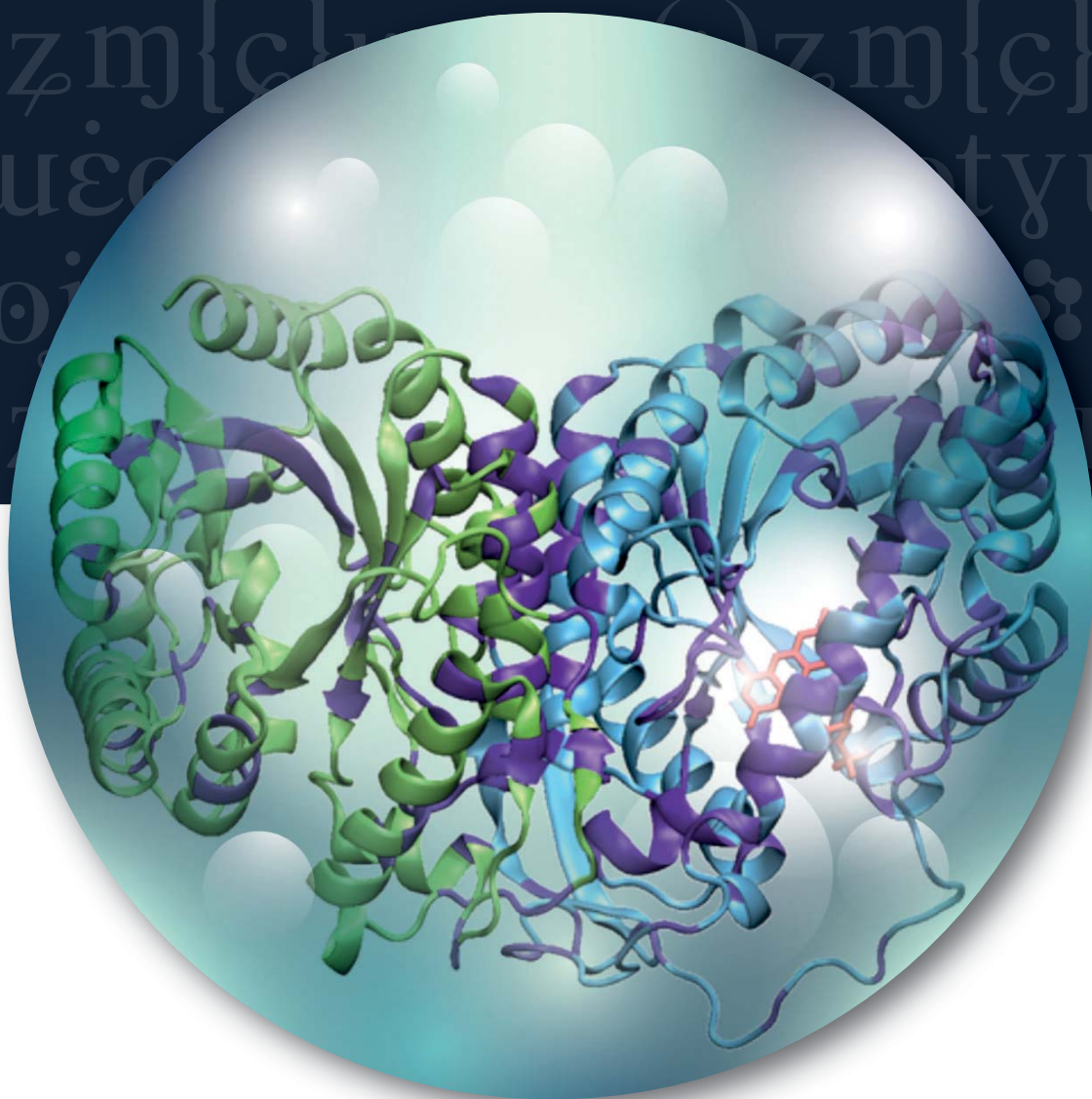




СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОТЕСТЫ:  
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ**

УДК 591.148  
ББК 28.071.13  
Б634

*Подготовлено при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-10115)  
и Министерства науки и образования РФ (государственное задание  
на выполнение работ, проект № 6.7734.2017/БЧ)*

*Авторский коллектив:*

|                  |                 |
|------------------|-----------------|
| Е.Н. Есимбекова, | Н.С. Кудряшева, |
| В.А. Кратасюк,   | С.Е. Медведева, |
| Е.В. Немцева,    | М.А. Кириллова  |

*Рецензенты:*

А.Б. Салмина, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, зав. кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, проректор по инновационному развитию и международной деятельности ФГБОУ ВО КрасГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Д.И. Стом, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией водной токсикологии НИИ биологии, профессор биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет»

Б634

**Биолюминесцентные биотесты: современное состояние и перспективы** : монография / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева [и др.] ; под ред. В.А. Кратасюк. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2018. – 256 с.

ISBN 978-5-7638-3910-4

*Рассмотрены проблемы биологических методов тестирования окружающей среды. Представлены современные методы биотестирования на основе светящихся организмов и выделенных из них ферментативных систем. Приведены примеры использования биолюминесцентных методов в избирательном и интегральном анализе сред. Особое внимание уделено методам на основе ферментов светящихся бактерий, преимуществам их использования в биолюминесцентном биотестировании. Изучены способы стабилизации ферментов светящихся организмов и примеры их использования в качестве биологического модуля биосенсоров.*

*Предназначена для специалистов, ведущих исследования в области экологической токсикологии, биотехнологии, биофизики и смежных областях, аспирантов и студентов, обучающихся по этим направлениям.*

