

## АНАЛІЗ МЕТОДІВ ІНДИКАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА ПРОДУКТІВ ЇХ МЕТАБОЛІЗМУ

І.А. Белих, к.біол.н., Н.Ф. Клещев, д.техн.н., А.М. Грек, к.біол.н.,  
А.В. Сакун, к.біол.н.

Національний технічний університет "Харківський політехнічний інститут"

**РЕЗЮМЕ.** Огляд присвячений методам індикації мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності. Аналізуються дані літератури, починаючи із 70-х років минулого століття й до сьогодні. Методи індикації мікроорганізмів розвиваються по двох напрямках: неспецифічного та специфічного визначення біооб'єктів. Неспецифічна індикація передбачає лише виявлення певного біооб'єкту без його ідентифікації. До цього виду індикації відносять практично всі біофізичні та фізичні методи: білкова флуоресценція та поглинання, світлорозсіювання, кондуктометрія та інші. Другий напрямок — це специфічна індикація: бактеріологічний аналіз, імуноензимні методи та інші. Об'єднання цих напрямків на основі біосенсорів дозволяє різко підвищити ефективність тестування бактерій, вірусів та їх токсинів. Найперспективнішими є способи індикації мікроорганізмів, засновані на реєстрації реакцій певних живих організмів (або клітин рослинного та тваринного походження) на наявність об'єкта, який виявляють (бактерій, вірусів). Вивчення методів виявлення та ідентифікації біологічних агентів є важливим етапом розробки біосенсорів та автоматизованих систем індикації мікроорганізмів.

Ключові слова: індикація, мікроорганізми, мікробіоценоз, пірогенність, екологія.

**РЕЗЮМЕ.** Обзор посвящен методам индикации микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности. Представлены результаты, начиная с 70-х годов прошлого столетия до настоящего времени. Методы индикации микроорганизмов развиваются в двух направлениях: неспецифического и специфического определения биообъектов. Неспецифическая индикация предусматривает только выявление некоторого биообъекта без его идентификации. К этому виду индикации относят практически все биофизические методы: флуоресценция, поглощение, светорассеяние, кондуктометрия и др. Второе направление — это специфическая индикация: бактериологический анализ, иммуноэнзимные методы и др. Объединение этих направлений на основе биосенсоров позволяет резко повысить эффективность тестирования бактерий, вирусов и их токсинов. Наиболее перспективными являются способы индикации микроорганизмов, основанные на регистрации реакций определенных живых организмов (или клеток растительного и животного происхождения) на наличие объекта, который обнаруживают (бактерий, вирусов). Изучение методов выявления и идентификации биологических агентов является важным этапом разработки биосенсоров и автоматизированных систем индикации микроорганизмов.

Ключевые слова: индикация, микроорганизмы, микробиоценоз, пирогенность, экология.

**SUMMARY.** The review is devoted to the microorganism's indication and products of their vital functions methods. The results obtained from 70th of the last century for a present time are presented. The methods of microorganism's indication develop in two directions: hetero- and specific determination of bioobjects. Heterospecific indication foresees only the exposure of some bioobject without its authentication. To this kind the indication take practically all bio-physical methods: fluorescence, absorption, lightening, conductometry etc. The second direction is specific indication: bacteriological analysis, immunoenzyme methods etc. Connection of these directions on the basis of biosensors allows sharply promoting efficiency of testing bacteria, viruses and their toxins. Most perspective methods are microorganism's indications, based on registration of reactions of certain living organisms (or plant and animal cells) in the presence of object which it is found out (bacteria, viruses). A study of methods of exposure and authentication of biological agents is important design of biosensors and automatic microorganism's indication.

Keywords: indication, microorganisms, microbiocenosis, pirogenation, ecology.

Актуальність розроблення нових методів індикації мікроорганізмів та продуктів їх метаболізму визначається низкою обставин. З одного боку — це необхідність розвитку таких науково-технічних напрямків: біотехнологія, промислова мікробіологія, харчова та фармацевтична промисловість, одержання стерильних матеріалів тощо. У багатьох випадках потрібен експрес-контроль бактеріальної мікрофлори, що важко забезпечити відомими біологічними методами [1, 2]. З іншого боку — це погіршення екології через радіаційно-хімічні забруднення, внаслідок чого відбуваються зміни в якісних та кількісних характеристиках мікробіоценозів навколишнього середовища [3, 4]. Так, у деяких ентеропатогенних бактерій зростає стійкість до існуючих дезінфікуючих агентів та антибіотиків [5]. Це може свідчити про те, що, ймовірно, відбуваються зміни генетичної структури мікроорганізмів [6, 7], які супроводжуються спалахами невідомих хвороб у тій чи іншій країні. Окрім

того, з'явилася загроза застосування біологічної зброї під час здійснення терористичних актів та диверсій. Ситуація на сьогодні у цьому сенсі є вкрай складною. Поряд зі звичайними збудниками сибірської виразки, чуми, холери (рис. 1) є мікроорганізми, створені на основі генної інженерії і в багатьох випадках не існує ні сироваток, ні вакцин, ні експрес-методів їх визначення.

Слід враховувати й те, що занесені у довкілля деякі патогенні бактерії та віруси можуть зберігати життєздатність роками, несучи в собі потенційну загрозу [8].

Збір, ідентифікація бактеріологічних збудників та вживання заходів захисту завчасно, аби вони були ефективними, є досить складною справою. У довкіллі (вода, повітря, ґрунт) постійно знаходяться в різних кількостях непатогенні мікроби та різні органічні сполуки, тому під час ідентифікації бактеріологічних збудників виникають певні труднощі [9].

Нижче наведено аналіз методів, які можна



Рис. 1. Прогнозовані спалахи холери у світі [<http://medicalplanet.su/659.html>]

застосовувати у процесі розроблення автоматизованих пристроїв біоіндикації як у комплексі, так і окремо.

В існуючих і перспективних методах мікробіологічного контролю можуть бути закладені фізичні, хімічні та біологічні принципи виявлення біологічних агентів [3].

Біологічні методи контролю бактеріальної зараженості полягають у тому, що з досліджуваних проб (води, повітря, ґрунту, продуктів харчування, змивів техніки та ін.) виділяють мікроорганізми, висівають їх на живильні середовища і після термостатування з температурою підраховують число колоній, що виростили [4, 9, 11]. Під час випробувань зразків на наявність мікроорганізмів віддають перевагу методу мембранної фільтрації. За цим методом повітря, воду або суспензію досліджуваного зразка пропускають через спеціальний мембранний бактеріальний фільтр. Далі фільтр вміщують у живильне середовище, інкубують з відповідною температурою і підраховують число колоній, які виростили [12–14]. Цей метод дає змогу підтвердити присутність життєздатних мікроорганізмів у пробі з максимально можливою ймовірністю.

Основними чинниками, що впливають на ефективність визначення ступеня бактеріальної зараженості, є об'єкт зразка для аналізу, техніка посіву, склад живильних середовищ, час і температура інкубації посівів тощо [4, 10, 13, 14, 15].

Існуючі біологічні методи бактеріального аналізу, незважаючи на високу ефективність, як правило, досить трудомісткі, потребують

багато часу для отримання результатів і дорогих середовищ для культивування мікроорганізмів [10, 13]. Усе це не дозволяє застосовувати їх для постійного моніторингу та експрес-аналізу.

Крім патогенних бактерій велику небезпеку становлять продукти їхнього розпаду або життєдіяльності. Так, для продуктів харчування характерними є екзо- й ендотоксини, а для ін'єкційних розчинів — ліпополісахариди (пірогени). Пірогени — це речовини різного походження (частіше біологічного), що спричинюють гарячковий стан організму з різким підвищенням температури тіла [4, 10]. Не виключено, що пірогенну реакцію мають і ендотоксини [18–20]. У цьому разі тест на пірогенність може бути використаний для визначення присутності їх у зразках [16].

Широкого застосування набув метод контролю на пірогенність через підвищення температури тіла у відповідь на внутрішньовенне введення досліджуваних препаратів, випробуваний на кролях. Цей метод зафіксовано не тільки в Державній фармакопеї нашої країни, але й у фармакопеях інших країн [4, 16, 17, 21]. Однак багаторічний досвід визначення пірогенності на кролях виявив недоліки цього методу: високі витрати на придбання та експлуатацію устаткування, утримання тварин і догляд за ними, залежність результатів від індивідуальних особливостей тварини, необхідність випробування зразка на трьох і більше тваринах для одержання достовірного результату [16, 22].

