



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **142435**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 19/06 (2006.01)

C08F 20/56 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 10547**

(22) Дата подання заявки: **23.10.2019**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.06.2020**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.06.2020, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**Грецький Ігор Олександрович (UA),
Громозова Олена Миколаївна (UA),
Данькевич Людмила Анатоліївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ІМ. Д.К. ЗАБОЛотноГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Акад. Заболотного, 154, м. Київ, 03143
(UA)**

(54) СПОСІБ ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ

(57) Реферат:

Спосіб збереження біолоюмінесцентної активності бактерій *Photobacterium phosphoreum* із застосуванням екзополісахаридів біологічного походження. Для забезпечення люмінесценції бактерій до 40 діб суміш (1:1) бактеріальної суспензії та комбінації гелів (екзополісахаридполіакриламід (ЕПАА) та ксантан) зберігають в поліпропіленовій ємності, яку заповнюють на 50 % при температурі +4 °С.

UA 142435 U

UA 142435 U

Корисна модель належить до біотехнології та стосується збереження люмінесцентної активності бактерій виду *Photobacterium phosphoreum*, які використовуються в мікробних біосенсорах. Одним з варіантів рецепторного елемента біосенсора є краплі суміші гелю з люмінесцентними бактеріями, фіксовані на твердій фазі [1]. Чутливим параметром виступає інтенсивність люмінесценції бактерій, яка обумовлює високу чутливість і швидкість реакції-відповіді на різноманітні впливи та залежить від фізіологічного стану клітин. Для цього потрібно вирішити основну проблему - ефективне функціонування бактерій в краплі гелю. У літературі описано застосування широкого спектра сорбентів для іммобілізації мікроорганізмів, включаючи полівініловий спирт, агарозний і альгінатний гелі, різні полімери та ін. [2]. Велика частина з них не може бути використана для включення люмінесцентних бактерій в біосенсори внаслідок критичного рівня токсичності для живих клітин більшості гелевих елементів, що призводить до втрати клітинами функціональних властивостей [3].

У зв'язку з цим для отримання клітинних мікрочипів необхідно застосовувати менш токсичні гелі, наприклад екзополісахариди (ЕПС) природного походження, що використовуються для іммобілізації прокаріотів [4]. Дані ЕПС є високомолекулярними екзогенними продуктами біосинтезу мікроорганізмів, що мають ряд переваг порівняно з хімічними аналогами: стійкість до механічної деструкції, температури і низьких значень рН, нетоксичність і біодеградабельність.

Тому пошук способу збереження клітин в гелях з екзополісахаридів природного походження для підвищення тривалості і стабільності високої люмінесцентної активності бактерій *P. phosphoreum* є актуальним.

На сьогодні відомий спосіб використання ЕПС природного походження при приготуванні поживних середовищ для люмінесцентних бактерій [5], в якому показана його доцільність і ефективність. Недоліком такого способу є невисока життєздатність бактерій при зберіганні протягом місяця та обмежена інформативність оцінки стану досліджуваного біологічного об'єкта.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб забезпечення тривалої люмінесценції бактерій *Photobacterium phosphoreum* в гелях з екзополісахаридів природного походження.

Поставлена задача вирішується в створенні суміші бактеріальної суспензії та комбінації гелів (екзополісахаридполіакриламід (ЕПАА) та ксантан) для забезпечення збереження тривалої біолюмінесценції мікроорганізмів. Попередньо розчини з різною концентрацією гелів ЕПАА та ксантан (в комбінації 3:7) з додаванням 3 % розчину хлориду натрію стерилізують при 0,5 атм протягом 30 хв після чого вони представляють собою стерильну рідину різної густини. Як посівний матеріал використовують суспензію добової культури люмінесцентних бактерій *P. phosphoreum* IMB B-7071.

Головним критерієм для оцінки зберігання бактерій слугує інтенсивність люмінесценції клітин.

Наступні приклади ілюструють реалізації мети

Приклад 1. Застосування композицій ЕПС для зберігання бактеріальної люмінесценції в ємностях з різних матеріалів.