**Электронный вариант издания см.:**  
<http://catalog.sfu-kras.ru>

**УДК 591.148**  
**ББК 28.071.13**

ISBN 978-5-7638-3910-4

© Сибирский федеральный университет, 2018

# ОГЛАВЛЕНИЕ

---

|   |    |
|---|----|
| СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ.....  | 6  |
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 8  |
| Глава 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ<br>ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....                                       | 13 |
| 1.1. Многообразие биологических методов тестирования.....   | 14 |
| 1.2. Проблемы биотестирования.....  | 18 |
| 1.3. Перспективы использования биолюминесцентных методов<br>в биотестировании.....                        | 21 |
| Глава 2. ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ГРИБОВ<br>В БИОТЕСТИРОВАНИИ.....                                     | 22 |
| Глава 3. МЕТОДЫ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА<br>С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНОЙ<br>БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ.....     | 28 |
| 3.1. Основные принципы разработки биолюминесцентных<br>биотестов на основе бактерий.....                  | 28 |
| 3.2. Влияние химических веществ различной природы<br>на люминесценцию бактерий.....                       | 31 |
| 3.3. Биотесты на основе лиофильно высушенных клеток.....  | 34 |
| 3.4. Биотесты на основе рекомбинантных клеток бактерий.....   | 36 |
| 3.5. Биотесты на основе иммобилизованных клеток бактерий.....   | 40 |
| 3.6. Примеры использования биолюминесцентных биотестов<br>в экологическом мониторинге.....                | 44 |
| Глава 4. МЕТОДЫ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА,<br>ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ<br>ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ..... | 52 |
| 4.1. Селективные методы биолюминесцентного анализа <i>in vitro</i> .....                                  | 52 |
| 4.1.1. Применение биолюминесцентной ферментной системы<br>светляков.....                                  | 52 |
| 4.1.2. Применение биолюминесцентной ферментной системы<br>бактерий.....                                   | 59 |
| 4.2. Интегральные методы биолюминесцентного анализа <i>in vitro</i> .....                                 | 62 |
| 4.2.1. Предпосылки для разработки ферментативных методов<br>биотестирования.....                          | 62 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.2. Принципы биолюминесцентного биотестирования <i>in vitro</i> .....                               | 66  |
| 4.3. Построение сигнальной системы биолюминесцентных тестов.....                                       | 70  |
| 4.3.1. Принципы конструирования биолюминесцентных тестов <i>in vitro</i> .....                         | 70  |
| 4.3.2. Применение сигнальной системы биотестов для анализа пестицидов .....                            | 75  |
| <br>   |     |
| Глава 5. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ.....               | 82  |
| 5.1. Влияние экзогенных соединений на процессы переноса энергии в биолюминесцентной системе .....      | 82  |
| 5.2. Воздействие ксенобиотиков на процессы переноса электрона в биолюминесцентной системе.....         | 87  |
| 5.3. Влияние молекул на процессы переноса водорода в биолюминесцентной системе.....                    | 91  |
| 5.4. Взаимодействие экзогенных соединений с ферментами биолюминесцентной системы.....                  | 94  |
| <br>   |     |
| Глава 6. НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВ <i>IN VITRO</i> .....                           | 101 |
| 6.1. Биолюминесцентные методы в экологии.....  | 101 |
| 6.1.1. Биолюминесцентный метод анализа токсичности воды ...  | 101 |
| 6.1.2. Биолюминесцентный метод оценки радиотоксичности растворов.....                                  | 115 |
| 6.1.3. Способы оценки эффективности детоксикации природными гуминовыми веществами.....                 | 134 |
| 6.2. Биолюминесцентные методы <i>in vitro</i> в пищевой промышленности.....                            | 143 |
| 6.3. Биолюминесцентные методы <i>in vitro</i> в медицине .....   | 147 |
| 6.4. Анализ стресса растений биолюминесцентными методами .....   | 151 |
| <br>   |     |
| Глава 7. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА.....                                   | 155 |
| 7.1. Способы стабилизации ферментов .....  | 155 |
| 7.2. Методы стабилизации ферментов светящихся организмов .....   | 159 |
| 7.3. Имобилизованные реагенты для ферментативного биотестирования.....                                 | 165 |
| 7.3.1. Выбор условий иммобилизации биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза ..... | 165 |

|   |     |
|---|-----|
| 7.3.2. Разработка многокомпонентного иммобилизованного реагента .....   | 167 |
| 7.4. Сравнение характеристик иммобилизованной и растворимой биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза ..... | 170 |
| 7.5. Способы увеличения чувствительности иммобилизованных реагентов .....   | 175 |
| 7.6. Методика биотестирования с использованием реагента «Энзимоллюм» .....  | 183 |
| <br>  |     |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 187 |
| <br>  |     |
| ПОСЛЕСЛОВИЕ .....   | 187 |
| <br>  |     |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....  | 195 |

## ВВЕДЕНИЕ

---

Коллектив авторов этой книги поручил мне написать введение к ней. Размышления над текстом монографии, выстраданным в течение многих лет, потому что текст был написан на основе многих публикаций соавторов монографии, являющихся результатом более чем 40-летнего периода использования светящихся бактерий и их ферментов для экологического мониторинга, подталкивали меня отойти от привычного изложения введений к монографии, а подобно авторам «Двойной спирали» [1], рассказать об увлекательном процессе появления нового направления в биомониторинге – ферментативных биолюминесцентных биотестах. И тогда, как у Дж. Уотсона, можно было бы показать, «что наука вопреки мнению непосвященных редко развивается по прямому логическому пути. На самом деле, каждый ее шаг вперед (а иногда и назад) – очень часто событие глубоко личное, в котором главную роль играют человеческие характеры и национальные традиции». Конечно, в этом случае изложение истории открытия оказалось бы романтическим, как и было в реальности, но и одновременно довольно субъективным. Замечания соавторов были вполне справедливы: они считали, что такой текст противоречит стилю научной книги, а больше подходит для мемуаров; поэтому введение к монографии стало серьезным. Однако текста, написанного об истории открытия, все-таки жалко, потому мы поместили его как послесловие.

Систематический мониторинг состояния всех природных компонентов: воздуха, водных объектов, почвы и др. – является первоочередным в числе мероприятий по улучшению качества окружающей среды и имеет крайне важное значение для последующих природоохранных мер.

В государственной политике РФ вопросы экологии имеют приоритетное значение. В соответствии с нормативными актами РФ в области охраны окружающей среды система наблюдения за уровнем загрязнения природных объектов проводится по физическим, химическим, гидробиологическим показателям (для водных объектов). Однако, несмотря на совершенствование действующих мер во всех направлениях экологической политики, используемые в настоящее время методы мониторинга часто не отражают реальной ситуации. Так, например, перечень загрязняющих веществ, определяемых в атмосферном воздухе государственными экологическими службами, осуществляющими наблюдения на территории области или края, составляет обычно 25–30, а в водных объектах, имеющих рыбохозяйственное значение, – 35–40 наименований. В действительности же количество загрязняющих веществ может исчисляться сотнями. Увели-



чение числа определяемых загрязняющих веществ, безусловно, позволит получить более подробную картину состояния среды, но в то же время потребует увеличения времени пробоотбора, анализа, обработки результатов, а значит, стоимости анализа.

Современные методы химической оценки загрязнения объектов окружающей среды имеют ряд существенных недостатков, таких как сложная предварительная обработка образца, длительное время обнаружения и др. Но главным является то, что они не показывают потенциальные эффекты, оказываемые опасными веществами на живой организм [2; 3]. Эту задачу комплексной оценки реакции отдельных живых организмов на воздействие различных загрязнителей решают методики биотестирования для анализа безопасности различных сред [4; 5].

Особое место среди методов биотестирования занимают биолюминесцентные, применяемые для проведения первичного интегрального анализа объектов окружающей среды и характеризующиеся простотой, быстротой выполнения, относительно низкой стоимостью и возможностью проведения исследований в полевых условиях. Биолюминесцентные методы обладают хорошей чувствительностью к разнообразным химическим соединениям, характерным для промышленных сбросов, загрязнений почвы, воды, воздуха (тяжелые металлы, фенолы, формальдегид, пестициды и т.д.). Уровень тушения биолюминесценции пропорционален концентрации токсических веществ. Специальная светорегистрирующая аппаратура (био- и хемилюминометры) позволяет измерять интенсивность свечения реагента до и после введения неизвестного токсиканта в образце небольшого объема (0,2–0,5 мл). Время анализа, который можно проводить также и в полевых условиях, обычно не превышает нескольких минут.

Биолюминесцентные биотесты предпочтительны в качестве первичных тестов для скринингового быстрого ответа на вопрос о том, присутствуют или нет в среде токсические агенты в концентрации, опасной для человека и других живых организмов. Если промышленное предприятие выбрасывает во внешнюю среду преимущественно один тип токсического вещества, ответ биолюминесцентного биотеста позволяет судить о концентрации данного соединения и тогда отпадает необходимость в дополнительных методах анализа [6–10].

