

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского  
Биология. Химия. Том 4 (70). 2018. № 1. С. 179–187.

УДК 576.851.315

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ ФОТОБАКТЕРИЙ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ

*Абдураманова Э. Р., Наумова Н. В., Дерзян Л. М., Кацев А. М.*

*Медицинская академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия  
E-mail: katsev@mail.ru*

Установлено, что виды бактерий *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio fischeri* превосходят по интенсивности свечения бактерии *Vibrio harveyi*. Максимальное значение удельного свечения наблюдается для штамма *P. phosphoreum* F2, а минимальное – для штамма *V. harveyi* Ms1. Показано, что с увеличением прироста бактериальных клеток показатель их удельного свечения падает. Рассчитаны значения удельного свечения иммобилизованных бактерий, выявлено, что иммобилизация бактерий на неорганических носителях приводит к изменению величины данного показателя. Установлено, что с ростом числа бактерий на носителе удельное свечение адсорбированных на нем бактерий уменьшается. Показана возможность использования карбоната кальция и оксида алюминия в качестве носителей при создании биосенсоров.

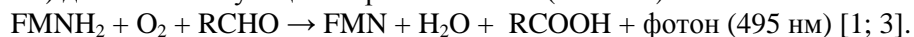
**Ключевые слова:** светящиеся бактерии, биолюминесценция, удельное свечение, биотестирование, иммобилизация.

### ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная люминесценция является продуктом жизнедеятельности морских светящихся бактерий. Это количественный показатель метаболических процессов, протекающих в клетке. Бактериальная клетка способна отвечать изменением интенсивности биолюминесценции на колебания состава окружающей ее среды. На этом основано применение морских светящихся бактерий в аналитических целях в качестве биотестов [1; 2].

Биолюминесценция, или реакция свечения является ферментативным процессом, катализируемым люциферазой и сопровождающимся потреблением кислорода и выделением света в сине-зеленой области света. Одним из субстратов данной реакции является восстановленный флавиномононуклеотид (FMN), способный принимать и отдавать два атома водорода, вторым – длинноцепочечный алифатический альдегид с 8–16 атомами углерода. В общем виде реакция свечения сводится к окислению восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>) до FMN

с одновременным окислением длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) до соответствующей жирной кислоты (RCOOH):



Использование светящихся бактерий в качестве чувствительного элемента биотеста для решения различных фундаментальных и прикладных задач требует знания их физиологических особенностей, определяющих основные характеристики биотеста. Одним из путей расширения потенциала биотестов является создание биосенсоров путем иммобилизации бактериальных клеток на различные носители. Несмотря на существующее разнообразие носителей для фиксирования бактерий, многие из них не могут быть использованы из-за снижения функциональных показателей микроорганизмов. Поэтому ведется активная работа по увеличению чувствительности биосенсорных устройств, подбираются оптимальные условия иммобилизации с целью усиления сигнала и повышения его стабильности [4; 5].

Целью работы было изучение показателей биолюминесценции морских светящихся бактерий в свободном и иммобилизованном состояниях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы морские светящиеся бактерии *Vibrio fischeri* IMB В\_7070, *Vibrio harveyi* Ms1 и *Photobacterium phosphoreum* IMB В\_7071, выделенные из Черного моря, а также бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1 – из Азовского моря [6–9]. Бактерии выращивали в течение 16–18 ч на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): пептон – 5; дрожжевой экстракт – 2,5; NaCl – 30;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 15;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4$  – 0,1; глицерин – 1 мл/л. Культивирование проводили при различных температурных режимах: *P. phosphoreum* – при 15–20°C, *V. fischeri*, *V. harveyi* Ms1 – 20–25°C, *P. leiognathi* Sh1 – 28–32° С. Для биотестирования бактерии разводили 3 % NaCl до конечной концентрации  $5 \cdot 10^5$  –  $1 \cdot 10^6$  кл/мл. Для определения интенсивности биолюминесценции бактерий использовали биолюминометр БЛМ 8801 – СКТБ «Наука», Россия. Измерение интегрального светового потока проводили в жидкой фазе согласно методике измерений, сертифицированной Государственным комитетом РФ по стандартизации и метрологии (Свидетельство № 224.01.13.194/2002, выданное Уральским НИИ метрологии). Количество бактериальных клеток определяли по поглощению при 600 нм с помощью спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Россия).