В стерильні флакони з різних матеріалів вносили суміш бактеріальної суспензії та гелів з ЕПС в співвідношенні 1:1. Після перемішування одну частину зразків залишали на зберігання при температурі +4 °С, а іншу при +21 °С. Спостереження за люмінесценцією зразків виявило найкращу інтенсивність проб на 10 добу при температурі зберігання +4 °С в флаконах з поліпропілену (Табл. 1).

Таблиця 1

Інтенсивність світіння бактерій при зберіганні в гелях на різних матеріалах

Температура зберігання	Сталь	Алюміній	Поліпропілен	Скло
+4 °С	-	+	+++	++
+21 °С	-	-	+	+

Дані Табл. 1 свідчать про здатність запропонованої суміші бактеріальної суспензії та гелів з ЕПС зберігати високу люмінесцентну активність бактерій в ємностях з поліпропілену.

Приклад 2. Застосування 1-8 % концентрацій композицій ЕПАА і ксантану (3:7) для збільшення тривалості бактеріальної люмінесценції в різних за заповненням зразках.

В стерильні флакони вносили різну кількість суміші ЕПС і бактеріальної суспензії добової культури люмінесцентних бактерій *P. phosphoreum* в співвідношенні 1:1. Після перемішування залишали на зберігання при температурі +4 °С. Після спостереження за люмінесценцією зразків фіксували інтенсивність люмінесценції для всіх досліджених варіантів (Табл. 2).

5

Таблица 2

Інтенсивність світіння бактерій при культивуванні на різних концентраціях композицій ЕПАА і ксантану

Тривалість зберігання, доба	Заповнюваність, %	1 %	2 %	4 %	8 %
10	50	+++	+++	+++	+++
	100	++	++	++	++
20	50	++	++	++	+
	100	+	+	+	+
30	50	+	+	+	-
	100	+	+	+	-
40	50	-	+	-	-
	100	-	-	-	-

Дані Табл. 2 свідчать про краще збереження інтенсивності люмінесценції бактерій при температурі +4 °С в поліпропіленовій ємності, яку заповнюють на 50 % комбінацією 2 % гелів (ЕПАА та ксантан).

10 Збереження в запропонованій гелевої комбінації люмінесцентної активності бактерій виду *Photobacterium phosphoreum*, які використовуються в мікробних біосенсорах, дозволяє підвищити термін використання суміші бактерій в гелі як рецепторного елемента до 40 діб.

Джерела інформації:

15 1. Кацев А.М., Абдураманова Э.Р., Стародуб Н.Ф. Имобилизация светящихся бактерий на неорганических носителях и оценка их применимости для биотестирования //Биотехнология. - 2009. - Т. 2, № 3. - С. 74-78.

20 2. Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Алескерова Л.Э. и др. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* для биомониторинга экотоксикантов //Прикладная биохимия и микробиология. - 2014. - Т. 50, № 5. - С. 490.

3. Семенчук И.Н., Таранова Л.А., Илясов П.В., Решетилов А.Н. Селективность микробного биосенсора при различных способах иммобилизации бактерий деструкторов //Хим. технол. воды. - 1998. - Т. 20. - С. 649-655.

25 4. Патент на винахід UA 60348 C2 C12N 1/20 Композиція для інокуляції насіння бобових рослин на основі бульбочкових бактерій та липкогена ЕПАА опубл. 15.10.2003, Бюл. № 10.

5. Патент на корисну модель UA 114282 C12N 1/20 Середовище для підтримання тривалої біолюмінесценції бактерій *Photobacterium phosphoreum* IMB В-7071, що використовуються в біосенсорних пристроях для оцінки екологічних ризиків опубл. 10.03.2017, Бюл. № 5.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35 Спосіб збереження біолюмінесцентної активності бактерій *Photobacterium phosphoreum* із застосуванням екзополісахаридів біологічного походження, який **відрізняється** тим, що для забезпечення люмінесценції бактерій до 40 діб суміш (1:1) бактеріальної суспензії та комбінації гелів (екзополісахаридполіакриламід (ЕПАА) та ксантан) зберігають в поліпропіленовій ємності, яку заповнюють на 50 % при температурі +4 °С.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601