Высокая скорость, доступность реагентов и простота процедуры анализа определяют еще одно важнейшее преимущество биолюминесцентных тестов – возможность проведения большого количества измерений в сопоставимых условиях, что обеспечивает статистическую достоверность анализа. Это свойство выгодно отличает биолюминесцентные тесты от классических биотестов, основанных на многоклеточных организмах.

Монография посвящена рассмотрению вопросов перспективности использования биолюминесцентных организмов в биотестировании. Для подтверждения актуальности развития этого нового направления в экологическом мониторинге – биолюминесцентных биотестов – в первой главе изучено современное состояние и проблемы биологических методов тестирования окружающей среды. Несмотря на многообразие биотестов, существуют проблемы при их использовании, которые систематизированы для того, чтобы показать необходимость в биолюминесцентных биотестах, так как существует надежда, что именно использование явления «живого свечения» поможет решить современные проблемы биотестирования.

В главе 2 описывается использование свечения грибов в биотестах «ждущего типа». На примере грибов показано, каким образом новые, недавно обнаруженные светящиеся организмы могут быть использованы в качестве тест-объектов в методах биотестирования.

В главе 3 представлены биотесты с использованием светящихся бактерий, основанные на влиянии химических веществ различной природы на люминесценцию бактерий. Рассмотрены особенности биотестов на основе лиофильно высушенных, рекомбинантных и иммобилизованных клеток бактерий. В этой главе приведены многочисленные примеры использования светящихся бактерий в биотестах для экологического мониторинга. В настоящее время биотесты на светящихся бактериях широко применяются в экологическом мониторинге и являются самыми быстрыми и чувствительными к широкому классу органических соединений, пестицидов, тяжелых металлов и других поллютантов. Однако при всех достоинствах они имеют и ряд недостатков. (Впрочем, для справедливости следует заметить, что этими недостатками обладают и другие биотесты с использованием в качестве тест-объектов живых организмов.) Выявленные недостатки классических биотестов явились причиной успешной попытки использовать в биотестах ферменты вместо живых организмов. Особенно перспективной эта идея оказалась для создания нового направления биотестирования – ферментативные биолюминесцентные биотесты. Биолюминесцентным методам, основанным на использовании ферментативных реакций, посвящены три последующие главы монографии. Рассматриваются две основные ферментативные системы – светляков и бактерий – и их применение в избирательном и интегральном анализе. Особое внимание уделяется ферментам светящихся бактерий, которые имеют очевидные преимущества для использования в биолюминесцентных биотестах и биосенсорах.

Глава 4 монографии посвящена построению сигнальной системы биолюминесцентных тестов. И тут мы обращаем внимание читателей на методологию конструирования новых методов анализа, которые проде-



монстрированы на примере сигнальной системы биолюминесцентных тестов для анализа пестицидов.

Глава 5 посвящена рассмотрению механизмов влияния экзогенных соединений на биолюминесценцию, которые являются фундаментальной основой биолюминесцентных биотестов.

Таким образом были созданы основы, или платформенная технология, для использования ферментов светящихся организмов в различных направлениях, на основе которой были сформированы люминесцентные тесты *in vitro* (в первую очередь для экологического мониторинга воды и почвы), оценки радиотоксичности растворов, методы оценки эффективности детоксикации природными гуминовыми веществами. Помимо этого на основе платформенной технологии были предложены биолюминесцентные методы *in vitro* для пищевой промышленности и медицины, а также для анализа стресса у растений и др. Вся эта информация представлена в главе 6.

Преимуществами использования ферментативных тестов являются экспрессность (длительность анализа – не более 3–5 минут), высокая чувствительность, простота процедуры измерения, возможность автоматизации экологического мониторинга, доступность и безопасность реагентов, широкий рынок биолюминометров.

Ферментативным реагентам посвящена глава 7, в которой рассматриваются способы стабилизации ферментов светящихся организмов. К наиболее эффективным способам сохранения высокой активности ферментов во время анализа и при хранении является иммобилизация. В этой главе также демонстрируются новые подходы биохимического или биотехнологического конструирования при выборе условий иммобилизации для получения многокомпонентного иммобилизованного реагента «Энзимолум», обеспечивающие увеличение чувствительности анализа при использовании данного реагента.

Авторы монографии благодарны всем исследователям, работы которых цитируются в этой монографии, всем сотрудникам кафедры биофизики, лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Сибирского федерального университета, лабораторий фотобиологии и нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики (Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»).

Работа является итогом исследований, финансируемых по грантам: 6.7734.2017/БЧ «Роль макромолекулярного краудинга в регуляции эффективности сопряжения ферментов метаболических путей светящихся бактерий» (Министерство образования и науки РФ, Государственное задание); 16-06-00439 «Экспертная оценка здоровья человека: фундаментальные исследования»; 13-04-01305 «Воздействие трития на морские светящие-

ся бактерии. Радиационный гормезис и радиационная токсичность»; 15-43-04377-р\_сибирь\_а «Биолюминесцентные системы как инструмент оценки антиоксидантной активности физиологически-активных веществ»; 10-05-01059-а «Детоксикация радиоактивных растворов гуминовыми веществами. Биологический мониторинг»; 09-08-98002-р\_сибирь\_а «Закономерности влияния ионизирующего излучения на светящиеся бактерии как биологическая основа биосенсора на радиотоксичность» (РФФИ); 16-14-10115 «Новая методология комплексной экспрессной оценки качества и загрязнения почвы на основе ферментативных биолюминесцентных систем» (РНФ); 16-44-242126 «Разработка научных основ новой экспрессной биотехнологии биотестирования для продовольственной безопасности и контроля качества овощей и фруктов» (КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» и РФФИ); КФ-487 «Эколого-биохимические методы оценки токсичности техногенных наноматериалов»; № 46/15 «Биолюминесцентный экспрессный анализ для мониторинга загрязнения почвы Красноярского края»; КФ-257 «Современный школьный биолюминесцентный практикум» (Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности); 11.G34.31.0058 «Биолюминесцентные биотехнологии» (Постановление Правительства РФ 220); 02.740.11.0766 «Биолюминесцентный анализ молекулярных процессов в клетках и их физико-химических моделях; создание биолюминесцентных сенсоров для биологии и медицины»; 2.2.2.2/5309 «Моделирование процессов функционирования сопряженных ферментативных систем в клетке на примере ферментов светящихся бактерий» (Министерство образования и науки РФ); 14.513.11.0123 «Разработка научно-технических основ создания экспрессной биолюминесцентной тест-системы для оценки токсичности наноматериалов»; 14.A18.21.1911 «Биолюминесцентные сенсоры для определения токсичности на основе микрофлюидной технологии» (Федеральные целевые программы); НШ-3951.2012.4 и НШ-64987.2010.4 «Научная школа академика И.И. Гительсона» (Президент РФ); RUX0-002-KR-06/ВР4М02 «Биолюминесцентные биосенсоры для экологического мониторинга: стабилизация биологического модуля» (CRDF) и др.

