

ФОТОБИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ

Обзор

© 2015 А.Д. Исмаилов*, Л.Э. Алескерова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991; электронная почта: anvaris@list.ru

Поступила в редакцию 20.01.15

После доработки 02.03.15

Рассмотрены научные основы получения люминесцентных биосенсоров на основе свободных и иммобилизованных светящихся бактерий. Описаны современные технологии конструирования тест-объектов, процедур иммобилизации бактерий в различных носителях, процедур интегральной и специфической биодетекции токсинов. Проведен анализ данных по получению и использованию в биомониторинге экотоксикантов природных и генно-инженерных штаммов фотобактерий. Особое внимание уделено иммобилизации фотобактерий в криогеле поливинилового спирта. Описаны основные физико-химические, биохимические и технологические элементы стабилизации свечения бактерий в иммобилизованном состоянии. Представлены результаты применения иммобилизованных препаратов фотобактерий в дискретном и непрерывном биомониторинге различных классов экотоксикантов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биолюминесценция, биомониторинг, светящиеся бактерии, биосенсоры, иммобилизация, гели, поливиниловый спирт.

ФОТОБАКТЕРИИ В БИОМОНИТОРИНГЕ ЭКОТОКСИКАНТОВ

В научных и прикладных исследованиях биомониторинга широко используются аналитические системы, у которых в качестве сенсорного элемента функционируют различные ферментные системы, клетки и микроорганизмы. Особое внимание в последнее время уделяется биолюминесцентным биосенсорам на основе фотобактерий. Технология анализа основана на субстратном, ингибиторном или индукционном действии субстанций на специфические мишени биосенсоров, вызывающие изменения в энергетическом и/или структурном метаболизме клетки. Интенсивность свечения объекта служит количественным индикатором реакции биологического объекта на внешнее воздействие. Результаты исследований в этом направлении представлены в целом ряде обзоров, книг и статей [1–4].

Широта практического применения фотобактерий в биомониторинге окружающей среды связана с чувствительностью биолюминесцентной реакции клеток к широкому спектру веществ,

с цитотоксичным и(или) генотоксичным действием [5].

Трансформация фотобактериями химической энергии в световой сигнал осуществляется на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений стандартными фотодетекторами. Эмиссионный ответ для широкого круга токсических веществ хорошо коррелирует с реакцией стандартных биотестов на рыбах, ракообразных, простейших, – величина 50%-ного тушения свечения (EC_{50}) коррелирует с величиной $LD-50$ с коэффициентами корреляции 0,8–0,95.

В качестве биолюминесцентных тест-объектов в биомониторинге применяются различные типы природных и генно-инженерных микроорганизмов. Применение клеток для аналитических целей имеет ряд преимуществ по сравнению с бесклеточной системой, прежде всего, наличием высокой самопроизвольной эмиссии света и множественности мишеней для действия тех или иных химических агентов – токсинов, мутагенов, канцерогенов (ксенобиотики, тяжелые металлы, углеводороды), и физических факторов (UV-излучения и других форм радиации).

В качестве люминесцирующих объектов в детекции токсичных веществ применяются как свободные, так и иммобилизованные фотобак-

* Адресат для корреспонденции.

терии [6, 7]. Реализован коммерческий выпуск тест-систем: «Microtox» («Azur Environmental», США) [8], «Toxalert» («Merck», США) на основе бактерий *Photobacterium phosphoreum* [9], а также «Mitatox» (США) [10], «Vitotox» («GENAUR Molecular Products», Бельгия) [11] на основе *Vibrio fischeri* и др. Разработано получение лиофилизированных и иммобилизованных клеток разных видов фотобактерий и технология применения этих препаратов для дискретного и непрерывного биомониторинга экотоксикантов [12, 13]. Значительная часть работ последних лет проведена на luxCDABE – маркированных штаммах *E. coli* и других видов бактерий в целях специфической детекции стрессовых состояний, ДНК повреждающих и мембранотропных агентов органической и неорганической природы [8, 14, 15].

Полученные к настоящему времени результаты позволяют рассматривать фотобактериальный тест в качестве универсального метода для широкомасштабного применения в комплексе мер экологического контроля за загрязнением окружающей среды. Разработанные технологии биолюминесцентного анализа в силу высокой чувствительности, быстроедействия и экономичности по сравнению с другими биотестами, перспективны для экспресс-детекции гербицидов, инсектицидов и тяжелых металлов в почве, воде и препаративных формах, а также в контроле за процессами биотрансформации и деградации токсинов [10, 15, 16].

