

УДК 541.13:577.112.087

# БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНІ БАКТЕРІЇ ЯК СЕНСОРНІ ЕЛЕМЕНТИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

А. М. Задорожня

Т. Г. Грузіна

С. М. Дибкова

З. Р. Ульберг

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

E-mail: tgruzina@mail.ru

Виявлено дозозалежний ефект інгібування іонами золота інтенсивності природної люмінесценції штаму *Photobacterium phosphoreum* B7071 ( $lux^+$ ). Клітини цих бактерій можуть слугувати сенсорним елементом біоломінесцентного аналізатора для визначення вмісту іонного золота, наприклад у стічних водах золотодобувних та золотопереробних підприємств, з метою контролю додержання технологічних процесів.

У результаті кон'югативного схрещування отримано клітини транскон'югату *Pseudomonas fragi* T2(5), що містять гібридну плазмиду ( $Zn^Rlux^+$ ) і здатні високоспецифічно випромінювати світло під час контакту з іонами цинку. Це уможливує використання їх як чутливого елемента в біоломінесцентному високоспецифічному визначенні якісного та кількісного вмісту цього металу в об'єктах довкілля.

**Ключові слова:** бактерії, природна біоломінесценція, індукована біоломінесценція, визначення, золото, цинк, кон'югативне схрещування.

Однією з основних проблем швидкої індустріалізації є значне підвищення вмісту важких металів та їхніх сполук у ґрунтах, природних водоймах і стічних водах промислових підприємств. Залучення цих забруднювачів до трофічної ланки може стати причиною виникнення тяжких захворювань людини [1–3]. Той факт, що важкі метали здатні, навіть у мікроконцентраціях, призводити до локальних порушень цілісності ДНК, робить їх особливо небезпечними [4].

Відомо декілька «рядів небезпеки» іонів важких металів. До одного з найбільш небезпечних для біосфери належать: Au, Ag, Zn, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb, Sb, Sn, Te, W [5]. Тож за сучасних умов розвитку промисловості та стану очисних споруд постійний моніторинг об'єктів довкілля, зокрема водного середовища, з метою контролю вмісту цих забруднювачів є вкрай актуальним завданням.

Найпоширенішими методами визначення важких металів є атомна абсорбція, рентгенівська та емісійна спектроскопія [6, 7]. Однак ці методи є високовартісними, потребують багато часу й, окрім цього, не спроможні визначити саме токсичну частку забруднювача, оскільки відомо, що важкі метали можуть утворювати стійкі комплекси з природними сполуками, які, у свою чергу, не виявляють токсичної дії на біосистеми.

Усіх цих недоліків позбавлені біосенсорні аналітичні системи для визначення вмісту важких металів, у яких сенсорним елементом слугує бактеріальна біоломінесценція. До основних переваг клітинних біосенсорних аналізаторів слід віднести високу чутливість, здатність до визначення біотоксичної частки забруднювача, специфічність, швидкість реакції-відповіді, простоту використання, економічність [8].

Окрім використання як аналітичного сигналу природної здатності бактерій до біоломінесценції, останнім часом набуває стрімкого розвитку напрям зі створення високоспецифічних генетично модифікованих штамів, здатних до індукованої біоломінесценції певними важкими металами [9–12].

З огляду на вищезазначене метою роботи було розроблення сенсорних елементів для визначення іонів важких металів в об'єктах довкілля на основі природних та генетично модифікованих біоломінесцентних штамів бактерій.

## Матеріали і методи

Для створення сенсорних елементів було використано бактеріальний штам *Photobacterium phosphoreum* B7071 ( $lux^+$ ) із колекції морських люмінесцентних бактерій

Кримського медичного інституту ім. С. І. Георгієвського та штаму *Pseudomonas fragi* T2(5) із колекції Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України.

Вплив іонів важких металів на інтенсивність природної біоломінесценції клітин вивчали на штамі *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*<sup>+</sup>). Бактеріальні клітини цього штаму культивували протягом 16–18 год при 22 °С у живильному середовищі такого складу (г/дм<sup>3</sup>): пептон — 5; дріжджовий екстракт — 5; NaCl — 30; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 15; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,5; MgSO<sub>4</sub> — 0,1; CaCO<sub>3</sub> — 0,2; гліцерол — 3 мл/л.