В качестве носителей для сорбции бактерий использовали фосфат и карбонат кальция, оксид и гидроксид алюминия. Сорбенты предварительно промывали 0,05М фосфатным буферным раствором (рН=7,1). Навеску сорбента 50 мг смешивали с 0,9 мл питательной среды и 0,1 мл суточной бактериальной культуры. Систему помещали в термостат и инкубировали в течение 20 ч при оптимальной для каждого вида бактерий температуре. Контрольные образцы готовили без добавления сорбентов. Носитель с адсорбированными бактериями отделяли от среды центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин. Адсорбированные бактерии трижды промывали 3 % раствором хлорида натрия: при каждой промывке к носителю с бактериями добавляли по 1 мл 3 % раствора соли; центрифугировали в

течение 10 мин при 1000 об/мин. Количество адсорбированных на носителе бактерий определяли по разности оптической плотности в контрольном образце и в среде после отделения сорбента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование фотобактерий в составе чувствительных элементов биотестов основано на оценке влияния различных факторов на интенсивность их биолюминесценции [1; 2; 4; 5]. В рамках биолюминесцентного метода анализа актуален вопрос использования биосенсоров на основе иммобилизованных бактерий [4; 5]. Одной из главных характеристик биолюминесцентного сигнала, контролируемого в биолюминесцентном анализе, является показатель удельного свечения бактерий, оказывающий влияние на чувствительность и погрешность метода.

В ходе работы были установлены значения показателей удельного свечения представителей четырех видов бактерий (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *P. phosphoreum* и *P. leiognathi*). Для этого измеряли значения биолюминесценции и оптической плотности образцов бактериальных суспензий, по которым на основании калибровочного графика зависимости оптической плотности бактериальной суспензии от числа бактериальных клеток ( $y=9 \cdot 10^{-10x}+0,025$ ) определяли концентрацию клеток (кл/мл) и удельное свечение (мВ/кл). Полученные результаты сопоставляли с имеющимися данными о типе кинетики люциферазной реакции исследуемых штаммов, которая является одной из важнейших характеристик при их идентификации [9] (таблица 1).

Таблица 1

#### Характеристика штаммов светящихся бактерий

Штамм	Оптическая плотность	Кол-во бактерий, кл/мл	Удельное свечение бактерий, мВ/кл	Тип кинетики
<i>P. phosphoreum</i> F2	0,08	$6,7 \cdot 10^7$	$7,72 \cdot 10^{-4}$	Средний [8]
<i>P. leiognathi</i> Cr1	0,33	$3,4 \cdot 10^8$	$1,83 \cdot 10^{-4}$	Быстрый [8]
<i>P. leiognathi</i> Sh1	0,61	$3,4 \cdot 10^9$	$8,09 \cdot 10^{-5}$	Быстрый [8]
<i>V. fischeri</i> F1	0,85	$4,7 \cdot 10^9$	$4,36 \cdot 10^{-5}$	Быстрый [8]
<i>V. harveyi</i> Ms1	1,00	$5,5 \cdot 10^9$	$2,57 \cdot 10^{-6}$	Медленный [8]
<i>P. leiognathi</i> W1	0,17	$8,9 \cdot 10^8$	$3,69 \cdot 10^{-5}$	Быстрый [8]
<i>V. fischeri</i> Sh2	0,92	$5,1 \cdot 10^9$	$1,61 \cdot 10^{-5}$	Быстрый [8]

Результаты исследований показали, что максимальное значение удельного свечения  $7,72 \cdot 10^{-4}$  мВ/кл наблюдается для штамма *P. phosphoreum* F2, а минимальное, равное  $2,57 \cdot 10^{-6}$  мВ/кл, – для штамма *V. harveyi* Ms1. Виды бактерий *P. phosphoreum*, *P. leiognathi* и *V. fischeri* превосходили по интенсивности свечения бактерии *V. harveyi*. Полученные результаты традиционно связывают как с особенностями фермента люциферазы (например, аминокислотным составом),

которые определяют скорость катализируемой реакции, так и с характеристиками альдегидного субстрата [1].