Технологиям конструирования микробных биосенсоров на основе фотобактерий посвящено значительное количество работ [4, 17, 18]. В рамках этих задач особое внимание уделено процедурам конструирования тест-объекта, систем биодетекции, технологиям применения препаратов. Эмиссионный ответ биосенсора рассматривается в двух режимах, – индуцибельном и конститутивном. При индуцибельном подходе репортерные lux-гены «сшиваются» со специфическими сенсорными генами, комплекс генов находится под общим промотором. Реакция промотора на определенные химические соединения приводит к индукции свечения. При конститутивном подходе репортерные lux-гены сцеплены с промотором, который экспрессируется непрерывно. Оба типа биосенсоров постоянно совершенствуются, о чем свидетельствует возрастающее количество публикации. В значительной части работ основное внимание уделяется конструированию новых lux-маркированных рекомбинантных штаммов, а также технологическим операциям иммобилизации клеток, процедурам хранения и использования биосенсоров в точечном и проточном биомониторинге токсикантов.

ТЕХНОЛОГИЯ ФОТОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИНОВ

Система биотестирования в техническом плане представляет собой комбинированный комплекс, состоящий из бактериального излучателя света и фотодетекторного преобразователя светового сигнала.

Светоизлучающие объекты: 1) природные светящиеся бактерии *P. phosphoreum*, *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* и др.; 2) специфические мутанты *V. harveyi* и *V. fischeri*; 3) рекомбинантные штаммы многих видов бактерий с клонированными генами люциферазы.

На клеточном уровне люминесцентный биосенсор включает в себя: 1) сенсорный элемент (S) и 2) репортерный элемент (R). *Сенсорный элемент* – структурные элементы клетки, отвечающие за взаимодействие с токсикантом. В природных штаммах, используемых для оценки интегральной (неспецифической) токсичности, сенсорными элементами являются плазматическая мембрана, цепи энергетического метаболизма, экспонированные в периплазму и внутриклеточные структурные компоненты, прямо или косвенно связанные с люминесцентной системой. Реакция биосенсора – тушение свечения. В мутантных и рекомбинантных штаммах сенсорными элементами являются промоторы специфически экспрессируемых генов защиты от органических ксенобиотиков, тяжелых металлов, мутагенов, в том числе ДНК-повреждающих агентов, мембранотропных веществ, ингибиторов ферментов биосинтеза липидов, транспортных белков, белков теплового и окислительного стресса. Реакция биосенсора на химические агенты – активация свечения. *Репортерный элемент* природных фотобактерий композиционно состоит из 5 генов биолюминесцентного оперона – luxCDABE и регуляторных генов luxI и luxR, репортерным элементом генно-инженерных штаммов является беспромоторный транспозон luxCDABE. Генно-инженерный биосенсор обычно конструируется в виде единой структуры, состоящей из двух сцепленных генетических элементов с общим промотором, – специфического сенсорного, отвечающего за реакцию на химические агенты и индикаторного – люминесцентного.

Оптический детекторный элемент (D) – фотоэлектронные умножители или фотодиоды со спектральной областью чувствительности 400–700 нм.

Таким образом, система биомониторинга (SRD) основывается на двух последовательных преобразователях энергии: *биологического*, трансформирующего химическую энергию в световую, и *фотоэлектронного*, преобразующего световой поток в электрический сигнал.

БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ФОТОБАКТЕРИЙ

Биосенсоры, полученные на основе суспензии клеток обладают некоторыми недостатками: процедура вспомогательных и основных операций получения стандартных препаратов из лиофилизированных клеток отражаются на скорости анализа. Имобилизованные клетки более экономичны и стандартны. Основные затраты как правило касаются технологии получения рекомбинантных штаммов. Кроме того, следует отметить, что эмиссия света при специфическом анализе на генно-инженерных штаммах наблюдается после многочасовой лаг-фазы.