Концентрацію клітин контролювали спектрофотометрично (спектрофотометр СФ-46, «Ломо», Росія) за довжини хвилі 640 нм.

Для аналізу було використано три метали у різних концентраціях: цинк, кобальт та золото. Цинк та кобальт застосовували у вигляді солей: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O та CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O кваліфікації ч.д.а. виробництва Merck (Німеччина), готуючи вихідні 1 М розчини. Золото використовували у формі золотохлористоводневої кислоти (HAuCl<sub>4</sub>) (Sigma, США), з вихідною концентрацією 60 мкг/мл за металом.

Клітини бактерій перед аналізом осаджували із середовища росту центрифугуванням (6 000 об/хв, 10 хв) та ресуспендували в середовищі А такого складу: 50 мМ трисамінометанмалат-NaOH буфер, 2,5% NaCl, рН 7 до кінцевої концентрації (*D*<sub>640</sub> = 0,5), що відповідає 1·10<sup>6</sup> кл/мл або 0,5 мг/мл сухої маси.

Інтенсивність біоломінесценції бактерій *Ph. phosphoreum* B7071 реєстрували на експериментальному хемілюмінометрі при температурі 23 °С. Хемілюмінометр являє собою комп'ютер, у корпус якого вмонтовано вимірювальну комірку, яка контактує з фотопомножувачем (вимірювальний модуль). Реєстрацію біоломінесценції та обробку отриманих даних проводили за допомогою спеціально розробленої програми. Прилад дозволяє визначати біоломінесценцію в кінетичному режимі з реєстрацією відгуку через кожні 5–10 с. Контролем слугували суспензії клітин, які не містили важких металів.

Для вивчення впливу іонів важких металів на інтенсивність біоломінесценції бактерій *Ph. phosphoreum* B7071 у кюветі хемілюмінометра змішували 0,8 мл суспензії вихідних клітин у середовищі А та відповідні аліквоти металів. Об'єм проби становив 1 мл, час інкубації — 30 хв, час виміру — 10 с. Обраний час інкубації був оп-

тимальним для прояву інгібуючого впливу ксенобіотиків на біоломінесценцію [13].

Для дослідження кінетики інгібування люмінесценції важкими металами 10 мл суспензії клітин у середовищі А, що містять відповідні концентрації металу, інкубували в колбах на магнітній мішалці. При цьому через певні проміжки часу відбирали проби по 1 мл і вимірювали інтенсивність їхньої біоломінесценції.

Штам *Pseudomonas fragi* T2(5) було виділено з дерново-підзолистого ґрунту, забрудненого важкими металами (промисловий район м. Києва), охарактеризовано за культурально-біохімічними ознаками та рівнем стійкості до важких металів з використанням методу посіву на агаризованому трис-мінімальному глюконатвмісному середовищі з концентрацією металів: Zn — 0,8–2 мМ, Co — 1–2 мМ, Ni — 0,8–2 мМ, Cu — 0,8–1 мМ, Cd — 0,8 мМ, CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> — 0,20–0,25 мМ; а також на багатому середовищі з концентрацією металів: Zn — 3–10 мМ, Co — 3–4 мМ, Ni — 3–5 мМ, Cu — 1–2 мМ, Cd — 1 мМ.

Аналітично чисті солі важких металів — ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (Merck, Німеччина) готували у вигляді 1М стокових розчинів, стерилізували автоклавуванням та додавали у середовища після їх стерилізації.

Аналіз плазмідної ДНК штамів бактерій проводили за методом Екгардта [14]. Виділення плазмідної ДНК здійснювали лужним лізисом за методом Бірнбойма–Долі [15]. RAPD-аналіз плазмідних ДНК виконували за методом [16] з використанням праймерів ОРА-06 та ОРР-12. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) тривала 45 циклів (94 °С — 40 с; 35 °С — 40 с; 72 °С — 1 хв 30 с). Електрофорез плазмідних ДНК здійснювали в 0,8%-му агарозному гелі відповідно до методики [17].

Як стандарт для визначення розміру плазмід використовували нативну ДНК фага λ.