В предыдущих работах [8; 9] был определен тип кинетики люциферазной реакции ряда морских светящихся бактерий, в том числе и штаммов, рассматриваемых в данной работе. Для штамма *P. phosphoreum* F2 характерен средний тип кинетики; для штамма *V. harveyi* Ms1 – медленный; а для штаммов *P. leiognathi* Cr1, *P. leiognathi* Sh1, *V. fischeri* F1, *P. leiognathi* W1 и *V. fischeri* Sh2 – быстрый. Оптимальным субстратом билюминесцентной реакции для бактерий видов *P. phosphoreum*, *P. leiognathi* и *V. fischeri* является тетрадеканаль, который превосходит другие гомологи по способности стимулировать бактериальное свечение, а бактерии вида *V. harveyi* демонстрируют сродство к более короткоцепочечному альдегиду деканалу [1].

Однако сравнивая удельное свечение бактерий *P. phosphoreum* F2, *P. leiognathi* Sh1 и *V. fischeri* F1 (соответственно  $7,72 \cdot 10^{-4}$ ,  $8,09 \cdot 10^{-5}$ ,  $4,36 \cdot 10^{-5}$  мВ/кл), мы видим превосходство первого штамма. Данный факт можно связать с тем, что, возможно, бактерии *V. fischeri* F1 имеют дополнительный желтый флуоресцентный белок, наличие которого приводит к эмиссии фотона меньшей энергии с большей длиной волны ( $\lambda_{\text{макс}} \sim 545$  нм), а в штаммах *P. phosphoreum* F2 и *P. leiognathi* Sh1 присутствует синий флуоресцирующий белок, вызывающий эмиссию фотона с меньшей длиной волны ( $\lambda_{\text{макс}} \sim 475$  нм) и большей энергией [1].

Сопоставив данные эксперимента, мы можем заключить, что для штамма *P. phosphoreum* F2 со средним типом кинетики люциферазной реакции характерны минимальное значение прироста биомассы ( $6,7 \cdot 10^7$  кл/мл) наряду с максимальным значением показателя удельного свечения. Максимальный рост клеток наблюдается у штамма *V. harveyi* Ms1 ( $5,5 \cdot 10^9$  кл/мл) с медленным типом кинетики люциферазной реакции и при этом самым низким показателем удельного свечения. По количеству клеток бактерий, приходящихся на единицу объема, промежуточное положение занимают штаммы бактерий с быстрым типом кинетики, среднее значение удельного свечения для которых составляет  $2,9 \cdot 10^8$  кл/мл.

Анализ полученных результатов позволяет говорить об обратной зависимости величины удельного свечения бактерий и прироста их биомассы, т. е. с увеличением числа бактериальных клеток интенсивность билюминесценции, приходящаяся на единицу клеточной биомассы, падает.

Следующий этап работы заключался в сравнении показателей удельного свечения свободных бактерий и иммобилизованных на неорганических носителях. Для работы были отобраны по одному штамму из четырех видов бактерий (*P. phosphoreum* F2, *P. leiognathi* Sh1, *V. fischeri* F1, *V. harveyi* Ms1). Согласно результатам предыдущей работы [4] было установлено, что светящиеся бактерии при контакте с неорганическими носителями концентрируются на них, что сопровождается уменьшением числа клеток в жидкой фазе (таблица 2). При анализе оптической плотности жидкой фазы выявлено, что в случае фосфата кальция свыше 90 % бактерий *V. fischeri* F1 и *V. harveyi* Ms1 переходят на твердую фазу. Адсорбционная активность оксида алюминия, оцениваемая количеством адсорбированных бактерий, при иммобилизации некоторых штаммов превышала

70 % (*V. fischeri* F1, *P. leiognathi* Sh1 и *V. harveyi* Ms1). Использование в качестве сорбента гидроксида алюминия сопровождалось переходом на твердую фазу более 75 % бактериальных клеток (*P. phosphoreum* F2 и *V. fischeri* F1). Адсорбционная активность карбоната кальция была минимальна в отношении всех рассматриваемых штаммов бактерий, в частности, количество иммобилизованных бактерий *P. leiognathi* Sh1 не достигало даже 15 %.