Имобилизация клеток фотобактерий и биолюминесцентной ферментной системы успешно реализована на различных типах неорганических и органических носителей. Использование препаратов с иммобилизованными клетками приводит к гетерогенному катализу, который создает во многих случаях экономическую и практическую эффективность. Преимущества, в первую очередь, касаются упрощения технологических операций, возможности перехода от периодических схем получения тех или иных продуктов или действия субстратов к непрерывным процессам. Во-вторых, иммобилизованные клетки дают возможность более длительной и многократной эксплуатации препаратов, в отличие от однократного применения клеток в гомогенном состоянии. Кроме того, технология иммобилизации препаратов позволяет во многих случаях увеличивать ферментативную активность. Имобилизованные препараты обладают повышенной устойчивостью к различным физико-химическим факторам (температура, кислотность, pH), обладают меньшей чувствительностью к действию патогенных организмов. Имобилизация фотобактерий позволяет повысить стабильность биосенсора при хранении и длительность его применения [19, 20]. Непрерывный биомониторинг токсинов также предъявляет повышенные требования к стабильности эмиссии света клетками тест-систем.

Как и в случае со свободными клетками, в иммобилизованных препаратах функцию интегрального анализа токсичности выполняют природные фотобактерии, для специфической детекции — мутанты и генно-инженерные штаммы с клонированными генами люминесцентной системы [13].

В качестве наиболее распространенных носителей для иммобилизации светящихся бактерий в большинстве случаев применяются агаровые, агарозные и альгинатные гели. В задачах по

созданию биолюминесцентных токсикологических биосенсоров наибольшее распространение получили Ca^{2+} и Sr^{2+} -альгинатные гели [21].

Особую перспективность для практического применения иммобилизованных клеток могут иметь комбинированные системы: «биосенсор—фотопроводник—фотодетектор», с нанесенным на поверхность оптоволоконных нитей гелем с сенсорными клетками [15, 22, 23].

Разнообразные репортерные бактерии (в частности, различные штаммы *Pseudomonas*, *Salmonella*) используются для специфического анализа конкретных веществ. В качестве примера можно привести работу, выполненную в целях разработки биосенсоров на основе генно-инженерных биолюминесцентных бактерий с репортерным элементом на катаболитную репрессию с целью непрерывного биомониторинга салицилата и нафталина в режиме реального времени [13]. Кроме того, биосенсоры используются для анализа эффекта катаболитной репрессии промышленных отходов. В качестве репортерных бактерий выбран штамм *Pseudomonas fluorescence* HL44, который содержал транскрипционную *nahG-luxCDABE* шитую конструкцию. Экспозиция с нафталином и салицилатом вызывала индукцию свечения указанного штамма. Репортерная культура была иммобилизована и закреплена на поверхности фотодетектора с помощью Sr -альгинатного геля. Имобилизованные биосенсоры использованы для анализа указанных веществ, как в точечном, так и в проточном режиме. Оптимизированы условия и концентрационные диапазоны веществ, вызывающих индукцию света. Установлено, что как величина максимума эмиссии, так и скорость индукции зависят от времени инкубации и концентрации веществ (доза/время). Экспозиция биосенсора с другими соединениями: глюкозой, толуолом, а также комплексной питательной средой приводила к индукции свечения, но в минорном отношении к свечению с нафталином и салицилатом. По результатам работы сделан вывод, что данная система применима для анализа реальных загрязнений среды и промышленных отходов, а также для оценки метаболического состояния тех или иных биообъектов. Непрерывное культивирование позволило проводить детекцию в режиме реального времени. В биотестировании эффективно функционируют иммобилизованные в Ca -альгинате клетки. Отмечена линейная зависимость индуцированного биолюминесцентного ответа с концентрацией веществ как на свободных, так и на иммобилизованных бактериях. Авторы обращают внимание на высокую стабильность альгинат-глицериновой суспензии клеток при температуре -70° .