З метою кон'югативного схрещування застосовували прекультури штамів *Ps. fragi* T2(5) та *Ph. phosphoreum* B7071, які вирощували протягом 14 год у 5 мл рідкого живильного середовища Luria–Bertani (LB-бульйону). Клітини кожної культури осаджували центрифугуванням (6 000 об/хв, 10 хв), ресуспендували в 5 мл 0,01 М розчині MgSO<sub>4</sub>. Схрещування проводили на LB-агарі, змішуючи по 100 мкл суспензій донора та реципієнта з густиною 10<sup>8</sup> кл/мл. Культивували протягом 5 год при 28 °С, після чого висівали на селективне трис-мінімальне глюконатвмісне середовище з додаванням 20 мкг/мл тетрацикліну, 0,3 мМ Zn та 3% NaCl. Як

контроль на це саме середовище висівали клітини донора та реципієнта. Результати кон'югативного схрещування аналізували після культивування культур протягом 24 год при 28 °С.

Для підтвердження наявності генів ( $Zn^{lux+}$ ) у гібридній плазміді одержаних транскон'югатів проводили її елімінацію з використанням інтеркалюючого барвника — бромистого етидію [18, 19], кінцева концентрація якого в середовищі становила 100 мкг/мл.

Тестування елімінантів на чутливість до іонів цинку здійснювали шляхом висівання на трис-мінімальне середовище з концентрацією цинку 0,1–1,0 мМ.

Інтенсивність металіндукованої біоломінесценції клітин штаму-транскон'югату оцінювали за описаною раніше методикою [20].

У роботі було використано трис-гідроксиметиламінометан (Gibco BRL, Шотландія); LB-середовище, пептон, глюконат Na, дріжджовий екстракт, агарозу, бромистий етидій (Sigma, США); праймери: OPA-06 и OPP-12 (Oregon LTD, США). Інші реактиви були вітчизняного виробництва, кваліфікації х. ч. та ч. д. а.

Статистичну обробку результатів експерименту здійснювали згідно [21] з використанням критерію Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

### Результати та обговорення

Можливість розроблення сенсорних елементів з використанням природної та індукованої здатності бактеріальних клітин реагувати на присутність забруднювачів зміною інтенсивності люмінесценції інтенсивно вивчається останнім часом [22].

Нами було проведено комплексні дослідження щодо можливостей розроблення сенсорних елементів з використанням як аналітичного сигналу зміни інтенсивності біоломінесценції мікроорганізмів під дією важких металів в іонному стані.

Було вивчено вплив іонів важких металів на інтенсивність природної люмінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071.

Показано, що іони важких металів (Zn, Co та Au) справляють інгібуючий вплив на біоломінесценцію клітин досліджуваного штаму. При цьому встановлено, що найбільш виражена концентраційно-залежна здатність інгібувати інтенсивність люмінесценції бактеріальних клітин притаманна іонам золота: чутливість штаму до дії золота в іонному стані у концентрації 1 та 2,5 мкМ була значно більш вираженою, ніж чут-

ливість до дії іонів Zn та Co у максимально діючій концентрації — 100 мкМ (рис. 1).

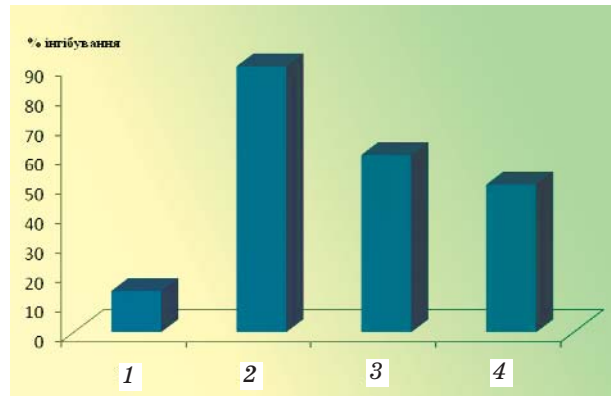


Рис. 1. Ступінь інгібування природної люмінесценції клітин *Photobacterium phosphoreum* B7071 ( $lux^+$ ) іонами важких металів:

1 — іони Au концентрацією 0,2 мкг/мл (1,0 мкМ);  
2 — іони Au концентрацією 0,5 мкг/мл (2,5 мкМ);  
3 — іони Zn концентрацією 100 мкМ;  
4 — іони Co концентрацією 100 мкМ

Дослідження особливостей впливу іонного золота на біоломінесцентний штам *Ph. phosphoreum* B7071 дозволили встановити, що вже при концентрації 0,12 мкг/мл (0,6 мкМ) за металом відбувалося інгібування бактеріальної люмінесценції більш ніж утричі порівняно з контролем (рис. 2). Це свідчить про значний токсичний вплив іонів Au на процеси життєдіяльності клітин досліджуваного штаму.