На цей час у Фармакопеях США і Канади

впроваджено новий біологічний метод визначення пірогенності, який полягає у вимірюванні оптичної щільності гелю лізату амебоцитів краба *Limulus polyphemus* під впливом ендотоксину грамнегативних бактерій [18–20]. Цей метод випробувано на різних видах бактерій *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*. Його чутливість лежить у межах: *E. coli* — 750, *P. vulgaris* — 200, *P. aeruginosa* — 12 000 клітин.

Поряд з біологічними активно розробляють й інструментальні методи оцінювання пірогенності. Одним з авторів даного огляду — А.М. Греком було запропоновано визначати пірогенність води для ін'єкцій за величиною відношення інтенсивності флуоресценції ексімера до інтенсивності мономера пірену [23].

Також показана можливість визначення ліпосахаридів за допомогою фотоакустичної спектроскопії та термолінзової спектрометрії. Якщо мікробні зразки перед тестуванням обробити розчином етилендіамінтетраоцтової кислоти або метилтимоловим синім [24], поріг чутливості реакції підвищується і тест дає позитивний результат за наявності 125 клітин *E. coli*, 50 клітин *P. vulgaris* і 400 клітин *P. aeruginosa* в одиниці об'єму [19]. Цей метод, незважаючи на свої переваги, має ряд істотних недоліків: складність одержання лізату амебоцитів, необхідність спеціальних умов зберігання, нестабільність лізату, трудомісткість вилову, транспортування, утримування крабів, мечохвостів і омарів.

Саме недостатня ефективність класичних біологічних аналізів стала рушійною силою для розвитку методів специфічної індикації та діагностики збудників інфекційних хвороб.

Розроблено методи визначення наявності мікроорганізмів у зразках за допомогою зондів-барвників. Сутність їх полягає в тому, що в досліджувану пробу вводять розчин родаміну 6 Ж [3], реєструють інтенсивність його флуоресценції за довжини хвилі 555 нм у присутності бактерій, яку порівнюють з інтенсивністю флуоресценції стандартного розчину індикатору за тієї самої довжини хвилі. За результатами вимірів роблять висновок про наявність мікроорганізмів. Для досліджень брали 3 види мікроорганізмів — *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*. Величина зміни інтенсивності флуоресценції індикатору залежала від виду бактерій та їхньої чисельності. Індикатор, наприклад резаурин, можна використовувати для визначення загального мікробного числа під час здійснення мікробіологічного контролю продуктів харчування. Досліди проводили з культурами: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida utilis* [12,13].

Запропоновано такий флуоресцентний спосіб визначення концентрації бактерій у суспензії: до суспензії вводять тритон X-100, етилендіамінтетраоцетат, трис, етидіум бромід у відповідній концентрації і рН, а далі реєструють приріст інтенсивності флуоресценції в зразках з бактеріями порівняно зі зразками без бактерій при  $\lambda_{\max}$  540 — 620 нм ( $\lambda_{\text{збуд.}}$  260 — 320 нм або 420 — 530 нм). За величиною приросту флуоресценції роблять висновок про концентрацію бактерій [25].

Збудження світлом з довжиною хвилі 410 і 430 нм дають змогу визначити бактерії за наявністю власної флуоресценції у світло-синій ділянці без застосування додаткових реактивів [26] (рис. 2).

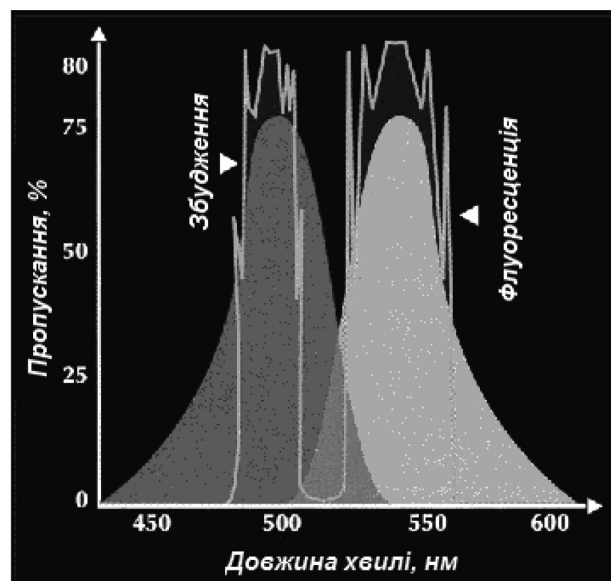


Рис. 2. Спектри збудження та флуоресценції бактерій [12]. Положення спектра поглинання та флуоресценції залежить від виду бактерій. Для протеїнів і токсинів спектри зсуваються в більш короткохвильову ділянку

Крім вищезазначених барвників, для тестування наявності мікроорганізмів можна застосовувати ряд інших, зокрема таких, як бенз[ед]індол і бенз[д]індол, які у присутності мікроорганізмів змінюють свій колір [27, 28].

Як відомо, самі мікроорганізми, продукти їх розпаду і життєдіяльності (ендо- і екзотоксини) мають властивість поглинати світло і власну флуоресценцію в ультрафіолетовій ділянці за рахунок триптофанових і тирозинових залишків протеїнів токсинів [29–33]. На підставі цього було запропоновано використовувати зазначену властивість для виявлення мікроорганізмів у водних розчинах і в сухих пробах ґрунту [34], а за флуоресценцією і світлорозсіюванням визначати наявність патогенних мікробів у повітрі [30, 31, 35, 36].

Окрім флуоресценції для виявлення токсинів прийнятні численні кольорові реакції

протеїнів, зокрема на наявність пептидних зв'язків у молекулі, на будь-які конкретні амінокислоти. Усі ці методи є неспецифічними [29]. Мікроорганізми мають здатність поглинання не тільки в ультрафіолетовій (УФ-), а й в інфрачервоній (ІЧ-) ділянці. За зсувом максимуму поглинання ІЧ-спектра в діапазоні 1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$  можна визначати ступінь життєздатності клітин [37].

У зв'язку з розробленням чутливої апаратури для реєстрації надслабкого світіння (хемілюмінесценції, електрохемілюмінесценції та біолюмінесценції) різних біологічних об'єктів з'явилася можливість використовувати цю властивість для тестування наявності мікроорганізмів у різних середовищах. У деяких типів мікроорганізмів спостерігається біолюмінесценція в присутності іонів Mg [38]. Світіння відбувається внаслідок приєднання кисню до комплексу люциферин люцифераза аденозинмонофосфат. Джерелом аденозинфосфату слугує аденозинтрифосфорна кислота (АТФ) мікробів. Чутливість становить  $10^3$  мікробних клітин в 1 мл. Метод біолюмінесценції може застосовуватися для контролю наявності мікроорганізмів у різних середовищах [39]. Окрім того, мікроорганізми можуть розкладати пероксид водню за допомогою каталізу в присутності хемілюмінесцентної сполуки. Це було використано під час розроблення способу визначення загальної концентрації мікроорганізмів і наявності живих клітин. Застосовуючи як окиснювальний агент марганцевокислий калій з дигідрофосфатом, можна підвищити чутливість хемілюмінесцентного методу [37, 40].

Було також встановлено принципову можливість визначення мікотоксинів за допомогою біолюмінесцентного методу. Розроблено люциферазний біотест для виявлення зерна, ураженого фузаріозом [41].

Найбільш чутливими методами є радіометричні, які дозволяють на основі визначення кількості  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ , що утворились у процесі життєдіяльності мікроорганізмів з мічених  $\text{C}^{14}$  вуглеводів живильного середовища, виявити одиничні клітини *E. coli* (навіть одну у воді) [42-44]. Підрахунок проводили на рідинному сцинтиляційному спектрометрі.

Наявність у бактерій негативно зарядженої мембрани дозволяє визначити присутність їх у різних середовищах. Технічно метод здійснюється так: у робочу камеру з рідким живильним середовищем і досліджуванним зразком вміщують два електроди — вимірювальний і стандартний. Стандартний електрод покрито матеріалом, проникним для мікроорганізмів. Коли в камері досягається певна концентрація клітин, вимірюють різницю по-

тенціалів, пропорційну їхній кількості [45, 46]. Можлива сфера застосування: визначення інтенсивності обсіменіння зразків техніки, харчових продуктів, оцінка ефективності антибактеріальних засобів.

