандартизації поживного середовища з параметрами: рН = 7,6; t = 20 °C.

Для розроблення методики довготривалого вимірювання було проведено визначення умов стабілізації експериментальних вимірів шляхом вибору об'єму та кількості клітин досліджуваної суспензії люмінесцентних бактерій. Оскільки кисень є фактором стабільності прояву фонові люмінесценції бактерій, було з'ясовано, що кількість його у пробі визначає вибір об'єму проби та оптичної густини суспензії. Для цього кожен зразок послідовно розводили та отримали серію проб з різною кількістю клітин. Отримані бактеріальні суспензії досліджували на фотолюмінометрі, і було визначено, що для довготривалого вимірювання інтенсивності біоломінесценції доцільно використовувати суспензії об'ємом 3 мл з оптичною густиною 0,1 (670 нм).

Для апробації методу моніторингових досліджень біоломінесценції було створено комплекс для безперервного культивування бактерій *P. phosphoreum* з урахуванням визначених умов стандартизації поживного середовища та об'єму і оптичної густини суспензій. Комплекс складається з культиватора, допоміжної системи безперервної доставки та забору культуральної рідини у вигляді системи трубок, насоса та ємності з поживним середовищем. Система трубок та насос дають змогу проводити перекачку поживного середовища в культиватор, а також подачу культуральної рідини з культиватора на промисловий цифровий мультиметр UNI-T.

Кількісну оцінку інтенсивності люмінесценції бактерій проводили за допомогою фотоелектронного помножувача ФЕП-115 та пристрою для дослідження швидкоплинних процесів і зчитування графічної інформації з сур'мяно-натрієво-цезієвим фотокатодом. Виміри інтенсивності люмінесценції культури бактерій проводили з частотою 1 Гц, з подальшим розрахунком їх середніх похвилинних значень. Вибір такої технології реєстрації пов'язаний з метою досягнення максимальної чутливості до змін інтенсивності біолюмінесценції. В технологічній схемі такого комплексу використано промисловий цифровий мультиметр UNI-T UT171A (№160413239), що дало можливість використати персональний комп'ютер для безперервної реєстрації даних. Розроблена методика моніторингу змін інтенсивності люмінесценції *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071 дозволяє співставляти отримані значення з даними моніторингу флуктуацій геомагнітного поля в реальному режимі на протязі 6-7 годин.

**Висновки.** Попередньо проаналізовані сумісні в часі зміни геомагнітної активності та інтенсивності люмінесценції бактерій показали наявність впливу цього геофізичного фактору на прокаріотичні організми.

Практичний інтерес викликає можливість використання моніторингу люмінесценції бактерій для прогнозування збурень геомагнітного поля та розвитку магнітних бур.

### **Список використаної літератури:**

1. Особливості функціонування біологічних об'єктів за дії низькочастотних магнітних полів різного походження / Ю. Горго та ін. *Вісник КНУ. Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2005. Т. 10. С. 28–31.
2. Microorganisms As A Model System For Studying The Biological Effects Of Electromagnetic Non-Ionizing Radiation / E. Gromozova et al. *Safety Engineering*. 2012. Vol. 2, no. 2. P. 89–92.
3. Дроздов А., Громозова Е., Грецький І. Аналіз динаміки інтенсивності біолюмінесценції світлових бактерій *Photobacterium phosphoreum*. *Біофізика*. 2015. Т.60, № 2. С. 316–321.
4. Gorgo Y., Gretskey I., Demydova O. The Use of Luminous Bacteria *Photobacterium phosphoreum* as a Bioindicator of Geomagnetic Activity. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2018. Vol. 2, no. 4. P. 271–277. URL: <https://doi.org/10.20535/ibb.2018.2.4.151459>
5. Грецький І., Громозова О., Воцелко С. Використання композицій полісахаридів мікробного походження для культивування люмінесцентних бактерій *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071. *Наук. записки Тернопільського національного педуніверситету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*. 2017. № 2. С. 46–51.