**Таблица 2**  
**Характеристика штаммов бактерий после сорбции на неорганических носителях**

Штамм	Сорбент	Оптическая плотность	Количество бактерий, кл/мг	Количество бактерий, %	Суммарная интенсивность свечения, %	Удельное свечение бактерий, мВ/кл
<i>V. fischeri</i> F1	CaCO <sub>3</sub>	0,40	7,82·10 <sup>6</sup>	48,4	188,9	2,25·10 <sup>-4</sup>
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,23	1,16·10 <sup>7</sup>	71,5	51,4	4,16·10 <sup>-5</sup>
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,08	1,49·10 <sup>7</sup>	92,5	13,9	8,04·10 <sup>-6</sup>
	Al(OH) <sub>3</sub>	0,20	1,23·10 <sup>7</sup>	75,9	14,5	1,11·10 <sup>-5</sup>
<i>V. harveyi</i> Ms1	CaCO <sub>3</sub>	1,36	1,56·10 <sup>7</sup>	34,5	101,6	3,07·10 <sup>-5</sup>
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,46	3,56·10 <sup>7</sup>	78,5	152,8	1,46·10 <sup>-5</sup>
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,08	4,41·10 <sup>7</sup>	97,3	34,5	1,59·10 <sup>-6</sup>
	Al(OH) <sub>3</sub>	0,39	3,72·10 <sup>7</sup>	82,0	25,4	1,61·10 <sup>-6</sup>
<i>P. phosphoreum</i> F2	CaCO <sub>3</sub>	0,36	1,78·10 <sup>6</sup>	19,3	126,8	3,60·10 <sup>-4</sup>
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,24	4,44·10 <sup>6</sup>	48,2	159,2	2,90·10 <sup>-4</sup>
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,14	6,58·10 <sup>6</sup>	71,4	58,8	7,91·10 <sup>-5</sup>
	Al(OH) <sub>3</sub>	0,11	7,11·10 <sup>6</sup>	77,2	5,4	7,31·10 <sup>-6</sup>
<i>P. leiognathi</i> Sh1	CaCO <sub>3</sub>	0,82	3,02·10 <sup>6</sup>	14,5	116,8	6,62·10 <sup>-4</sup>
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,29	1,49·10 <sup>7</sup>	71,9	83,8	1,13·10 <sup>-4</sup>
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,56	8,89·10 <sup>6</sup>	42,8	43,6	7,92·10 <sup>-5</sup>
	Al(OH) <sub>3</sub>	0,62	7,47·10 <sup>6</sup>	35,9	6,4	2,40·10 <sup>-5</sup>

Было установлено, что интенсивность биолюминесценции бактерий в процессе адсорбции могла как увеличиваться, так и уменьшаться. Так, например, при использовании гидроксида алюминия и фосфата кальция наблюдалось уменьшение суммарной интенсивности свечения всех используемых штаммов в среднем соответственно до 13 % и 38 %. В случае карбоната кальция и оксида алюминия биолюминесценция некоторых штаммов бактерий возрастала до уровня 120–190 % от контрольных значений.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что иммобилизация бактерий приводит к изменению их удельного свечения как в сторону увеличения,

так и в сторону уменьшения в зависимости от сорбента. Сравнительная оценка удельного свечения свободных и связанных бактерий отражена на рисунке 1.

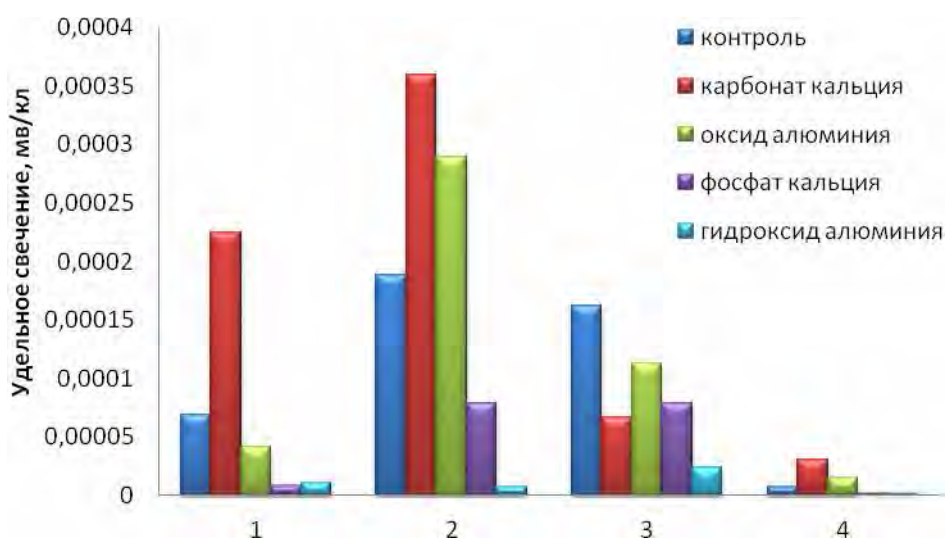


Рис. 1. Удельное свечение свободных и иммобилизованных бактерий: 1 – *V. fischeri* F1; 2 – *P. phosphoreum* F2; 3 – *P. leiognathi* Sh1; 4 – *V. harveyi* Ms1.