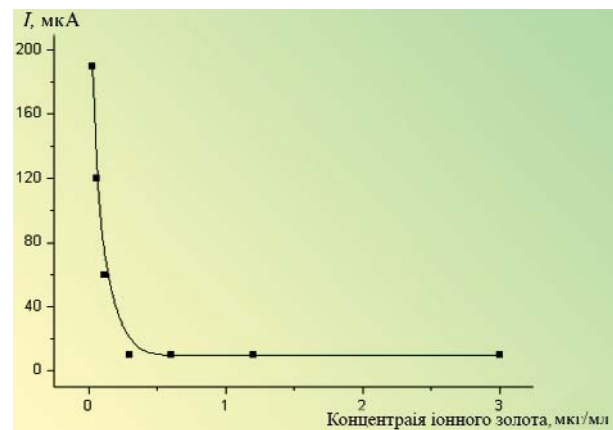


Рис. 2. Вплив іонного золота на інтенсивність біоломінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071

Висока концентраційно-залежна чутливість штаму *Ph. phosphoreum* B7071 до впливу іонного золота свідчить про можливість використання його як сенсорного елемента при створенні біосенсорів для визначення вмісту іонів золота у водних середовищах.

На користь такої можливості вказують також результати, що їх одержано під час вивчення особливостей кінетики процесу взаємодії іонного золота з клітинами штаму *Ph. phosphoreum* B7071. Кінетичні криві гасіння інтенсивності бактеріальної люмінесценції іонами золота за двох різних значень концентрації (рис. 3) показують «швидку» кінетику цього процесу: протягом 10 хв рівень гасіння біоломінесценції досягав максимального значення і подальше збільшення часу інкубації не впливало на його хід.

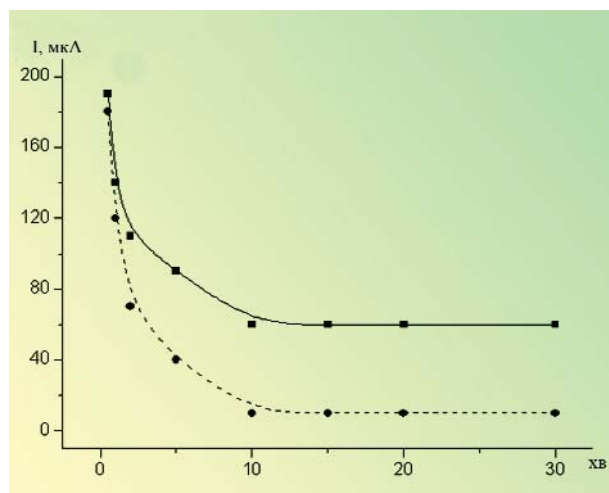


Рис. 3. Кінетика гасіння біоломінесценції *Ph. phosphoreum* B7071 іонами золота за концентрацій (мкг/мл): 0,12 (■) та 0,3 (●)

Таким чином, отримані результати підтверджують можливість застосування ефекту інгібування іонами золота інтенсивності природної біоломінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071, використаного як сенсорний елемент біоломінесцентного аналізатора для визначення вмісту іонного золота у водному середовищі.

Для подальших досліджень щодо розроблення сенсорних елементів значний інтерес становить штам *Ps. fragi* T2(5). Вивчення стійкості клітин цих бактерій до низки іонів важких металів (Zn — 0,8–2 мМ, Со — 1–2 мМ, Ni — 0,8–2 мМ, Cu — 0,8–1 мМ, Cd — 0,8 мМ, CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> — 0,20–0,25 мМ) виявило, що штам *Ps. fragi* T2(5) характеризувався високим рівнем резистентності тільки до іонів цинку (таблиця).

Звичайні концентраційні межі біодоступних металів становлять 0,5–20 мМ [23, 24], тож рівень стійкості штаму *Ps. fragi* T2(5) на мінімальному (2,0 мМ) та багатому (10,0 мМ) середовищах є досить високим.

З метою визначення генетичної детермінації стійкості до іонів цинку штаму *Ps. fragi* T2(5) проведено експерименти з виділення та аналізу плазмідної ДНК.