Розглядається також метод, що дає змогу за зміною електропровідності суспензії досліджуваного зразка зробити висновок про ступінь росту мікроорганізмів у даному середовищі та їх кількість. Чутливість цього методу невисока. Зміна напруги або струму на електродах фіксується тільки після досягнення концентрації мікроорганізмів  $10^5$ - $10^6$  клітин на 1 мл [47].

Створення постійного електричного потенціалу на графітовому електроді призводить до інгібування дихальної активності мікробних клітин *Saccharomyces cerevisiae*, *B. subtilis*, *E. coli*, вміщених безпосередньо на цей електрод. Ступінь дихальної активності залежить від потенціалу електрода і виду бактерій. Падіння дихальної активності корелює зі зменшенням кількості життєздатних клітин. Усе це свідчить про можливість створення методу електрохімічної індикації наявності мікроорганізмів [22].

Певний інтерес становить електрооптичний метод ідентифікації та підрахунку бактерій у суспензіях, що ґрунтується на визначенні змін величини поляризації променя лазера, що виникає після його проходження через суспензію бактерій, орієнтованих в електричному полі [48]. На цей час для ідентифікації високонейротоксичних бактеріальних бутулінових токсинів типу С, D, E, F успішно застосовують метод мас-спектрометрії з іонізацією за допомогою лазерної десорбції [49].

Існує спосіб ідентифікації ентеробактерій, заснований на солюбілізації та триптичному розкладанні їхніх протеїнів методом мас-спектрометрії з іонізацією лазерної десорбції з матриці [2].

Одним з високоточних методів визначення бактерій та їх ідентифікації є порівняння протеїнів зовнішньої мембрани з базою даних повного набору протеїнів. Для складання таблиць повного набору мас-протеїнів застосовують метод мас-спектрометрії разом з рідинною хроматографією [50]. Ідентифікацію протеїнів на поверхні зовнішньої мембрани бактеріальних клітин здійснюють за допомогою лігандів, що флуоресціюють і мають велику схильність до зв'язування з протеїнами [51]. Цей метод можна застосовувати для диференціації патогенних і непатогенних штамів [49, 52].

Гігантське комбінаційне розсіювання [53] електромагнітних хвиль в оптичному діапазоні, відсорбованих на металах хімічних сполук та біологічних агентах (вірусах, бактеріях, токсинах), також можна застосовувати для визначення незначних концентрацій силь-

нодіючих отруйних речовин. Двовірне спектральне резонансне розсіювання в ультрафіолетовій області дозволяє ідентифікувати бактерії та розпізнавати схожі генетичні зразки [1].

У 1985 р. К. Мюлліс зі співробітниками розробили метод клонування послідовностей ДНК *in vitro*, який отримав назву полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Це метод ампліфікації *in vitro*, за допомогою якого протягом кількох годин можна виділити та розмножити певну послідовність ДНК у кількості, що перевищує вихідну в  $10^8$  разів [54].

Методом ПЛР можна здійснити швидке та високочутливе визначення збудників туберкульозу [55], дифтерії [56], вірусу гепатиту В [57], вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ), вірусу папіломи [58] тощо. При цьому нема потреби працювати з радіоактивними ізотопами, оскільки ампліфікований сегмент вірусної ДНК виявляється безпосередньо після електрофоретичного розділення ДНК та фарбування його відповідним барвником [58].

Багато з описаних методів покладено в основу створення низки приладів для індикації мікроорганізмів. У даному огляді наведено деякі з них.

Так, одним з таких приладів є Malthus 2000, що його випускає в Англії фірма Malthus Instruments. Він працює за кондуктометричним принципом і, виходячи з особливостей поверхневих зарядів клітин, дозволяє визначати різні мікроорганізми, включаючи коліформи, лактобактерії, стафілококи, гриби і дріжджі. Чутливість його досягає  $10^5$ - $10^6$  клітин/мл, тривалість аналізу близько 8 год. Випускають й інші прилади для ідентифікації клітин мікроорганізмів, зокрема лічильник для визначення життєздатності (Petrifoss) і пристрій на основі епіфлуоресцентного фільтра (Biofoss) фірми Foss Electric AS (Данія), мікрокалориметр (Thermal activity monitor, Thermometric Lt, Великобританія), радіометр (Bactec, Johnston Labs., США), біolumінометр (Lumac Biocounter, Lumac B.V., Нідерланди), лічильник колоній (Coulter counter, Coulter Electronics Inc., Канада), електронний аналізатор частинок (Ramus 265, Orbec Ltd., Англія), імпедометр (Bactometr 32, Bactomatic Inc., США), амперометр (Midas Pro, Biosensori Sp, Італія) [59]. Але усі ці прилади не можуть забезпечити проведення швидкого й специфічного аналізу, є дорогими і потребують висококваліфікованого обслуговування. У цьому сенсі заслуговує на увагу прилад на основі поверхневого плазменного резонансу (ППР) (BIA-core™, Pharmacia, Швеція, що входить до складу фірми General Electric). Він простіший і може бути використаний для імунохімічних аналізів, включаючи визначення

токсинів та мікроорганізмів [59]. Є повідомлення [60] про виробництво приладу на основі ППР (Texas Instrument, США). Такого типу прилади (SUPLAR-1, SUPLAR-2, SUPLAR-3, SUPLAR-4) випускають в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. [61, 62].

З метою розроблення мультианалізатора для одночасного й простого виявлення різних мікроорганізмів у середовищі було зроблено спробу використати набір (від 7 до 16) резистивних газочувливих датчиків на основі оксидів металів і полімерів [63]. Запропоновано систему, що працює за принципом "штучного носа", ідентифікуючи різні речовини в газоподібному стані: гідрокарбонати, спирти, альдегіди, кислоти й інші компоненти, що їх виділяють мікроорганізми в процесі росту. Автори показали, що вид бактерій можна встановити з імовірністю до 96% під час росту їх на середовищі протягом 12 год. При цьому можна знайти близько 81% усіх досліджених видів бактерій. Є повідомлення про успішну спробу ідентифікації та класифікації мікроорганізмів одночасно з оцінкою компонентів середовища і самого процесу їхнього росту. Так, було виявлено *E. coli*, *Enterococcus species*, *Proteus mirabilis* і *Staphylococcus saprophyticus* [63].

Одним з напрямків розроблення засобів експрес-індикації мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності є створення біосенсорів [64-67].

Розглянемо більш докладно принципи їхньої будови.

Біосенсори належать до сімейства молекулярних сенсорів і тому мають у своєму складі поверхню, селективну до речовини, яку визначають. Ця поверхня розташована поблизу перетворювача або інтегрована в перетворювач, функцією якого є передача сигналу про взаємодію між поверхнею та речовиною, що визначається (рис. 3).

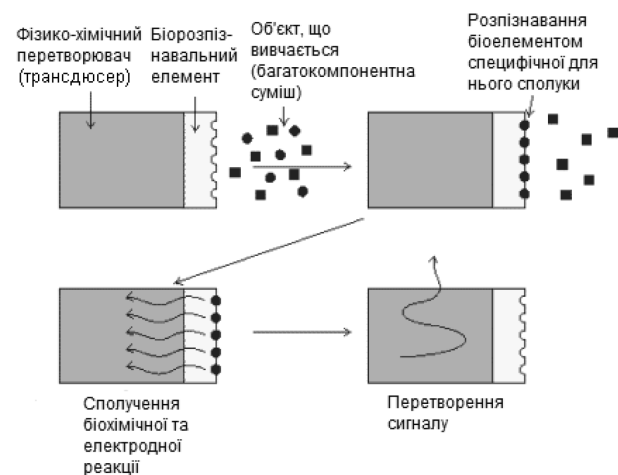


Рис. 3. Принципова схема дії біосенсора [70]

Незалежно від методу розпізнавання або різновиду трансдюсера, що його використовують в аналізі для забезпечення селективності до речовини, що визначається, існує спільний елемент біосенсорів усіх типів — біорозпізнавальний компонент, іммобілізований на поверхню перетворювача, де детектується сигнал [68 — 70].