*Доктор биологических наук,  
профессор Валентина Кратасюк*

# Глава 1

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

---

Крайне важным в настоящее время является поиск аналитических систем для экспрессной оценки токсичности, а значит, и контроля состояния биологических систем различной сложности (от экосистемы до отдельного организма). Актуальны и вопросы о качестве природных вод. Для решения этих проблем используют главным образом два подхода: химический и биологический.

Традиционно применяется химический анализ компонентов водной среды, где основным критерием токсичности является превышение содержания токсикантов по сравнению с ПДК. Этот метод отличается исключительной избирательностью и точностью, его недостатки – длительность, невозможность идентификации всех веществ (в настоящее время используют более двух миллионов токсических веществ) и, что наиболее важно, отсутствие указаний на биологический эффект. Действительно, в природной воде одна часть химических соединений образует комплексы с гуминовыми и фульвокислотами и таким образом теряет свою физиологическую активность; другая часть оказывает на живые организмы или суммарное, или антагонистическое воздействие. Учет указанных процессов необходим для правильной оценки экологической опасности химических веществ, поступающих в природные воды. В настоящее время специалистами в области охраны природы признана несостоятельность химического контроля в части предоставления совершенной и полной информации о качестве водных экосистем [11; 12].

Второй подход состоит в определении токсичности среды непосредственно при действии ее на живой организм – это методы биоиндикации и биотестирования. В первом случае у свободноживущих организмов исследуют видимые или незаметные повреждения (или отклонения от нормы), являющиеся признаками стрессового воздействия. Например, исчезновение некоторых видов микроорганизмов (*Vorticella microstoma*, *Litonotus lamella*, *Colpidium colpoda*, *Notommata ansata*, *Cathypna luna*, *Monostula cornuta*, *Epystilis plicatilis*, *Vorticella campanula*) является индикатором на содержание в среде хрома, цинка и меди в концентрациях, превышающих ПДК [13]. Для определения содержания в среде тяжелых металлов предлагается также использовать пионерское сообщество организмов обрастания, отобранных в месте предполагаемого загрязнения и в месте сравнения [14]. Во втором случае пытаются обнаружить степень воздействия токсических веществ или

анализируемых образцов воды, почвы и воздуха на параметры жизнедеятельности тестовых организмов, культивируемых в искусственно поддерживаемых стандартных условиях в лабораторных экспериментах [15].

При проведении биотестирования исследователи используют несколько основных терминов, часто вкладывая в них разный смысл; поэтому прежде всего необходимо определить значение употребляемых нами в дальнейшем терминов. Под токсичностью мы будем понимать степень проявления действия (повреждение, ингибирование, генетические изменения и т.д.) разнообразных соединений и их смесей на тест-объекты. Тест-реакция – это изменение какого-либо морфологического, биохимического, поведенческого или функционального показателя у тест-объекта под воздействием токсикантов или их смесей. За критерий токсичности принимается достоверное количественное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности сточной воды или вещества. Среди тест-параметров наиболее часто используются смертность, выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной активности тест-организмов [15]. Привлекательность биологического тестирования для исследователей заключается в том, что оно позволяет оценить антропогенное воздействие на среду обитания в показателях, имеющих биологический смысл. Более того, использование биологических методов позволяет исследователям получать интегральную характеристику качества объекта окружающей среды, указывающую на токсичность конкретного анализируемого объекта для живых организмов.

В литературе обсуждаются шесть основных направлений приложения биотестов: эколого-токсикологический скрининг, биотестирование с целью установления рыбохозяйственных ПДК, биотестирование сточных вод и применение биотестов для оперативного выявления аварийных ситуаций, использование их для контроля токсичности природных вод, аналитическое биотестирование, использование гидробионтов (в основном рыб и макробеспозвоночных) в качестве тест-объектов для оценки тератогенности, мутагенности и канцерогенности новых пестицидов, фармацевтических препаратов и других продуктов органического синтеза [16].

## **1.1. МНОГООБРАЗИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ТЕСТИРОВАНИЯ**

В настоящее время разработано более 200 методов биотестирования для выявления эффектов различных воздействий на состояние природной среды. Более доступны и легко учитываются результаты острых опытов,

в которых основным критерием является смертность (или обратная величина – выживаемость) тест-объекта в процентах к контролю, принимаемому за 100 %. Острые биотесты оперативно отвечают на интересующий каждого потребителя основной вопрос: представляет ли тестируемый образец непосредственную опасность для жизни? Хронические тесты, оценивающие опасность токсикантов для сохранения и воспроизводства популяций различных организмов, отвечают на тот же вопрос, но с точки зрения долгосрочной перспективы для надорганизменных структур. Некоторые из используемых в настоящее время тест-объектов представлены в табл. 1.1.

Из табл. 1.1 видно, что в биотестировании используют организмы из разных таксономических единиц эволюционного дерева. Осуществляется биотестирование на разных уровнях организации живого (макромолекула, клетка, орган, организм, популяция). Необходимо отметить, что каждый вышестоящий уровень представляет собой систему, в которую входит нижележащий уровень как компонент (элемент) со всеми составляющими.

Многие авторы считают наиболее перспективным построение измерительно-вычислительных средств на основе эффектов, наблюдаемых не на отдельных особях, а на целой группе (популяции) организмов. Поэтому наиболее удобными для включения в измерительную систему считаются бактерии, простейшие, одноклеточные водоросли и др. [127].

Классический объект биотестирования – дафнии. Именно они прошли аттестацию Государственной научно-технической комиссии по отбору и апробации биотестов и включены в качестве обязательных объектов в схему установления ПДК загрязняющих веществ в водах России. Преимущества дафний очевидны: они имеют достаточно короткий жизненный цикл (8–12 дней), легко культивируются в лабораторных условиях, их морфологические особенности дают возможность проводить микроскопические наблюдения, регистрировать малейшие изменения в тканях и органах. В водной токсикологии многие склонны считать дафнию таким же общепринятым тест-организмом, каким является дрозофила в генетике [128].