**Ріст бактерій *Pseudomonas fragi* T2(5) у присутності іонів цинку**

| Живильне середовище                       | Вміст Zn |        |         |
|---|----------|--------|---------|
|   | 0,8 мМ   | 1,0 мМ | 2,0 мМ  |
| Трис-мінімальне глюконатвмісне середовище | ++       | ++     | +–      |
| LB-середовище                             | 3,0 мМ   | 5,0 мМ | 10,0 мМ |
|   | ++       | ++     | +–      |

Примітка: «++» — інтенсивний ріст;  
«+–» — помірний ріст.

Встановлено, що клітини досліджуваного штаму містять плазмиду розміром близько 50 т.п.н. (рис. 4, доріжка 2). Як маркер розміру плазмід було використано препарат ДНК фага λ (рис. 4, доріжка 1).

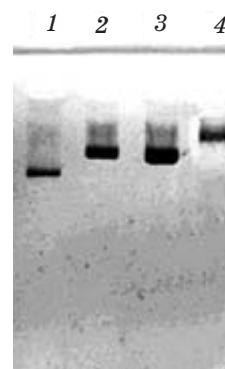


Рис. 4. Розділення плазмід штамів бактерій у 0,8%-му агарозному гелі:

- 1 — маркер молекулярної маси — нативна ДНК фага λ (47 т.п.н.);
- 2 — плазміда штаму *Ps. fragi* T2(5) (Zn<sup>R</sup>);
- 3 — плазміда штаму *Ph. phosphoreum* B7071;
- 4 — плазміда штаму *Ps. fragi* T2(5) (Zn<sup>R</sup> lux<sup>+</sup>)

Причетність виділеної плазмідної ДНК до детермінації стійкості до іонів цинку було виявлено в результаті експериментів з елімінації цієї плазміди з подальшою перевіркою резистентності клітин-елімінантів штаму *Ps. fragi* T2(5) до цинку. Для цього 15-ту генерацію культури бактерій, культивування якої проводили на багатому середовищі без вмісту іонів цинку (виключений селективний тиск на бактерії з боку металу), ресуспендували у 10 мМ розчині MgSO<sub>4</sub> та висівали, використовуючи десятикратні розведення, на агаризовані багаті та мінімальні середовища, що містили іони цинку різної концентрації. У результаті було встановлено, що культура втрачала здатність до росту в присутності 0,6 мМ іонів цинку на мінімальному глюконатвмісному середовищі та 1 мМ — на багатому LB-середовищі. Таким чином, виявлена плазміда є генетичною детермінантою стійкості штаму *Ps. fragi* T2(5) до іонів цинку.

Плазмідний характер резистентності цього штаму до іонів цинку уможливорює використання його в експериментах з генетичною модифікацією з метою отримання транскон'югатів з гібридними плазмідами ( $Zn^R lux^+$ ).

Як донори *lux*-генів було використано клітини штамів *Ph. phosphoreum* B7071. За даними електрофорезу носієм *lux*-генів у цьому штамі є плазмід розміром 50 т. п. н. (рис. 4, доріжка 3). Фенотиповою ознакою цього штаму є здатність до росту в присутності 3%-го розчину NaCl.

Контрольні посіви виявили, що клітини штаму *Ps. fragi* T2(5) не здатні рости на середовищі, яке містить 3%-й NaCl, а присутність іонів цинку в концентрації 0,3 мМ пригнічувала ріст клітин *Ph. phosphoreum* B7071.

Для одержання *lux*-фенотипу штаму з індукованою іонами цинку біолоюмінесценцією застосовували класичний метод кон'югативного схрещування між бактеріями штамів *Ph. phosphoreum* B7071 та *Ps. fragi* T2(5) з подальшою селекцією отриманих транскон'югатів за ознаками стійкості до іонів цинку та високої концентрації NaCl.

Одержаним у результаті процесу кон'югативного схрещування клітинам транскон'югату була притаманна набута здатність до люмінесценції, що є доказом наявності *lux*-генів у гібридній плазміді.

Дослідження вектора переносу генетичного матеріалу свідчать про те, що перенесення *lux*-генів відбулось у клітини *Ps. fragi* T2(5): ріст клітин транскон'югату спостерігався на середовищі, яке містить 0,3 мМ цинку, але не містить 3%-го NaCl.