Головна вимога до біорозпізнавальних компонентів полягає в тому, що вони повинні ідентифікувати тільки один біологічний об'єкт серед безлічі інших.

Цій вимозі відповідають:

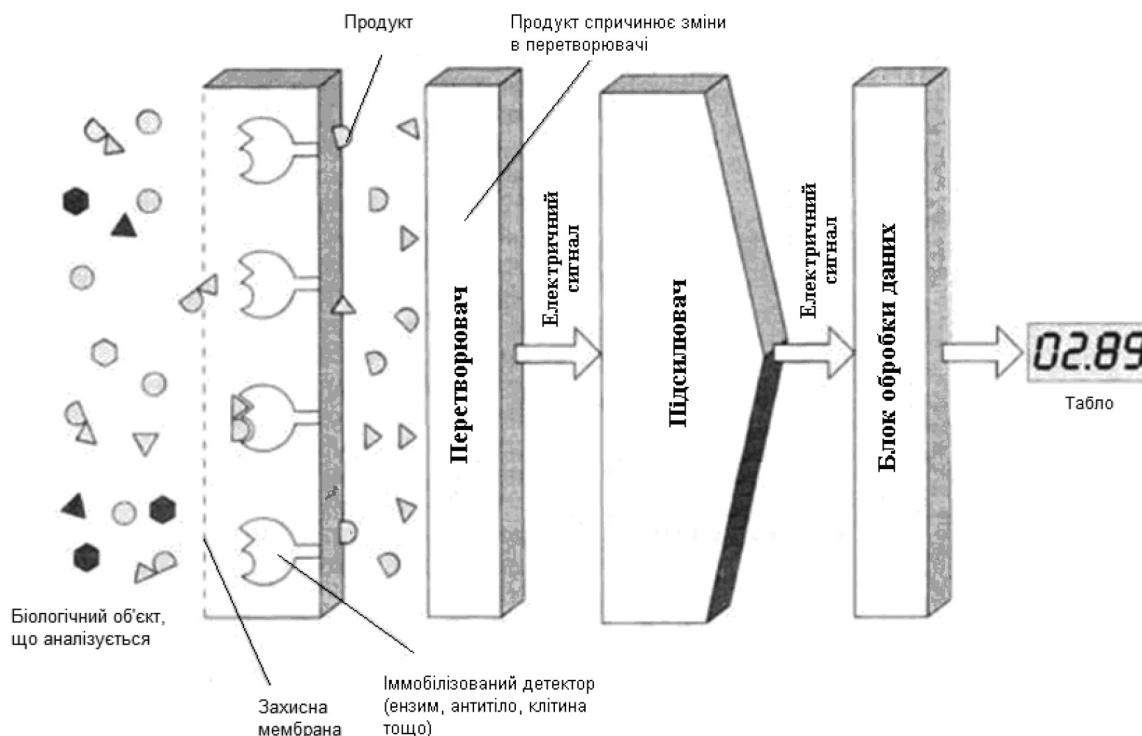
- ензими;
- антитіла;
- нуклеїнові кислоти;
- рецептори, клітини, тканини (рис. 4).

У сучасних біосенсорах як детектори (перетворювачі) застосовують наномолекулярні

офіційний метод для виявлення мікроорганізмів було впроваджено імпедансний метод [76]. Чутливість аналітичних пристроїв, де його використовують, становить  $10^6$ - $10^7$  клітин на мл [70, 76].

Дещо інший електрохімічний сенсор для визначення *V. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* та деяких інших мікроорганізмів був випробуваний з обробленим тетрацикліном і дзеркально відполірованим вугільним електродом, суміщеним з коміркою для збагачення клітин шляхом фільтрування. Сигнал реєстрували методом циклічної амперометрії зі зміною потенціалу від 0 до +1,5 В. При цьому чутливість аналізу досягала  $2-5 \cdot 10^4$  клітин у зразку, а тривалість його — 30 хв [76].

Грунтуючись на екзотермічності реакції взаємодії антиген-антитіло і термометричному



\*Примітка: Продукт — продукт, що утворюється при взаємодії біологічного об'єкту з детектором

Рис. 4. Схема біосенсора з біологічним детектором (перетворювачем): ензими, антитіла, клітини тощо [70]

перетворювачі, наприклад, флуоресцентний протеїн (рис. 5).

На принципі імуноензимного аналізу (ІЕА) можна виявити *E. coli* і *S. typhimurium* в концентрації 50 клітин на мл, причому вся операція триває лише 35 хв [71 — 74].

Для визначення бактеріальних антигенів *Klebsiella pneumoniae* застосовуються біосенсори амперометричного типу [75]. Такий же підхід, заснований на принципах двосайтового ІЕА з електрохімічною детекцією за допомогою ензиму-мітки, розроблено й для кількісного визначення  $\alpha$ -токсину [76].

Асоціацією хіміків-аналітиків як перший

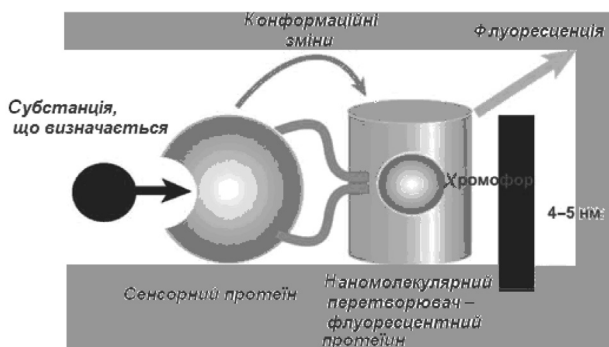


Рис. 5. Біосенсор з наномолекулярним перетворювачем [70]

імуноензимному аналізі (TELISA) [77], було запропоновано термометричний імунний сенсор для кількісного визначення *S. cerevisiae* й *E. coli*. Одним із напрямків розроблення засобів експрес-індикації бактеріального зараження є створення імуносенсорів як з люмінесцентними мітками, так і без них [78 — 80].

Одними з перших варіантів імунних сенсорів, розроблених для детектування особливо небезпечних токсичних агентів, були пристрої на основі п'єзокристалів [79]. Досить перспективним виявилось застосування такого типу імуносенсора в комбінації з проточною системою [81]. У такій системі п'єзокристал з іммобілізованим фізичною сорбцією антигеном у процесі конкурентного аналізу дозволяє виявити стафілококовий ентеротоксин В у концентрації 0,1 мкг/мл. У разі іммобілізації ДНК на поверхні срібних електродів п'єзоелектричного кварцового резонатора, дає змогу таким біосенсорам успішно використовувати його для визначення в крові специфічних нуклеїнових кислот і антитіл у здорових особин та за різних захворювань [82, 84].

Є також повідомлення про розробку імунного сенсора на основі п'єзокристалів для визначення вмісту клітин *E. coli* лінії K12 і *S. typhimurium* у питній воді [83, 86]. Чутливість аналізу досягала  $10^6$ - $10^9$  клітин/мл, причому вдавалось ідентифікувати до 87 різних штамів сальмонел. Такого самого типу біосенсор було створено для виявлення клітин *S. aureus* [84] з урахуванням показника коагуляції молока. Чутливість аналізу в даному випадку становила  $10^2$ - $10^5$  клітин/мл. Відомі також імунні сенсори на основі п'єзокристала для визначення вірусу герпесу [47], холерного вібріона [85], золотистого стафілокока [87], *Francisella tularensis* [88, 89], *Helicobacter* та *Compylobacter pylori* [90, 91].

Окрім біосенсорів на основі п'єзоефекту для тестування патогенних мікроорганізмів, наприклад *Yersinia pestis*, застосовують біосенсори з використанням магнітних носіїв [92], а для детекції харчових патогенів — біосенсор на основі виміру імпедансу [93].

Використання в екології біо- та хемілюмінесцентних сенсорів, які відповідають таким вимогам практики, як чутливість аналізу та простота використання, продемонстровано під час контролю рівня мікотоксинів, зокрема Т-2 токсину, що свідчить про перспективність застосування їх на практиці [94].

Останнім часом для ведення біологічної та хімічної розвідки в армії США широко використовують установку фірми Molecular Devices Corp. (США). На її основі розроблено різні типи аналітичних пристроїв, що одержали назву світлоадресованих потенціометричних та інших біосенсорів [95].