Таблица 1.1

## Биологические методы тестирования

| Царство                  | Тест-объект   |   | Измеряемые параметры  | Литература         |
|--------------------------|---|---|---|--------------------|
|                          | Тип/Отдел   | Представители   |   |                    |
| Бактерии<br>(Bacteria)   | Протеобактерии<br>(Proteobacteria)  | <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> ,<br><i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Sarcina lutea</i><br><i>B-110</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Rhodococcus</i><br><i>erythropolis</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Vibrio</i><br><i>fischeri</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Photobacterium</i><br><i>phosphoreum</i> , <i>Photobacterium leiognathi</i> | Смертность, скорость роста, интенсивность свечения  | [17–33]            |
| Простейшие<br>(Protozoa) | Инфузории<br>(Ciliophora)   | <i>Colpoda steinii</i> , <i>Paramecium caudatum</i> ,<br><i>Spirostomum ambiguum</i> var. <i>Major Ehrbg.</i> ,<br><i>Tetrahymena pyriformis</i> , <i>Stylonychia curvata</i> ,<br><i>Stylonychia mytilus</i>   | Смертность, скорость прироста, двигательная активность, дыхательная активность, хемотаксическая реакция   | [23, 34–42]        |
| Хромиста<br>(Chromista)  | Динофлагелляты<br>(Dinophyta)   | <i>Pyrocystis lunula</i>  | Интенсивность свечения  | [43–45]            |
| Растения<br>(Plantae)    | Зелёные водоросли<br>(Chlorophyta),<br>харофитовые<br>водоросли<br>(Charophyta) | <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Dunaliella salina</i> ,<br><i>Nitella flexilis</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> ,<br><i>Selenastrum capricornutum</i> ,<br><i>Scenedesmus obliquus</i>  | Численность клеток, флуоресценция и фотосинтез клеток <i>in vivo</i> , сухой и сухой вес, морфологические изменения клеток, содержание хлорофилла А и АТР, подвижность клеток, скорость прорастания зооспор | [33, 37,<br>46–55] |
|                          | Сосудистые<br>растения<br>(Tracheophyta)  | <i>Lemna minor</i> , <i>Elodea canadensis</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>табак</i> <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Allium fistulosum</i>  | Биоаккумуляция тяжелых металлов в цитоплазматических вакуолях, скорость роста побегов в длину, содержание хлорофилла, ксантофилла, каротина, пролина  | [56–65]            |
| Грибы<br>(Fungi)         | Аскомицеты<br>(Ascomycota),<br>Базидиомицеты<br>(Basidiomycota)                 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,<br><i>Pleurotus ostreatus</i>   | Смертность, количество мутантных форм колоний, количество морфозов, изменение размеров колоний, регистрация изменений pH, детектирование паров фенола в воздухе рабочей зоны                                | [66–74]            |



|                               |   |  |  |               |
|-------------------------------|---|--|--|---------------|
| Животные (Animalia)           |   |  |  |               |
| Стрекающие<br>(Cnidaria)      | <i>Hydra attenuata Pallas, Hydra vulgaris Pallas, Hydra magnipapillata</i>  |  | Функциональные и морфологические изменения (состояние тела и щупалец, скорость восстановления поврежденных частей тела)  | [75–79]       |
| Кольчатые черви<br>(Annelida) | <i>Eisenia fetida, Nereis (Neanthes) virens, Tubifex tubifex, Hirudo medicinalis</i>  |  | Содержание ксенобиотиков в тканях, изменение репродуктивной функции, поведенческие реакции (смена статического состояния на динамичное)  | [80–88]       |
| Моллюски<br>(Mollusca)        | <i>Modiolus demissus, Arion ater, Mercenaria mercenaria, Limnaea stagnalis, Nassarius obsoletus, Mytilus edulis, Ostrea edulis</i>  |  | Выживаемость, скорость роста, поведенческие реакции, выделение слизи, гидратация тела, действие на пищеварительные железы, характер эмбрионального развития, индекс кондиции моллюды, гонадный индекс                                  | [48; 89–96]   |
| Членистоногие<br>(Arthropoda) | <i>Ampelisca abdita, Ceriodaphnia dubia, Daphnia magna, Diporeia, Eohaustorius estuarius, Gammarus pulex, Gammarus duebeni, Gammarus lacustris, Leptocheirus plumulosus, Moina macrocopa, Scotopteryx mucronata, Cyclopsis reticulata, Simocephalus vetulus, Palaemon serratus, Artemia larvae</i><br><i>Musca domestica (муха)</i> |  | Смертность, активность ферментов, плодовитость, поведенческие реакции (избегание загрязненной среды, время выхода из камеры тестирования на свет), линейный рост, сроки полового созревания, пищевая активность                        | [97–106]      |
| Иглокожие<br>(Echinodermata)  | <i>Uemicentrotus pulcherrimus, Anthocidaris crassispina, Pseudocentrotus depressus, Evechinus chloroticus, Hemicecentrotus pulcherrimus</i>   |  | Процент выживших личинок   | [107–109]     |
| Хордовые<br>(Chordata)        | <i>Cyprinus carpio (сазан), Perca fluviatilis (окунь), Stenopharyngodon idella (белый амур), Hyporhamphichthys harmandi (толстолобик), Phoxinus phoxinus (гольян), Oncorhynchus tshawytscha (чавыча), Salmo salar (лосось), Danio rerio (Zebrafish)</i>   |  | Характер эмбрионального развития, число и размер ядрышек в клетке. Тест-объекты: икра, сперма, гаметы  | [89; 110–115] |
|                               |   |  | Содержание ксенобиотиков в мышцах и икре, электрическая проводимость крови, биохимические показатели крови, поведенческие реакции (уход из токсичной среды), функциональное состояние (погребление кислорода, устойчивость к гипоксии) | [116–126]     |

Помимо дафний в Государственный реестр экологического контроля внесены водоросли (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*), лиофилизированные генетически модифицированные бактерии (*Escherichia coli*), святающиеся бактерии, инфузории (*Paramecium caudatum*), рыбы (*Poecilia reticulata* Peters, *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan).

## 1.2. ПРОБЛЕМЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Биологический контроль состояния окружающей среды поставил много новых вопросов, касающихся общей методологии этого подхода, непосредственного исполнения контроля состояния среды с помощью биологических объектов, принципов нормирования выбросов и, наконец, медико-биологических проблем биологического контроля [80; 129–131].

Актуальна проблема оценки результатов каждого конкретного исследования и решения вопроса о наличии токсического эффекта. Некоторые авторы, например, полагают, что значения ПДК часто необоснованно завышаются, т.е. патологическим считается любое незначительное отклонение от нормы [132]. По их мнению, предельную нагрузку необходимо рассматривать как критическую точку на кривой «доза – эффект», связывающей входные (нагрузки) и выходные (отклики тестов) параметры. Под критической точкой понимается начало наиболее стремительного изменения параметров.

Кроме того, практически отсутствуют пособия о порядке осуществления экотоксикологического и производственного контроля качества вод. Книгу Н.С. Жмур можно считать редким исключением из правила [11].

Довольно часто для оценки состояния биоценоза используют один биотест (обычно разработанный самим автором, стремящимся показать его преимущества перед другими биотестами). Возможно, какой-то один из биотестов действительно является идеальным для определения, например, качества воды, но при этом важен вопрос об объекте, для которого качество воды определяется. Если задача состоит в установлении безопасности употребления воды человеком, тогда лучшим биотестом является сам человек, а остальные следует признать лишь приближением к нему. Действительно, из анализа литературных данных понятно, что отсутствие реакции конкретного биотеста говорит не об отсутствии загрязнения, а о недостаточной чувствительности используемого тест-объекта к веществам – поллютантам. Верно и обратное: изменение параметров конкретного биотеста может не означать, что данная среда является токсичной для

человека. Даже такой классический тест-объект как дафнии не отражает реальной опасности для человека. По данным ряда авторов [133], отсутствие гибели дафний не гарантирует безопасности воды для человека. В то же время наличие гибели дафний не является абсолютным показателем непригодности воды для питья.

Результаты тестирования воды, загрязненной бытовыми и промышленными отходами, отработанными материалами из карьеров и отходами ЦБК, с помощью рачков *Gammarus pulex* также были неоднозначны. Было показано, что смертность животных зависела, прежде всего, от интенсивности их питания, которая определялась главным образом врожденными особенностями популяции и не коррелировала с типом и абсолютным уровнем загрязнения воды. Результаты тестирования, проводившегося по одинаковой схеме в двух лабораториях, значительно различались, что объяснялось разными методами оценки эффективности питания. Авторы делают вывод о возможности использования *Gammarus pulex* в качестве тест-объекта, но предупреждают, что результаты биотестирования могут в значительной степени зависеть от источника получения тест-организмов и используемых в конкретной лаборатории методов [134].