Согласно полученным результатам, бактерии, иммобилизованные на карбонате кальция и оксиде алюминия, демонстрируют те же закономерности, что были отмечены для свободных форм бактерий. Значение удельного свечения бактерий на различных сорбентах возрастает в ряду *V. harveyi* Ms1 – *V. fischeri* F1 – *P. leiognathi* Sh1 – *P. phosphoreum* F2. Повышение суммарной интенсивности свечения бактерий *V. fischeri* F1, *V. harveyi* Ms1 и *P. phosphoreum* F2 в системе с карбонатом кальция и бактерий *V. harveyi* Ms1 и *P. phosphoreum* F2 в системе с оксидом алюминия обусловлено увеличением показателя удельного бактериального свечения на данных сорбентах в сравнении с контролем. Значения удельного свечения бактерий, связанных на карбонате кальция и оксиде алюминия, в среднем возрастает соответственно в 3,4 и 1,8 раза. Удельное свечение всех рассматриваемых штаммов, иммобилизованных на фосфате кальция и гидроксиде алюминия, заметно падает в сравнении с их свободными формами. В среднем данный показатель бактерий, иммобилизованных на фосфате кальция, уменьшается в 4,4 раза, а иммобилизованных на гидроксиде алюминия – в 10,8 раза.

Экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности использования карбоната кальция и оксида алюминия при создании биосенсоров. Следует также отметить, что в предыдущей работе [4] было показано и наличие сходной чувствительности свободных и иммобилизованных на данных носителях светящихся бактерий к действию хлорида цинка.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Установлено, что значения удельного свечения представителей четырех видов бактерий возрастает в ряду *V. harveyi* – *V. fischeri* – *P. leiognathi* – *P. phosphoreum*. Показано, что с увеличением способности бактериальных клеток накапливать биомассу интенсивность их удельной биолюминесценции, снижается.
2. Выявлено, что иммобилизация бактерий на неорганических носителях приводит к изменению их удельного свечения: для бактерий, связанных на карбонате кальция и оксиде алюминия, в среднем возрастает соответственно в 3,4 и 1,8 раза, а на фосфате кальция и гидроксиде алюминия – уменьшается соответственно в 4,4 и 10,8 раза.
3. В эксперименте с иммобилизованными бактериями установлено, что с ростом адсорбционной активности неорганического носителя удельное свечение адсорбированных на нем бактерий уменьшается.

**Список литературы**

1. Дерябин Д. Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д. Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 248 с.
2. Eltzov E. Whole-cell aquatic biosensors / E. Eltzov, R. S. Marks // Anal Bioanal Chem. – 2011. – Vol. 400, № 4. – P. 895–913.
3. Girotti S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E. N. Ferri, M. G. Fumo [et al] // Analytica Chimica Acta. – 2008. – Vol. 608, Issue 1. – P. 2–29.
4. Кацев А. М. Иммобилизация светящихся бактерий на неорганических носителях и оценка их применимости для биотестирования / А. М. Кацев, Э. Р. Абдураманова, Н. Ф. Стародуб // Биотехнология. – 2009. – Т. 2, № 3. – С. 74–78.
5. Ефременко Е. Н. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* для биомониторинга экотоксикантов / Е. Н. Ефременко, О. В. Сенько, Л. Э. Алескерова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 5. – С. 490.
6. Кацев А. М. Характеристики Черноморских светящихся бактерий и перспективы их использования для анализа токсичности воды / А. М. Кацев // Таврический медико-биологический вестник. – 2001. – Т. 4, № 4. – С. 151–154.
7. Кацев А. М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А. М. Кацев, Джон Макемсон // Ученые записки ТНУ им. В. И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2006. – Т. 19, № 4. – С. 111–116.
8. Малыгина В. Ю. Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей / В. Ю. Малыгина, А. М. Кацев // Экология моря. – 2003. – В. 64. – С. 18–23.
9. Кацев А. М. Новые термофильные люминесцентные бактерии, выделенные из Азовского моря воды / А. М. Кацев // Таврический медико-биологический вестник. – 2014. – Т. 17, № 2 (66). – С. 59–64.

## FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF FREE AND IMMOBILIZED ON INORGANIC CARRIERS PHOTOBACTERIA OF BLACK AND AZOV SEAS

Abduramanova E. R., Naumova N. V., Derzyan L. M., Katsev A. M.

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russian Federation  
E-mail: katsev@mail.ru

Marine luminescent bacteria can modify their bioluminescence intensity as a reply on change in the environment, due to the fact that their bioluminescent enzymatic reaction is a criterion of luminescent bacteria metabolism activity. This is a reason why they are being used as bioassay for screening and assessment of contaminants. Biosensor devices are created by immobilization of biological objects on different carriers, in order to produce more effective method of biotesting.

The aim of this research was to study the luminescence of free and immobilized marine bacteria.

One of the important characteristics of a bioluminescent signal is a specific luminescence, causing effect on sensitivity and measurement error of a bioluminescent method. At first the specific luminescence of four bacteria species (*Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium phosphoreum* and *Photobacterium leiognathi*) was determined. Experimental findings were compared with the available data on luciferase reaction kinetics of investigated bacteria species.

It was determined that according to the values of specific luminescence (mV/cell) bacteria studied can be arranged in the following order: *P. phosphoreum* F2 ( $7,72 \cdot 10^{-4}$ ) – *P. leiognathi* Cr1 ( $1,83 \cdot 10^{-4}$ ) *P. leiognathi* Sh1 ( $8,09 \cdot 10^{-5}$ ) – *V. fischeri* F1 ( $4,36 \cdot 10^{-5}$ ) – *P. leiognathi* W1 ( $3,67 \cdot 10^{-5}$ ) – *V. fischeri* Sh2 ( $1,61 \cdot 10^{-5}$ ) – *V. harveyi* Ms1 ( $2,57 \cdot 10^{-6}$ ). We can assume that this fact is related to the type of a luciferase reaction kinetics and presence of additional fluorescent proteins. It was shown that specific luminescence decreases with the increase in biomass of bacterial cells.

At the next step of an experiment the specific luminescence of free and immobilized bacteria were compared. The data received from measuring the specific luminescence of immobilized bacteria had shown an increase in 3.4 and 1.8 times for calcium carbonate and aluminium oxide accordingly, whereas it was decreasing for calcium phosphate and aluminium hydroxide in 4.4 and 10.8 times accordingly for some species.

Experimental data have shown a potential ability of calcium carbonate and aluminium oxide to serve as carriers for a biosensor creation.

**Keywords:** luminescent bacteria, bioluminescence, specific luminescence, biotesting, immobilization.

### References

1. Deryabin D. G., *Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects*, 248 p. (Science, Moscow, 2009). (in Russ.).
2. Eltzov E., Marks R. S., Whole-cell aquatic biosensors, *Anal Bioanal Chem.*, **400** (4), 895 (2011).
3. Girotti S., Ferri E. N., Fumo M. G., Maiolini E., Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria, *Analytica Chimica Acta.*, **608** (1), 2 (2008).



4. Katsev A. M., Abduramanova E. R., Starodub N. F., Immobilization of luminous bacteria on inorganic carries and estimation of their applicability for a biotesting, *Biotechnology*, **2** (3), 74 (2009). (in Russ.).
5. Efremenko E. N., Senko O. V., Aleskerova L. E., Alenina K. A., Mazhul M. M., Ismailov A. D., Biosensors based on the luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* immobilized in polyvinyl alcohol cryogel for the monitoring of ecotoxicants, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **50** (5), 477 (2014). (in Russ.).
6. Katsev A. M., Characteristics of the Black sea luminous bacteria and prospect of their use for the water toxicity analysis, *Tavrida medical-biological herald*, **4** (4), 151 (2001). (in Russ.).
7. Katsev A. M., Makemson J., Identification of luminous bacteria, isolated from Black and Azov seas, *Scientific Notes of V. I. Vernadsky TNU, series «Biology, chemistry»*, **19** (4), 111 (2006). (in Russ.).
8. Malygina V. Yu., Katsev A. M., Luminous bacteria of Black and Azov seas, *Sea ecology*, **64**, 18, (2003). (in Russ.).
9. Katsev A. M., New thermophylic luminescent bacteria isolated from the water of Azov sea, *Tavrida medical-biological herald*, **17** (2, 66), 59 (2014). (in Russ.).