Для швидкого виявлення *V. subtilis* було створено імунний світлоадресований потенціометричний сенсор (САПС) [96]. Його гранична чутливість досягає  $3 \cdot 10^3$  клітин/мл, а час аналізу становить — лише 15 хв. Застосування оптичних сенсорів дозволяє проводити детектування часу забруднення бактеріями динамічних водних середовищ у реальному масштабі.

Чутливість, специфічність і швидкість ідентифікації бактерій біосенсорами на основі флуоресцентних систем можна збільшити за рахунок внесення в біологічно-активний аналіт люмінесцентних міток в поєднанні з імунно-магнітним поділом [97, 98].

Використання сенсора, принцип роботи якого ґрунтується на хеметричному аналізі, сприяє визначенню сукупності бактерій, таких як *E. coli* та *P. aeruginosa* [99, 100]. Для збільшення можливості детектування великої кількості зразків застосовують матричні біосенсори, так звану методику сендвічевого імунологічного аналізу [99].

На основі САПС розроблено імунний сенсор для експресного й високочутливого визначення стафілококового ентеротоксину В, вірусу ньюкаслівської хвороби і вегетативної форми бактерії *Brucella melitensis*. Трансдюсером у такому біосенсорі слугує кремнієва структура з посиленням потенціометричного сигналу світлом. Чутливість аналізу — 5, 2 і 20 пкг/мл для ентеротоксину, вірусу Ньюкастл і *B. melitensis* відповідно [100].

Сенсори на основі антитіл або рецепторів називають афінними біосенсорами, теоретична основа яких базується на роботах авторів: Стюард М (1983), Zhou Guo-Jun, Zhang Guo-Fang, Chen Hong-Yuan (2002). [101, 102].

В імуноензимних біосенсорах для отримання сенсорної складової (біорозпізнавального компонент) проводять сумісну іммобілізацію, наприклад холінестерази та антитіл проти відповідних антигенів на поверхню робочого платинового (планарного) електрода. Як матричні компоненти використовують бичачий сироватковий альбумін, хітозан та нітрат целюлози для визначення антигенів умовно-патогенних мікроорганізмів *Streptococcus pyogenes* та *S. aureus* [103].

Для детектування антигену розроблено імуносенсор з мікровагами на п'єзоелектричному кристалі кварцу. Для створення п'єзоімунного сенсора застосовували змінний одноланцюговий фрагмент, що ковалентно зв'язаний з цистеїном [102].

Іммобілізація антитіл *E. coli* на електроді, що виконаний з індій-титан-оксиду, за рахунок якого вимірюється повний опір фарадеївського струму, уможливило детектування

кишкової палички такими біосенсорами [103].

Програмне об'єднання окремих біосенсорів у масив, що працює як єдина система, інтегрування їх в одну мультисенсорну структуру і формування значної кількості селективних біологічних структур на поверхні перетворювача — такий варіант імунного сенсора дозволить виявляти одночасно три токсини — стафілококовий ентеротоксин В, токсин *Y. pestis* з концентраціями 5, 15, 25 нг/мл відповідно [104].

Розроблено імунний сенсор для ідентифікації чотирьох компонентів за умови використання двомікрорельєфної дифракційної решітки з діоксиду титану з високим індексом відображення, нанесеного на пластикову підкладку. Імунний сенсор дає змогу виявляти стафілококовий ентеротоксин В, токсин ботулізму у концентраціях 1, 10, 100 нг/мл відповідно, а *Francisella tularensis* може бути визначена за наявністю однієї клітини в 1 мл [105 — 107].

Останнім часом як чутливий елемент у біосенсорах використовують рецептори, бактеріальні структури, водорості, тканинні фрагменти тощо. У разі використання бактерій *Photobacterium phosphoreum* Sq3 і *Vibrio fischeri* F1 за допомогою їхньої біолюмінесценції можна виявляти токсини.

Фотоактивність ціанобактерій залежить від контакту їх з певними сполуками, наприклад з компонентами хімічної або біологічної зброї. Ця властивість може бути реалізована за умов створення біорозпізнавальних поверхонь [19, 85, 109].

На сьогодні велику конкуренцію біосенсорам можуть скласти мікрофлюїдні чипи [108], які дозволяють аналізувати ДНК, РНК, протеїни та клітини. Основою мікрочипа є мікроаналітична система, що виконує значну кількість аналітичних операцій, включаючи підготовку, введення та дозування проби, перемішування, змішування з реагентами, хімічні реакції, розділення одержаного продукту, збір фракцій на заключній стадії

аналітичних дій з пробю, детектування [107]. На мікрофлюїдному чипі реєструють продукти аналізу високочутливими системами детектування (наприклад, електрохімічними, оптичними, мас-спектрометричними та ін.), які можуть бути виконані конструктивно окремо або інтегровані в чип, у тому числі й біосенсор [108, 109]. Описано застосування мікрочипа при розділенні ДНК, для визначення амінокислот, пептидів та протеїнів, що мають флуорисцентну мітку [110, 111].

Таким чином, з даного огляду випливає, що найбільш ефективними для ідентифікації мікроорганізмів та продуктів їх розпаду і життєдіяльності є біосенсори та мікрофлюїдні чипи.

Розроблення біосенсорів має бути спрямовано на забезпечення скринінг-аналізу бактеріального зараження, що важливо для польових, експедиційних умов та інших позаштатних ситуацій. Усе це висуває на перший план розробку складових біосенсорів — трансдюсерів та біорозпізнавальних компонентів. Стосовно трансдюсерів слід вирішити низку апаратних та програмних задач, а саме математичну обробку одержаної інформації, використання методів розпізнавання зразків ("електронний ніс", "електронний язик") тощо.

Проблемою використання біорозпізнавальних компонентів у біосенсорах є нанесення їх на підкладку, підвищення відтворюваності (регенерації) сенсорного шару та стабільності його параметрів, розширення діапазону мікроорганізмів, що визначаються, підвищення чутливості та селективності.

На наш погляд, перспективною є подальша розробка та удосконалення мікроаналітичних систем. Наявність мікроаналітичної системи дає змогу провести підготовку до введення й дозування досліджуваної проби, що вкрай важливо під час мікробіологічного тестування.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Identification of bacteria from two-dimensional resonant — Raman spectra J. Grun, C. Manka, S. Nikitin [et al.] // *Anal. Chem.* — 2007. — V. 79, N 14. — P. 5489—5493.
2. Pribil P. Characterization of enterobacteria using MAL-DI-TOF mass spectrometry / P. Pribil, C. Fensela // *Ibid.* — 2005. — V. 77, N 18. — P. 6092—62095.
3. Гончарук В.В. Концепция улучшения качества питьевой воды в Украине / В.В. Гончарук // *Хим. технол. воды.* — 1994. — Т. 16, № 5. — С. 467—472.
4. Речменский С.С. Очерки экспериментальной аэромикробиологии / Речменский С.С. — М.: Медицина, 1973. — 164 с.
5. Гигиенические аспекты изменения свойств микробиоценозов окружающей среды при радиоактивном загрязнении / [Л.В. Григорьева, Г.Н. Корчек, Т.В. Бей, М.Ю. Антонов] // *Хим. технол. воды.* — 1995. — Т. 17, № 1. — С. 88—91.
6. Криволицкий Д.А. Действие ионизирующей радиации на биоценоз / Д.А. Криволицкий, Ф.А. Тихомиров, Е.А. Федоров. — М.: Наука, 1988. — 239 с.
7. Кузин А.М. Действие атомной радиации на биоту / А.М. Кузин // *Радиобиология.* -1991. — Т. 31, № 2. — С. 175—179.
8. Государственная фармакопея СССР. — 10 е изд. — М.: Медицина, 1968. — 1079 с.
9. Кульский Л.А. Теоретические основы технологии очистки воды / Л.А. Кульский. — К.: Наук. думка, 1968. — 86 с.
10. Крылов Ю.Ф. Биологический контроль безопасности лекарственных средств / Ю.Ф. Крылов, Г.Я.Кивман. — М.: Медицина, 1985. — 143 с.