Для підтвердження цього факту було проведено скринінг плазмід клітин отриманого транскон'югату за методом Екгардта. В результаті експерименту в генетично модифікованих бактерій було виявлено плазмід з більшою електрофоретичною рухливістю, ніж плазмід батьківських штамів (рис. 4, доріжка 4). Характеристику гібридної плазмід ( $Zn^R lux^+$ ), а також плазмід батьківських штамів одержано з використанням RAPD-аналізу. Суть цього методу полягала в ампліфікації поліморфних ділянок ДНК, які визначають видову належність. Було показано, що плазмід акцепторного ( $Zn^R$ ), донорного ( $lux^+$ ) та генетично модифікованого штамів ( $Zn^R lux^+$ ) мають різні генетичні профілі (рис. 5).

Утворення гібридної плазмід, яка є носієм генів стійкості до цинку та *lux*-генів, у процесі взаємодії плазмід батьківських штамів підтверджується даними щодо її елімінації. Отримані елімінанти характеризувалися

високою чутливістю до іонів цинку та не виявляли біолоюмінесцентних властивостей.

Створені селективні умови експерименту сприяли відбору таких модифікацій, де регуляція експресії *lux*-генів відбувається промоторно-операторною ділянкою спільно з генами стійкості до цинку. У кінцевому підсумку в гібридному *lux*-опероні цинк виступає як регулятор синтезу бактеріальної люциферази, яка каталізує окиснення аліфатичного альдегіду та відновлення флавінмононуклеотиду молекулярним киснем, унаслідок чого випромінюється світло.

Інтенсивність біолоюмінесценції у цьому процесі є функцією концентрації цинку, з яким контактують клітини такої генетичної конструкції. Це дає змогу використовувати клітини отриманого транскон'югату як сенсорний елемент для кількісного та якісного визначення іонів цинку.

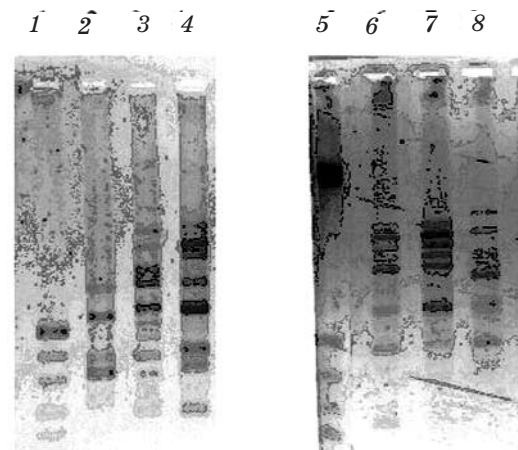


Рис. 5. Розділення продуктів ПЛР, одержаних на плазмідах штамів бактерій за допомогою праймерів ОРА-06 (1–4) та ОРР-12 (5–8) у 1,5%-му агарозному гелі:

- 1 — маркер молекулярної маси pUC19/MspI;
- 2 — *Ps. fragi* T2(5) ( $Te^R Zn^R$ );
- 3 — *Ph. phosphoreum* B7071;
- 4 — *Ps. fragi* T2(5) ( $Zn^R lux^+$ );
- 5 — маркери молекулярної маси pUC19/MspI і pUC19/Hind III;
- 6 — *Ps. fragi* T2(5) ( $Te^R Zn^R$ );
- 7 — *Ph. phosphoreum* B7071;
- 8 — *Ps. fragi* T2(5) ( $Zn^R lux^+$ )

Аналіз характеру впливу іонів важких металів на інтенсивність біолоюмінесценції клітин генетично модифікованого штаму *Ps. fragi* T2(5) ( $Zn^R lux^+$ ) засвідчив чітко виражену дію іонів цинку (рис. 6, крива 1). Прямолинійна залежність інтенсивності люмінесценції від концентрації цинку зберігається в діапазоні 1–100 мкМ за металом. Хід кривих 2–6 свідчить про незначний рівень чутливості клітин транскон'югату до інших важких металів.