Итак, по результатам одного биотеста нельзя судить о степени токсичности воды для человека. В этом случае можно говорить лишь о реакции биотеста на исследуемую среду.

Поскольку трудно себе представить, что существует единственный биотест, реакция которого на загрязнение полностью соответствует реакции человека, все больше исследователей понимают необходимость создания и использования в биомониторинге объектов окружающей среды комплекса биотестов [135–137]. Каждый из биотестов, претендующих на включение в экспертную систему, должен удовлетворять жестким требованиям, предъявляемым к ним [138]: доступность, простота культивирования тест-объектов; возможность четкой регистрации эффектов; простота техники выполнения биотеста; экспрессность; точность, воспроизводимость и достоверность результатов; достаточно высокая чувствительность; экономичность.

Понятно, что в зависимости от цели исследований экспертная система биотестов может состоять из разного набора методов. Если цель исследования – установление биологических норм, «здоровье экосистемы», то при этом в первую очередь необходимо определить звено, выпадающее из круговорота веществ в водоеме. В этом случае экспертная система биотестов должна состоять из тест-организмов, являющихся представителями основных звеньев трофической цепи (продуценты, консументы и редуценты). Таким образом, при определении ущерба, наносимого загрязнением водных экосистем, сначала пытаются выявить наиболее подверженные

воздействию организмы, т.е. наиболее чувствительные звенья трофических цепей (так называемые узкие звенья), которые поражаются и, следовательно, выбиваются первыми [139].

Если цель исследований состоит в определении степени токсичности среды для человека, вероятно, при создании системы биотестов следует переходить на более универсальный для всех живых организмов уровень – физико-химический. Представление о том, что в основе нормальной жизни лежит сложно организованная сопряженная деятельность многих ферментных систем, естественно позволяет предположить, что проявления дезорганизации отдельных звеньев этой деятельности может привести к различным патологиям. Поскольку общепризнанным является тот факт, что у всех живых существ, несмотря на разнообразие субстратов, участвующих в обмене веществ, в том числе и специфических для данного организма, основные типы реакций являются общими [140], то по изменению активности выделенных ферментов под действием поллютантов можно судить о биохимических механизмах воздействия этих веществ не только на тест-объект, но и на организм человека. Таким образом, использование выделенных ферментов в качестве биотестов позволяет создать универсальную систему и расширить круг вопросов, решаемых с ее помощью. Действительно, включив в систему ферменты, являющиеся представителями различных классов, или ключевые ферменты метаболических процессов живых организмов, можно определить, какая из функций жизнедеятельности организмов будет угнетаться тем или иным токсикантом либо смесью токсических веществ.

В настоящее время уже сформулированы некоторые требования к системе биотестов:

1) для минимизации количества биотестов необходимо, чтобы результаты биотестов, входящих в систему, не коррелировали между собой [141];

2) для увеличения точности результатов биотестов необходим переход от живого объекта к реактиву [142], т.е. переход на физико-химический уровень;

3) выбор тест-объектов для включения в систему, по-видимому, должен происходить эмпирическим методом, отбирая наиболее чувствительные к веществам-поллютантам тест-объекты [132].

Всем перечисленным требованиям отвечают биолюминесцентные методы анализа, основанные как на живых организмах, излучающих видимый свет, так и на особых ферментах – люциферазах, переводящих с высокой квантовой эффективностью энергию биохимических реакций в излучение оптического диапазона.

### 1.3. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ В БИОТЕСТИРОВАНИИ

Биолюминесценция обеспечивает потенциально неограниченные, но все еще мало используемые возможности для создания широкого спектра принципиально новых методов анализа, совмещающих в себе преимущества быстрой неспецифической системы детекции с возможностью сверхчувствительной специфической идентификации отдельных соединений, стабильность реагентов с возможностью проведения анализов в полевых условиях и простотой в обращении. Это, прежде всего, обусловлено тем, что в настоящее время хорошо развита методология и приборное обеспечение для преобразования слабых световых потоков в электрические сигналы. В книге Д.Г. Дерябина [143] подробно изложены принципы регистрации биолюминесценции, приведены основные характеристики био- и хемилюминометров отечественного и зарубежного производства. Кроме того, для биологических компонентов (люцифераз и люциферинов), необходимых для создания биолюминесцентных методов, разработаны способы выделения и получения модифицированных ферментов с улучшенными характеристиками [144–150].

Особенно активно в биолюминесцентном анализе используется биолюминесценция светляков и генетически модифицированных бактерий, несущих гены люминесцентной системы природных светящихся организмов (бактерий, светляков, кишечнорастворимых). Новые свойства модифицированных люцифераз определяют расширение сферы применения. В частности, получен ряд результатов по улучшению свойств светляковой люциферазы, используемой для определения АТФ в различных биологических средах [151–153]. Показана зависимость ингибирования свечения генетически модифицированных бактерий *Escherichia coli* от присутствия минеральных солей [154;155].

Во многих случаях применение биолюминесцентных методов анализа, по сравнению с традиционными методами, наряду с увеличением чувствительности позволяет сократить стоимость анализов примерно на 70 %, а время их проведения – в 5–10 раз. Современные аналитические методы на основе биолюминесцентных реакций, катализируемых различными люциферазами, способны обеспечить широкий спектр аналитических задач – от экологического мониторинга среды обитания человека (интегральные биотесты) до молекулярной диагностики различных заболеваний и инфекций (высокочувствительные и специфические биолюминесцентные иммуно- и гибридные анализы).

## Глава 2

# ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ГРИБОВ В БИОТЕСТИРОВАНИИ

---

Большинство современных биотестов основаны на дискретных измерениях и могут быть использованы в весьма ограниченном температурном диапазоне, что является их недостатком. Для непрерывного мониторинга с целью обнаружения неизвестных заранее токсических веществ необходимо создание систем постоянного слежения на основе методов непрерывного измерения биолюминесцентного сигнала. Такие системы должны выявлять максимально широкий спектр токсикантов, т.е. быть неспецифичными. Задача обнаружения токсического агента в неопределенный момент требует развития новой стратегии создания биотеста, т.е. системы «ждущего» биотеста с длительным постоянным излучением, изменение интенсивности которого служит сигналом тревоги. «Ждущая» система предназначена для выявления внезапно появляющегося токсического агента и сигнализации его присутствия в воде и воздухе и перспективна для использования в случае длительного мониторинга окружающей среды, в случае предупреждения последствий террористических актов и в медицинской диагностике. В качестве тест-объекта с пролонгированной длительностью свечения и расширенным диапазоном условий его применения могут быть использованы светящиеся культуры грибов.