11. Dimmick R.L. An Introduction to experimental aerobiology / R.L. Dimmick, A. Akers- Toronto, 1969. — 120 p.
12. Боровик Э.Б. Сравнительная оценка методов санитарно-микробиологического контроля воздуха операционных / Э.Б. Боровик, Р.А. Дмитриева, И.Н. Рыжова // Гиг. санит. — 1983. — № 1. — С. 79—80.
13. Лабинская В.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / В.С. Лабинская. — М.: Медицина, 1978. — 394 с.
14. Сравнительная эффективность пробоотборников бактериальной флоры воздуха / В.Л. Евдокимов, М.П. Балашов, А.И. Дадалова, В.Н. Краева // Лаб. дело. — 1980. — № 4. — С. 243-246.
15. Джарылгасов С.А. Устройство для микробиологического анализа воздуха / С.А. Джарылгасов. — Открытия, изобретения, пром. образцы, товарные знаки. — 1977. — № 20. — С. 72.
16. Михайлова С.Н. Пирогенные примеси в лекарственных средствах и методы их титрованием определять / С.Н. Михайлова // Фармация. НРБ. — 1983. — Т. 33, № 4. — С. 33—37.
17. Денисов Н.Д. Пирогенные вещества, их свойства, методы контроля и удаления из инъекционных растворов / Н.Д. Денисов // Фарм. журн. — 1963. — № 3. — С. 27—31.
18. Кивман Г.Я. Вопросы испытания лекарственных средств на пирогенность с помощью реакции гелирования лизата амёбоцитов / Г.Я. Кивман, С.В. Дорохова // Хим.-фарм. журн. — 1981. — Т. 18, № 6. — С. 737—747.
19. Coates D.A. Enhancement of the sensitivity of the Limulus assay for the detection of gram-negative bacteria / D.A. Coates // J. Appl. Bacteriol. — 1977. — V. 42, N. 3. — P. 445—449.
20. Weary M. Pyrogen testing with the Limulus amoebocyte lysate test / M. Weary // Pharm. Int. — 1986. — V. 7, N 4. — P. 92—102.
21. Еникеева З.Н. Испытание лекарственных средств на пирогенность. II: Целесообразность и границы унификации дозы препарата / З.Н. Еникеева, Г.Я. Кивман // Хим.-фарм. журн. — 1981. — Т. 15, № 11. — С. 122-125.
22. Крепис И.Б. Использование электрического поля для снижения бактериальной обсемененности поверхности с полимерным покрытием / И.Б. Крепис, Н.В. Абрамова, Б.И. Пименов // Электронная обработка материалов. — 1974. — № 5. — С. 66-67.
23. А. с. 1561681 СССР, А 61 В 10/00; G 01 N 33/29. Способ определения пирогенности инъекционных средств / А.М. Грек, Ф.А. Конев, Е.Ф. Григорьев [et al.] — Заявл. 20.07.87; Опубл. 03.01.90. // Открытия. Изобрет. — 1990. — № 1. — С. 10.
24. Определение липосахаридов при помощи фотоакустической спектроскопии и термолинзовой спектрометрии / Н.В. Орлова, А.В. Брусничкин, А.В. Фокин [и др.] // Аналитика и контроль. — 2005. — Т. 9, № 3. — С. 257—263.
25. А. с. 663380 СССР, МКИ А 61 В 10/00; G 01 N 33/18. Способ определения пирогенности инъекционной воды / Л.И. Брутко, А.В. Карякин, Л.Е. Щедрина — Заявл. 21.04.76; Опубл. 25.05.79 // Открытия. Изобрет. — 1979. — № 19. — С. 12.
26. Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and densification through principal components analysis / Giana Hector Enrigue, Silveira Landulfo, Zangaro Renato Amaro, Pachero Marcos Tadeu // J. Fluorescence. — 2003. — V. 13, № 6. — P. 489—493.
27. Pat. 4556636 USA, MKU C 12 Q 1/04. Composition analytical element and method for detection of bacteria / Belly R. T., Clements L. I., Fastman K. — Заявл. 03.06.83; Опубл. 13.12.85.
28. Pat. 10200500 6237 Germany МПК8 G 01 N 33/58. Verfahren zur Bestimmung von Keimen / Henkel KGaA, Frank Michael, Siepmann Friedheim, Th?nehen Andreas, Stumpe Stefan, Herrmann Helmut. — Заявл. 10.02.2005; Опубл. 24.08.2006.
29. Александров В.Н. Отравляющие вещества / В.Н. Александров, В.Н. Емельянов- М.: Воениздат, 1990. — 271 с.
30. Анищенко В.И. Экспериментальное исследование полидисперсных индикатрис рассеяния в ультрафиолетовой и видимой области спектра / В.И. Анищенко, С.В. Михайленко // Труды ЛЭТИ. — 1976. — Вып. 103. — С. 101-104.
31. Паркер С.А. Фотоллюминесценция растворов / С.А. Паркер: — М.: Мир, 1972. — 510 с.
32. Бактериальные аэрозоли и методы их исследования в санитарной микробиологии / В.С. Киктенко, С.И. Кудрявцев, Н.И. Чугунов, Н.И. Пушин- М.: Медицина, 1968. — 172 с.
33. Assessment of experimental and natural viral aerosols / P.I. Gerone, R.V. Couch, G.V. Keefer [et al.] // Bact. Rev. — 1966. — V. 30. — P. 576—588.
34. Аппаратный метод обнаружения микроорганизмов в сухих пробах грунта / Б.И. Веркин, Е.М. Медведев, В.А. Блохин // Вопр. вычисл. матем. техн. — К., 1976. — С. 130—135.
35. Пат. 222803, G 01 N 21/39, 21/64. Н. К. Мешковский, Я. Н. Погорельский, И. К. Мешковский. Система оперативной диагностики биологического загрязнения воздуха в вентиляционных каналах зданий и сооружений; Заявл. 15.04.02; Опубл. 7.01.04.
36. Kenyon C.L. An automated Bakteria detector monitor / C.L. Kenyon // Am. Lab. — 1975. — V. 7, N 12. — P. 35-36, 38-39.
37. А. с. 690069 СССР, МКИ С 12 К 1/00 (53). Способ определения жизнеспособности микроорганизмов / П. С. Куц, Э. Г. Тугова., Н. В. Жавнерко [и др.] — Заявл. 18.04.77; Опубл. 05.11.79 // Открытия. Изобрет. — 1979. — № 37. — С. 103.
38. Ellner P.D. Detection of bacteria by bioluminescence / P.D. Ellner, C.M. Podborny // Microbiology. — Washington, 1975. — P. 37—38.
39. Bussey D.M. Bioluminescence for USP sterility testing of pharmaceutical suspension products / D.M. Bussey, K. Tsuji // Appl. Environ. Microbiol. — 1968. — V. 5, N 2. — P. 349—355.
40. Ломакина Г.Ю. Определение общей микробной загрязненности воздуха биоллюминесцентным методом / Г.Ю. Ломакина, Н.Н. Угарова // 6-я Всеукр. конф. по анализу объектов окружающей среды "ЭКОАНАЛИТИКА" — Самара: СамГТУ, 2006. — 6 с.
41. Люциферазный биотест для определения степени поражения фузариозом зерна пшеницы / В.А. Кратасюк, О.И. Егорова, Е.Н. Есимбекова [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. — 1998. — Т. 34, № 6. — С. 688—691.
42. Bachrach U. Radiometric for the detection of coliform organisms in water / U. Bachrach, Z. Bachrach // Appl. Microbiol. — 1974. — V. 28, N 2. — P. 169—171.
43. Sloane P.S. Rapid radiometric method for detecting bacterial contamination in fermentations of Streptomyces nodosus / P.S. Sloane // Abstrs. 79th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los-Angeles, Calif., 1979. — Washington, 1979. — P. 198.
44. A simple radionuclidic test for presence of bacteria in biological sample / [C.E. Webber, C. Adenyl-Jones, B.M. Bomen, E.S. Garnett] // Int. J. Nucl. Med. Biol. — 1975. — V. 2, N 1. — P. 49.
45. Pat. 4009078 USA, MKU C 12 K 1/04. Detecting the presence of microorganisms / I. R. Wilkins, G. E. Stoner — Заявл. 16.12.75; Опубл. 22.02.77.
46. Pat. 4200493 USA, MKU C 12 K 1/10. Microbial detection and enumeration apparatus / I. R. Wilkins, G. E. Stoner — Заявл. 02.12.76; Опубл. 29.04.80.
47. Stokert J. Detection of microbial growth using stainless steel — electrodes / J. Stokert, P. Welaj, J. Percells // Abstrs. 79th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los-Angeles, Calif., 1979. — Washington, 1979. — P. 301.
48. Pat. 4576916 USA, MKU C 12 M 1/36, C 12 Q 1/18. Electro-optical apparatus for microbial identification and enumeration / G. E. Lomke, R. I. Meltzer, N. Akzo — Заявл. 11.07.84; Опубл. 18.03.86.
49. Li J. Real-time detection of bacterial contamination in dynamic aqueous environments using optical sensor / J. Li, J. Schanzle, M.B. Tabacco // Anal. Chem. — 2004. — V. 76, N 5. — P. 1411—1418.