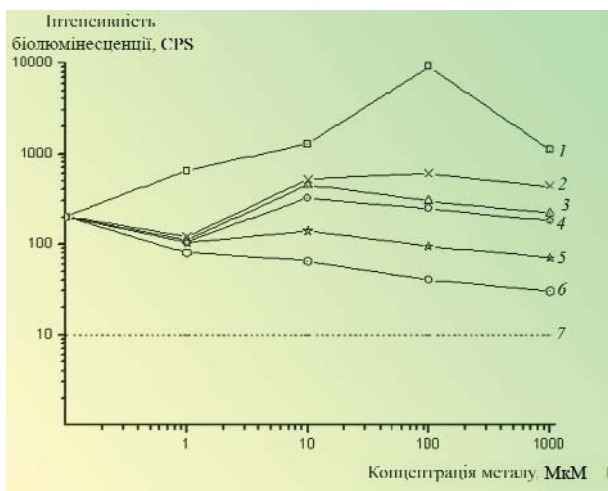


Рис. 6. Інтенсивність специфічної біоломінесценції (CPS-кількість фотонів за секунду) клітин штаму-біосенсора *Ps. fragi* T2(5) ( $Zn^R lux^+$ ) у присутності іонів важких металів:

- 1 — Zn;            2 — Ni;  
 3 — Co;           4 — Cd;  
 5 — Cu;           6 — Ag

Отже, можна констатувати високу специфічність клітин одержаного транскон'югату. Крива 1 може розглядатися як калібрувальна для іонів цинку у разі його кількісного визначення.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Подгорский В. С., Касаткина Т. П., Лозовая О. Г. Дрожжи — биосорбенты тяжелых металлов // Микробиол. журн. — 2004. — Т. 66, №1. — С. 91–103.
2. Лозовая О. Г., Касаткина Т. П., Подгорский В. С. Влияние хрома (VI) на физиологию роста и сорбционную способность дрожжей // Там же. — 2004. — Т. 66, №3. — С. 43–50.
3. Губський Ю. І., Ерстенюк Г. М. Вивчення компонентів системи гемоглобіну та антиоксидантних ферментів за кадмієвої інтоксикації // Укр. біохім. журн. — 2002. — Т. 74, №5. — С. 124–127.
4. Благой Ю. П. Взаимодействие ДНК с биологически активными веществами (ионами металлов, красителями, лекарствами) // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — №10. — С. 18–24.
5. Давыдова С. Л. О токсичности ионов металлов. — М.: Знание, 1991. — 32с.
6. Методы анализа объектов окружающей среды: Сб. научн. тр. АН СССР / Под ред. В. В. Малахова. — Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение, 1988. — 141 с.
7. Хроматографический анализ окружающей среды / Под ред. З. Л. Гроба. Перевод с англ. — М.: Химия, 1979. — 606 с.

Фоновий рівень біоломінесценції (середовище виміру) відображено на кривій 7.

Відношення максимального сигналу (рис. 6, крива 1) до фонового (рис. 6, крива 7) становить близько трьох порядків.

Таким чином, у результаті проведених комплексних досліджень встановлено: поперше, ефект інгібування іонами золота інтенсивності природної люмінесценції штаму *Ph. phosphoreum* B7071. Тому клітини цього штаму можуть слугувати сенсорним елементом для визначення вмісту іонного золота, наприклад у стічних водах золотодобувних та золотопереробних підприємств з метою контролю додержання технологічних процесів. По-друге, клітини транскон'югату, отримані в результаті кон'югативного схрещування, здатні високоспецифічно випромінювати світло під час контакту з іонами цинку. Це уможливило використання їх як сенсорного елемента в біоломінесцентному визначенні якісного та кількісного вмісту цього металу в об'єктах довкілля.

8. Yu Lei, Wilfred Chen, Ashok Mulchandani. Microbial biosensors // Anal. Chim. Acta. — 2006. — 568. — P. 200–210.
9. Расторгуев С. М., Завильгельский Г. Б. Lux-биосенсор для детекции ионов мышьяка // Биотехнология. — 2001. — №2. — С. 77–82.
10. Асриэли Т. В., Власова И. И., Гаврилова Е. М., Данилов В. С. Влияние антибиотиков на люминесценцию рекомбинантных клеток *Escherichia coli*, активированных сывороткой крови // Там же. — 2002. — №2. — С. 85–93.
11. Corbisier P., Ji G., Nuyts G. et al. luxAB gene fusion with the arsenic and cadmium resistance operons of *Staphylococcus aureus* plasmid p128 // FEMS Microbiol. Lett. — 1993. — V. 110. — P. 231–238.
12. Van der Lelie D., Corbisier P., Mergeay M. The use of biosensors for environmental monitoring // Res. Microbiol. — 1994. — V. 145. — P. 67–74.
13. Кацев А. М., Стародуб Н. Ф. Влияние поверхностно-активных веществ на интенсивность люминесценции бактерий // Укр. биохим. журн. — 2003. — Т. 75, №2. — С. 94–99.
14. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria // Plasmid. — 1978. — V. 1, N4. — P. 584–588.