Целый ряд светящихся шляпочных грибов (базидиомицетов) обнаруживается в тропиках. В средних широтах свечение грибов – явление более редкое и не столь яркое. Широкий температурный диапазон (от +4 до +50 °С) и длительность свечения грибов (от двух недель до двух месяцев) дает возможность создания на их основе биотестов непрерывного действия с весьма широкими возможностями использования в различных климатических зонах. Главное условие свечения грибов – наличие кислорода [156]. Известно более 80 видов светящихся грибов (базидиомицетов) [157–163]. Светящиеся грибы являются основной причиной свечения древесины. Они обнаружены в Северной и Южной Америке, Европе, Азии, Австралии. В последние годы в Бразилии были найдены новые виды светящихся грибов. Большинство из них относятся к семейству *Mycena*, которое насчитывает более 500 видов по всему миру; только 33 из них были известны как биолюминесцентные. Все известные виды светящихся грибов имеют голубовато-зеленоватое свечение с максимумом, близким к 530 нм.



В зависимости от вида светящиеся грибы излучают свет на разных стадиях жизненного цикла. У ряда грибов светятся только плодовые тела [156; 158]. У *Armillaria*, по одним данным, светящимися являются лишь ризоморфы, по другим – мицелий и ризоморфы; у *Mycena rorida* светятся только споры, у представителей других видов рода *Mycena* имеется светящийся мицелий. *Panellus stipticus* и *Omphalotus olearius* (син. *Clitocibe illudens*) имеют светящийся мицелий и плодовое тело [164]. *Collybia tuberosa* продуцирует светящийся склероций, у многих грибов светятся мицелий, плодовое тело, ножка [165–167], а у *Omphalotus af. illudent* светятся и споры [168].

Предполагается, что биохимия свечения грибов иная, чем у других известных светящихся организмов [156; 169; 170]. Тем не менее механизмы свечения грибов все еще не ясны. Было предположено, что у грибов, как и у бактерий, имеет место люциферин-люциферазная реакция [171; 172]. Однако долгое время структура природных люциферинов грибов не была определена, а люцифераза не была обнаружена [156]. Большой интерес вызывают лектины с N-ацетил-D-галактозаминной специфичностью, поскольку они обладают противораковым действием. Лектины с N-ацетил-D-галактозаминной специфичностью были выделены в том числе из съедобных грибов. Другое вещество с противоопухолевыми свойствами – иллюдин – также обнаружено в грибах, в том числе светящихся [173]. Интерес к изучению свечения грибов в последнее время привел к обнаружению некоторых веществ, которые могут претендовать на роль предшественников люциферина. Так, 3-гидроксигиспидин (3-hydroxyhispidin) – одно из таких соединений, предшественником которого является гиспидин (hispidin), – обнаружен группой красноярских и московских ученых [174]. Другие соединения, вызывающие активацию свечения у шляпок мицены *Mycena chlorophos*, были найдены японским ученым К. Тераниши при изучении плодового тела [175; 176]. Одно из них – транс-3,4-гидроксикоричная кислота, однако оно не вело к образованию гиспидина в результате протекающих обменных процессов. Чуть позже исследователь сообщил, что возможными источниками света в шляпках мицены являются рибофлавин, рибофлавин 5'-монофосфат, и/или флавинадениндинуклеотид. Таким образом, пока нет единого мнения о люциферине и люциферазе грибной билюминесценции. Увеличение числа публикаций, посвященных билюминесценции грибов, вселяет надежду на полную разгадку механизма их свечения и использование в дальнейшем этих знаний для создания эффективного грибного биотеста.

Первым этапом разработки биотеста является подбор питательной среды и условий культивирования гриба для получения стабильного уровня свечения. Для выделения и поддержания культур светящихся грибов

используются среды различного состава, включающие органические компоненты (картофельный отвар, дрожжевой экстракт, пептон и др.), точный состав которых трудно контролировать. При использовании общепринятых методов культивирования на жидкой и агаризованной средах удалось получить свечение мицелия и плодовых тел некоторых видов светящихся грибов [177–181]. Обычно варьирование рН среды в пределах от 4,5 до 8,4 заметного влияния на рост и свечение культуры не оказывало. Имеются разработки питательных сред и регламенты выращивания на них некоторых культур базидиомицетов, особенно съедобных.

Лишь несколько групп исследователей рассматривают светящиеся грибы как потенциальные объекты для создания биотестов. Так, природные светящиеся грибы *A. mellea* и *Mycena citricolor* были использованы для разработки тестов на токсичность [182–184]. Вейтс с соавторами [182] проводили исследование биотестов на основе светящихся грибов для определения токсичности 3,5-дихлорфенола (3,5-ДХФ), пентахлорфенола (ПХФ) и солей тяжелых металлов (меди и цинка). Было найдено время экспозиции для оптимального определения токсичности – 60 минут. Соли цинка ингибировали свечение мицелия *A. mellea*. При воздействии 3,5-ДХФ, ПХФ и меди на *Armillaria mellea* и *Mycena citricolor* наблюдалось уменьшение интенсивности люминесценции мицелия, причем мицелий *A. mellea* был существенно менее чувствителен к 3,5-ДХФ, чем мицелий *M. citricolor*. Показатель  $EC_{50}$  для 3,5-ДХФ, ПХФ и меди (но не цинка) для светящихся грибов был того же порядка, что и у бактериальных биотестов. Мендес Л. Ф. с соавторами [180; 185] показали возможность использовать в качестве тест-объекта для определения токсичности ионов металлов (Pb(II), Cd(II), Al(III)) бразильский светящийся гриб *Gerronema viridilucens*. Близкие результаты были получены на рекомбинантных бактериальных биотестах *Pseudomonas fluorescens* 8866 Tn *luxCDABE* при воздействии этих же токсичных веществ [186], а также на дрожжевых и нематодных рекомбинантных биотестах [187; 188]. Однако культура *A. mellea* была более чувствительна к меди, чем *P. fluorescens* 8866 и *P. putida* F1, тогда как *M. citricolor* оказалась менее чувствительной.

Один из последних обзоров возможного использования грибной биолюминесценции опубликовали бразильские исследователи [189]. Они провели сравнение характеристик традиционных (небиолюминесцентных) и биолюминесцентных биотестов, созданных на основе грибного мицелия (табл. 2.1).

Обычные грибные биотесты имеют ряд недостатков, среди которых длительное наблюдение (до 30 дней), сложность интерпретации результата, так как результаты оцениваются по темпам роста колонии (размер, или площадь, колонии), а грибной мицелий растет также вверх перпендикуляр-

но плоскости измерения. Анализируемое вещество добавляется в агаровую среду, и ее составляющие могут изменить биодоступность токсикантов для гриба. Наконец, контролем служат колонии, выросшие на питательной среде без добавок токсиканта, т.е. контрольные и экспериментальные колонии не идентичны. При использовании биолюминесцентного грибного биотеста результат – интенсивность светоизлучения колонии – регистрируется прибором, причем контролем (самоконтролем) является свечение индивидуальной колонии перед обработкой реагентом, который добавляется на поверхность колонии или в жидкую среду (в случае использования глобулярного мицелия). Биотестирование проводят при 15–25 °С, рН 3–6, влажности 80–90 % и в темных условиях внутри климатической камеры в течение 7–10 дней.