50. Characterization of botulinum toxins type CDE and F by matrix-assisted laser desorption ionization and electrospray mass spectrometry / [B.L.M. Van Baar, A.G. Hulst, A.L. De Jong, E.R.J. Wills] // *J. Chromatogr. A.* — 2004. — V. 1036, N 1. — P. 97-114.
51. Mass spectrometric methods for generation of protein mass database used for bacterial identification / [Z. Wang, K. Dunlop, S. Long, L. Li] // *Anal. Chem.* — 2002. — V. 74, N 13. — P. 3174-3182.
52. Dittrich S. An integrated microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection and sorting of fluorescent all and particles / S. Dittrich, P. Schwill // *Ibid.* — 2003. — V. 75, N 21. — P. 5767-5774.
53. Ченг П. Гигантское комбинационное рассеяние / П. Ченг, Т. Фуртак — М.: Мир, 1984. — 408 с.
54. Анализ генома. Методы [Г. Бантинг, Ч. Кантор, Ф. Коллинз и др.] Пер. с англ. / [под ред. К. Дейвиса] — М.: Мир, 1990. — 246 с.
55. Владимирский М. А. Быстрое и высокочувствительное определение микобактерий туберкулеза в диагностических материалах с помощью полимеразной цепной реакции / М.А. Владимирский, Л.К. Шипина, М.В. Калинин // Состояние и перспективы разработки препаратов для диагностики вирусных гепатитов и инфекций средствами профилактики. Материалы конференции — Пермь, 1993. — С. 33.
56. Михайлович В.М. Полимеразная цепная реакция может служить надежным альтернативным методом при диагностике дифтерийной инфекции / В.М. Михайлович, С.В. Паринов, И.К. Мазурова // Там же. — Пермь, 1993. — С. 83—84.
57. Гришаев М.П. Выделение ДНК вируса гепатита В с использованием полимеразной цепной реакции / М.П. Гришаев, Т.А. Егорова, А.Д. Амосов // Там же. — Пермь, 1993. — С. 39.
58. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак [пер. с англ.] — М.: Мир, 2002. — 589 с.
59. Hobson N.S. Microbial Detection / N.S. Hobson, I. Tothill, A.P.F. Turner // *Biosens. Bioelectr.* — 1996. — V. 11, Iss. 5. — P. 455—477.
60. Cullen D.C. A direct surface Plasmon-polariton immunosensor: Preliminary investigation of the non-specific adsorption of serum components to the sensor interface / D.C. Cullen, C.R. Lowe // *Sens. Actuat.* — 1990. — V. 1, Iss. 1—6. — P. 576—579.
61. Starodub N. Threats to Global Water Security Biosensors In a System of Instrumental Tools to Prevent Effects of Bioterrorism and Automotive Control of Water Process Purification NATO Science for Peace and Security Series C / N. Starodub: Environmental Security. — 2009. — P. 59—71.
62. Стародуб Н.Ф. Экспрессный контроль токсических веществ и патогенных микроорганизмов и иммунные сенсоры / Н.Ф. Стародуб, В.Н. Стародуб // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, № 4. — С. 5—23.
63. Starodub N. The Role of Ecological Chemistry in Pollution Research and Sustainable Development. Biosensors in the System of Express Control of Chemicals, Regularly Used as Terrorist Means, to Prevent Non-Desirable Consequences NATO Science for Peace and Security Series C / N. Starodub: Environmental Security. — 2009. — P. 275—284.
64. Multiple-Analyte Fluoroimmunoassay Using an Integrated Optical Waveguide Sensor / T.E. Plowman, J.D. Durstchi, H.K. Wang [et al.] // *Anal. Chem.* — 1999. — V. 71, N 19. — P. 4344—4352.
65. Simultaneous detection of six biohazardous agents using a planar waveguide array biosensor / Rowe-Taitt C.A., Hazzard J.W., Hoffman K.H. [et al.] // *Biosens. Bioelectr.* — 2000. — V. 15, Iss. 10—11. — P. 579—589.
66. Стародуб М.Ф. Экспрессный контроль токсичных веществ патогенных микроорганизмов. Иммунный анализ и иммунные сенсоры / М.Ф. Стародуб, В.Н. Стародуб // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, № 4. — С. 5—23.
67. Тернер Э. Биосенсоры: Основы и приложения: [пер с англ.] / Э. Тернер, И. Карубе, Дж. Уилсон- М.: Мир, 1992 — 614 с.
68. Song J.M. Miniature biochip system for detection of Escherichia coli O157:H7 based on antibody-immobilized capillary reactors and enzyme-linked immunosorbent assay / J.M. Song, T. Vo-Dinh // *Ibid.* — 2004. — V. 507, N 1. — P. 115—121.
69. Yang, L. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria / L. Yang, R. Bashir // *Biotechnol. Adv.* — 2008. — N 26. — P. 135-150.
70. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры / Б. Эггинс — М.: Техносфера, 2005. — 336 с.
71. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: В 2-х т.: [пер. с англ.]; [под ред. Р. Кельнера, Ж.-М. Мерте, М. Отто, Г. М. Видмера]. — М.: "Мир", ООО Изд-во АСТ, 2004. — Т. 1. — 608 с.
72. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: В 2-х т.: [пер. с англ.]; [под ред. Р. Кельнера, Ж.-М. Мерте, М. Отто, Г. М. Видмера]. — М.: "Мир", ООО Изд-во АСТ, 2004. — Т. 2. — 728 с.
73. Highly sensitive flow-injection immunoassay system for rapid detection of bacteria / [I. Abdel-Hamid, D. Ivnitski, P. Atanasov, E. Wilkins] // *Anal. Chim. Acta.* — 1999. — V. 399, Iss. 1—2. — P. 99—108.
74. Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of E. coli O157:H7 / [I. Abdel-Hamid, D. Ivnitski, P. Atanasov, E. Wilkins] // *Biosens. Bioelectr.* — 1999. — V. 14, Iss. 3. — P. 309—316.
75. An amperometric enzyme immunosensor based on screen-printed electrode for determination of Klebsiella pneumoniae bacterial antigen / G. Safina, E. Medyantseva, O. Bazarnova [et al.] // International Conference "Analytical Chemistry and Chemical Analysis" . — Kyiv Sept., 12-18, 2005: Book of Abstracts Kyiv: Kyiv Univ. — 2005. — С. 329.
76. Microbial detection / [M. Cardosi, S. Birch, J. Talbot, A. Phillips] // *Electroanalysis.* — 1991. — V. 3. — P. 1—8.
77. Thermometric enzyme linked immunosorbent assay: TELISA / [B. Mattiassona, C. Borrebaeck, B. Sanfridsona, K. Mosbach] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Enzymology.* — 1977. — V. 483. — P. 221—227
78. Binding assays in heterogeneous media using a flow injection system with an expanded micro-bed adsorption column / [B. Mattiassona, C. Borrebaeck, B. Sanfridson, K. Mosbach] // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1977. — V. 483. — P. 221—227.
79. Ed. Mosbach K. Methods in Enzymology / K. Ed. Mosbach // London Academic Press. 137, part D. — 1988. — P. 653—655.
80. Song J. M. Miniature biochip system for detection of Escherichia coli O157:H7 based on antibody-immobilized capillary reactors and enzyme-linked immunosorbent assay / J.M. Song, T. Vo-Dinh // *Anal. Chim. Acta.* — 2004. — V. 507, N 1. — P. 115—121.
81. Yang L. Intendigitated array microelectrode based electrochemical impedance immunosensor for detection of Escherichia coli O157:H7 / L. Yang, Y. Li, G. Erf // *Anal. Chem.* — 2004. — V. 76, N 4. — P. 1107-1113.
82. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B employing a piezoelectric crystal immunosensor / [R.M. Carter, M.B. Jacobs, G.J. Lubrano, G.G. Guilbault] // *Anal. Lett.* — 1995. — V. 28, N 7. — P. 1379—1386.
83. Konig, B. Detection of viruses and bacteria with piezoelectric immunosensors / B. Konig, M. Gratzel // *Anal. Lett.* — 1993. — V. 26. — P. 1567-1585.
84. Коновалова О.А. ДНК модифицированный наносенсор на основе пьезокристаллического кварцевого резонатора: Сборник статей / О.А. Коновалова, Р.Ф. Фахруллин, Ф. Мухлисулина // 7-я Всерос. молодеж. науч. школа "Когерентная оптика и оптическая спектроскопия", Казань, 30 октября — 1 ноября 2003. — Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2003. — С. 215—221.