15. Birnboim H., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* — 1979. — V. 7, №6. — P. 1513–1523.
16. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — V. 18, N24. — P. 7213–7218.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
18. Bouanchaud D., Scauzzi M., Chabbert Y. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci // *J. Gen. Microbiol.* — 1969. — V. 54. — P. 417–425.
19. Trevors T. Plasmid curing in bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1986. — V. 32. — P. 149–157.
20. Грузина Т. Г., Дыбкова С. Н., Чеховская Т. П. и др. Получение биолюминесцентного бактериального штамма *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*<sup>+</sup>) для определения концентрации ионов цинка // *Укр. биохим. журн.* — 2006. — Т. 78, №1. — С. 143–148.
21. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей ВУЗов. — М.: Высш. школа, 1990. — 352 с.
22. Решетилов А. Н. Микробные, ферментные и иммунные биосенсоры для экологического мониторинга и контроля биотехнологических процессов // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41, №5. — С. 504–513.
23. Gerhardt P., Murray R., Wood W. *Plasmids // Methods for general and molecular bacteriology.* Amer. Soc. of Microbiol. — Washington DC, 1993. — P. 124–128
24. Сатаева Л. В., Малахов С. Г. Загрязнения почв металлами в зависимости от типа преобладающей промышленности // *Труды ин-та эксперимент. метеорол.* — 1991. — Вып. 18. — С. 3–8.

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БАКТЕРИИ  
КАК СЕНСОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ  
ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

А. М. Задорожня, Т. Г. Грузина  
С. Н. Дыбкова, З. Р. Ульберг

Институт биокolloидной химии  
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев,

E-mail: [tgruzina@mail.ru](mailto:tgruzina@mail.ru)

Выявлен дозозависимый эффект ингибирования ионами золота интенсивности природной люминесценции штамма *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*<sup>+</sup>). Клетки этих бактерий могут выступать в качестве сенсорного элемента для определения содержания ионного золота, например в сточных водах золотодобывающих и золотоперерабатывающих предприятий, с целью контроля соблюдения технологических процессов.

В результате конъюгативного скрещивания получены клетки трансконъюгата *Pseudomonas fragi* T2(5), которые содержат гибридную плазмиду (*Zn*<sup>R</sup>*lux*<sup>+</sup>) и способны высокоспецифично испускать свет при контакте с ионами цинка. Это дает возможность использовать их как сенсорный элемент в биолюминесцентном определении качественного и количественного содержания этого металла в объектах окружающей среды.

**Ключевые слова:** бактерии, природная биолюминесценция, индуцированная биолюминесценция, определение, золото, цинк, конъюгативное скрещивание.

**BIOLUMINESCENT BACTERIA  
AS SENSOR ELEMENTS FOR THE HEAVY  
METALS IONS' CONTENT DETECTION**

A. M. Zadorozhnyaya  
T. G. Gruzina  
S. M. Dibkova  
Z. R. Ulberg

Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: [tgruzina@mail.ru](mailto:tgruzina@mail.ru)

It has been shown the dose-dependent inhibition influence of gold ions on *Photobacterium phosphoreum* B7071 (*lux*<sup>+</sup>) natural luminescence. These bacterial cells can serve as a sensor element for ionic gold content detection, for example, in wastewater of gold-mining and gold-processing manufactures for requirements compliance control.

The *Pseudomonas fragi* T2(5) transconjugates, which contain hybrid plasmid (*Zn*<sup>R</sup>*lux*<sup>+</sup>) and which are capable of the high-specific of light emission as a result of the contact with zinc ions, have been derived by conjugate crossing method. It enables to use these transconjugates as sensor elements in the high-specific bioluminescent detection of qualitative and quantitative content of this metal in environmental objects.

**Key words:** bacteria, natural bioluminescence, induced bioluminescence, detection, gold, zinc, conjugate crossing.