Таблица 2.1

**Сравнение традиционных и биолюминесцентных биотестов, использующих базидиомицеты [189]**

| Параметр                    | Традиционный биотест на агаре | Биолюминесцентный биотест |                          |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                             |                               | на агаре                  | в жидкой среде           |
| Измеряемый параметр         | Диаметр и биомасса            | Интенсивность света       | Интенсивность света      |
| Оцениваемый эффект          | Ингибирование роста           | Тушение биолюминесценции  | Тушение биолюминесценции |
| Время экспозиции            | 7–30 дней                     | 24 ч                      | 60 мин                   |
| Способ нанесения токсиканта | В агар                        | На поверхность колонии    | В раствор                |
| Контроль                    | Нет самоконтроля              | Есть самоконтроль         | Есть самоконтроль        |
| Диапазон EC <sub>50</sub>   | мкМ–мМ                        | мМ                        | мкМ–мМ                   |

Разработанный биолюминесцентный биотест с использованием гриба *Gerronema viridilucens* включает ряд процедур (рис. 2.1) [189]. Из маточной (исходной) культуры в течение 10 дней в оптимизированных условиях внутри климатической камеры выращивают культуру гриба в 35-миллиметровых чашках Петри, чтобы получить рабочий биотест (биосенсор). Перед обработкой замеряют интенсивность исходной биолюминесценции от каждой чашки  $BL_{initial}$ , затем добавляют либо водный контроль, либо раствор токсиканта при возрастающих концентрациях с последующим 24-часовым выдерживанием в климатической камере. Наконец, измеряют конечную биолюминесценцию  $BL_{final}$  и подсчитывают эффект тушения люминесценции по выражению  $BL_{inhib} = 1 - BL_{final} / BL_{initial}$ .

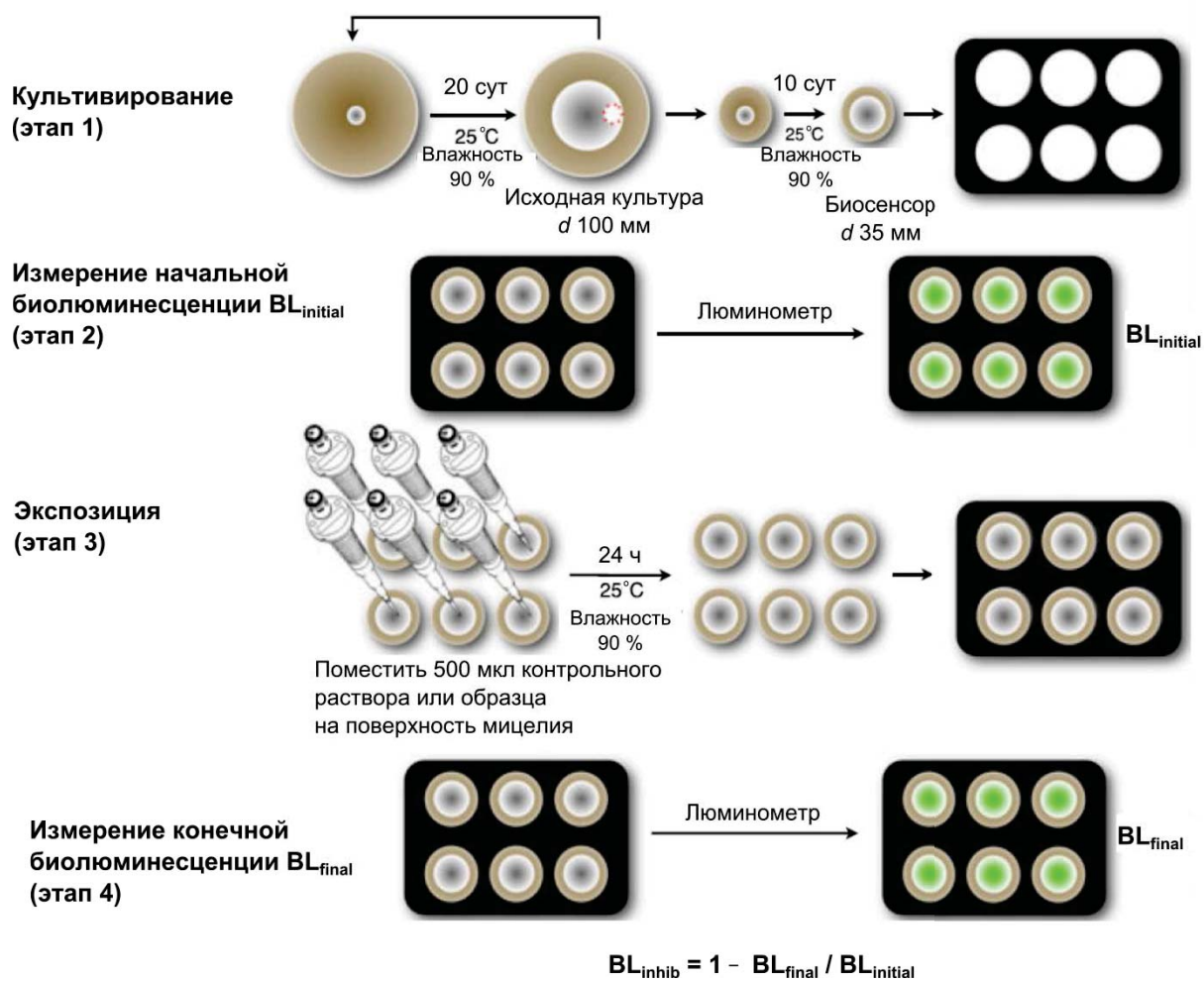


Рис. 2.1. Схема проведения биотестирования с помощью биолуминесцентных грибов [189]

Одним из преимуществ биолуминесцентных грибных биотестов на агаре по сравнению с традиционными является то, что каждая чашка действует как самоконтроль. Это важно для уменьшения числа экспериментальных ошибок, связанных с разным ростом мицелия в разных чашках, что может привести к менее достоверным результатам. Сигнал биолуминесценции является более точным для сбора данных и проверки состояния грибного организма, поскольку он отражает состояние всех слоев мицелия. Следует отметить, что результаты, основанные на измерении площади (радиальный рост), не учитывают плотность мицелия и, следовательно, могут недооценивать его рост.

Известны успешные попытки получить рекомбинантные светящиеся грибы для создания биосенсора на токсичность веществ. Подходящими грибами для этих экспериментов признаны *Neurospora sp.* и *Aspergillus sp.*, у которых были получены люминесцирующие или флюоресцирующие

нити грибов. Люминесцирующие белки включают люциферазу копеподы *Gaussia* и обелин, а кодирующий ген находится в этих объектах под индуцибельным промотором или усилителем чувствительности к тест-веществу. Генетически модифицированные биолюминесцентные грибы *Aspergillus awamori* с геном рекомбинантного экворина были использованы при определении ионов кальция в различных токсикантах [190], а с геном люциферазы из светляка *Photinus pyralis* – для изучения эффективности противогрибковых средств в естественных условиях [191].

Таким образом, использование в качестве тест-объекта светящегося грибного мицелия является перспективным направлением, так как позволяет получить длительно светящийся биотест для непрерывного мониторинга газовой фазы среды, не требующий использования жидкой фазы при регистрации сигнала с помощью биолюминометра. Исследование же механизмов биолюминесценции грибов ведет к открытию новой биолюминесцентной системы и новых фотопротеинов.