85. Plomer M. Quartz crystal microbalance detection of *Vibrio cholerae* O139 serotype / M. Plomer, G.G. Guibault, B. Hock // *Enz. Microb. Technol.* — 1992. — V. 14, Iss. 3. — P. 230–235.
86. A new antimicrobial susceptibility testing method of *Escherichia coli* against ampicillin by MSPQC / L. Bao, H. Tan, Q. Duan [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* — 1998. — V. 369, Iss. 1–2. — P. 139–145.
87. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B employing a piezoelectric crystal immunosensor / D. Le, F.K. He, T.J. Jiang [et al.] // *J. Microbiol. Meth.* — 1995. — V. 23, Iss. 3. — P. 229–234.
88. Pohanka M. Piezoelectric immunosensor for the direct and rapid detection of *Francisella tularensis* / M. Pohanka, P. Skladal // *Folia microbiol.* — 2007. — V. 52, № 4. — P. 325–330.
89. Сафина Г.Р. Новый пьезокварцевый биосенсор на основе иммобилизованных пектинов для определения патогенных бактерий / Г.Р. Сафина, В. Danlsson // Новые методы и приборы для химических исследований и анализа. Химическое оборудование. Актуальные проблемы химии высоких энергий. Биомолекулярная химия и технология. Тезисы докладов. — 2007. — М.: Граница, 2007. — 213 с.
90. Экспресс диагностика инъекции *Helicobacter pylori* в желудочно-кишечном тракте с применением портативного устройства на основе пьезосенсора / Ю.Е. Силина, Н.Е. Джурбаева, Л.В. Чувашев, Д.Л. Чувашева // *Аналитика России. Материалы 2-й Всеукр. конф. по аналит. химии.* — Краснодар: КубГУ. — 2007. — 441 с.
91. Detection of *Campylobacter* and *Shigella* species in food sample using an array biosensor / [K. Sapsford, A. Rasooly, C. Taitt, F. Ligles] // *Anal. Chem.* — 2004. — V. 76, N 2. — P. 433–440.
92. Magnetic biosensor for the detection of *Yersinia pestis* / M.H.F. Meyer, M. Stehr, S. Bhujji [et al.] // *Journal of Microbiological Methods.* — 2007. — V. 68, N 2. — P. 218–224.
93. Kim G. Nano-particle enhanced impedimetric biosensor for detection of foodborne pathogens / G. Kim, A.S. Om, J.H.J. Mun: [International Conference on Nanoscience and Technology (ICNT and T 2006), Basel, 30 July-4 Aug., 2006]. *Phys. Conf. Ser.* — 2007. — C. 555–559.
94. Кацев А.М. Влияние микотоксина Т-2 на интенсивность биолюминесценции бактерий / А.М. Кацев, О.С. Гойстер, Н.Ф. Стародуб // *Укр. біохім. журн.* — 2003. — Т. 75, № 2. — С. 99–101.
95. The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging / T. Yoshinobu, H. Iwasaki, Y. Ui [et al.] // *Methods.* — 2005. — V. 37. — P. 94–102.
96. Uithoven K.A. Rapid identification of biological warfare agents using an instrument employing a light addressable potentiometric sensor and a flow-through immunofiltration-enzyme assay system / K.A. Uithoven, J.C. Schmidt, M.E. Ballman // *Biosens. Bioelectr.* — 2000. — V. 14, Iss. 10-11. — P. 761–770.
97. Гойстер О.С. Взаємозв'язок метаболічної активності деяких водних організмів з умовами люмінесцентного еко-токсикологічного біотестування / О.С. Гойстер, Г.О. Хмельницький // *Біотехнологія.* — 2009. — Т. 2, № 1. — С. 35–45.
98. Su Xiao-Li. Quantum dot biolabeling coupled with immunomagnetic separation for detection of *Escherichia coli* O157:H7 / Xiao-Li Su, Yanbin Li // *Anal. Chem.* — 2004. — V. 76, N 16. — P. 4806–4810.
99. Брайнина Х.З. Электрохимические методы и сенсоры в анализе биологических жидкостей / Х.З. Брайнина // 6-я Всерос. конф. по электрохим. методам анализа с междунар. участием. — Уфа, 2004. — С. 64–65.
100. Coupling chemometries and electrochemical based sensor for detection of bakeries population / M. Berrettoni, I. Carpam, N. Corradini, P. Conti // *Anal. Chim. Acta.* — 2004. — V. 506, N 1. — P. 95–101.
101. Zhou Guo-Jun. Development of integrated chemiluminescence flow sensor for the determination of adrenaline and isoprenaline / Guo-Jun Zhou, Gu O-Fang Zhang, Hong-Yuan Chen. // *Ibid.* — 2002. — V. 463, N 2. — P. 257–263.
102. Стюард М. Аффинность реакции антиген — антитело и ее биологическое значение. Структура и функция антител / Стюард М.: [пер. с англ.] / [под общ. ред. Л. Плина, М. Стюарда]. — М.: Мир, 1983. — С. 113–114.
103. Сафина Г.Р. Амперометрические иммуноферментные сенсоры для диагностики некоторых инфекционных заболеваний / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Г. Фолина // *Журн. анал. хим.* — Т. 60, № 6. — С. 616–621.
104. Abliz G.Y. Development of a composite optical waveguide sensor for immunoglobulin / G.Y. Abliz, H. Xiuzhu, X. Yitai // *Chem. Lett.* — 2003. — V. 32, N 1. — P. 86–87.
105. Zhihong S. Single-Chain fragment variable antibody piezoelectric immunosensor / S. Zhihong, G.A. Stryker, M. Ray // *Anal. Chem.* — 2005. — V. 77, N 3. — P. 797–805.
106. Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor / [R.M. Wadkins, J.P. Golden, L.M. Pritsiolas, F.S. Ligler] // *Biosensors and Bioelectronics.* — 1998. — V. 13, Iss. 3-4. — P. 407–415.
107. Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor / [G.P. Anderson, K.D. King, K.L. Gaffney, L.H. Johnson] // *Ibid.* — 2000. — V. 14. — P. 771–777.
108. Золотов Ю.А. Микрофлюидные системы для химического анализа / Ю.А. Золотов, В.Е. Курочки. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2011. — 528 с.
109. Ruan Chuamin Immunobiosensor Chips for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using electrochemical impedance spectroscopy / Chuamin Ruan, Liju Yang, Yanbin Li / Ruan Chuamin, Yang Liju, Li Yanbin. // *Anal. Chem.* — 2002. — V. 74, N 18. — P. 4814–4820.
110. Burcu Meric. Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4,4'-dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals / Meric Burcu, Kerman Kagan, Ozkan Dilsat. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2002. — V. 30, N 4. — P. 1339–1346.
111. La-Scalea M.A. Voltammetric behavior of benzimidazole at a DNA-electrochemical biosensor / M.A. La-Scalea, S.H.P. Serrano, E.I. Ferreira / La-Scalea M. A., Serrano S. H. P., Ferreira E. I. // *Ibid.* — 2002. — V. 29, N 3. — P. 561–568.

Надійшла до редакції 13.03.2012 р.