Представленные в работе [12] данные получены на рекомбинантном штамме *Salmonella typhimurium* TA1535, сконструированном из плазмиды с индуцибельным SOS-промотором, сцепленным с luxCDABE опероном из *Photobacterium leiognathi*. Указанный рекомбинантный штамм был иммобилизован в агаровом носителе. Процедура иммобилизации в агаровом носителе достаточно проста и включает в себя использование 96-луночной матрицы (10 мкл смеси в лунке планшета) при 30-мин инкубации для полимеризации и хранения при 4°. Принцип анализа аналогичен другим рекомбинантным биосенсорам – индукция свечения при инкубации с токсичным веществом. Модельные эксперименты по индукции свечения данного штамма выполнены с ДНК-повреждающим генотоксичным агентом, – митомицином С. Иммобилизованные клетки сохраняли активность при хранении при 4° в течение 6 недель. Ответ четырехнедельной культуры на митомицин С неотличим от ответа свежей иммобилизованной культуры. Как величина максимального ответа, так и длительность лаг-фазы зависят от концентрации митомицина С. Максимальный активационный ответ – при приблизительно 1 мкг/мл митомицина С. Принципиально, что дальнейшее увеличение митомицина приводит к резкому тушению свечения. Очевидно в данном случае проявляется цитотоксичное действие антибиотика, которое сходно с действием токсинов на рекомбинантные клетки других бактерий при высоких концентрациях. Бактериальные биосенсоры, иммобилизованные в тонких целлюлозно-агаровых пленках, были использованы для детекции различных химических агентов – фенола, перекиси водорода, меди и кадмия. Иммобилизованные клетки проявляли высокую чувствительность к действию указанных агентов, ингибиторный эффект наблюдался при концентрациях, близких к величинам, детектируемым свободными клетками («Microtox», «Azur Environmental», США)). Сформированная конструкция тонких пленок не затрудняла диффузию указанных токсичных агентов. Авторы провели работу по анализу стабильности иммобилизованных клеток, содержащих фотобактерии и установили, что AWS-среда оптимальна для длительного хранения и использования препаратов. Стабильность препаратов: четыре недели при 4° в указанной среде. При инкубации в 3%-ном NaCl стабильность существенно снижалась. Наряду с токсикологическими экспериментами в работе представлены данные по анализу температурной и pH зависимости свечения свободных и иммобилизованных препаратов, спектральным и кинетическим характеристикам. К сожа-

лению, стоит отметить ряд результатов, вызывающих сомнения, например, приведенная спектральная картина не соответствует бактериям *P. phosphoreum*, а соответствуют *V. harveyi*. На это же указывает и температурная зависимость, но pH-зависимость близка к *P. phosphoreum*. В то же время результаты модельных экспериментов можно рассматривать как перспективные для использования многослойной системы для биотестирования загрязнений среды [24].

Кроме биотестирования с использованием интактных клеток фотобактерий, токсикологический анализ может быть проведен с помощью бесклеточных систем фотобактерий.

Оптоволоконный сенсор, содержащий светогенерирующие ферменты, рассмотрен как мультифункциональный биосенсор и использован для анализа АТФ (люцифераза светляков) и НАДН⁺ (бактериальная оксидоредуктаза/люцифераза). Ферментные системы иммобилизованы в полиамидных мембранах. Диапазоны анализа АТФ и НАДН⁺: 0,1 пмоль–0,5 мкмоль. Наряду с указанным носителем в качестве матрицы использован поливиниловый спирт. Биосенсор на данном носителе эффективно применен (более 40 раз) для анализа субстратов люциферазы [25].

В работе [26] представлены данные по применению комбинированной тест-системы, включающей иммобилизованный биолюминесцентный ферментный комплекс, ассоциированный с оптической детекторной системой. Работа выполнена с использованием двух типов люцифераз (из светляков и бактерий) и пероксидазы (для хемилюминесцентного анализа). В работах [14, 27, 28] обсуждаются технологические процедуры иммобилизации для получения мембранных биосенсоров. Рассмотрены вопросы практического применения биосенсоров в биотехнологии.

В серии работ, выполненных в начале 2000-х гг., создано новое направление в технологии создания биосенсоров для применения в токсикологическом анализе окружающей среды [18, 29]. Значительная часть работ посвящена созданию специфических генно-инженерных конструкций с сенсорными генами (SOS-система, система защиты от теплового шока, действия ДНК и мембран – повреждающих агентов) на различные типы токсинов и репортерными генами из *Photobacterium luminescens*. Кроме того, значительное внимание уделено технологии иммобилизации клеток. В качестве носителя авторы использовали Са-альгинатный гель. Различные типы генно-инженерных биолюминесцентных фотобактерий были иммобилизованы на торцах оптоволоконных нитей. При использовании данной системы каждый биосенсор специфически

реагировал на определенный тип токсинов. Разработанная тест-система эффективно определяла как чистые химические неорганические и органические токсины, так и примеси токсичных веществ в водной среде, почве и других объектах. Вместе с генно-инженерными штаммами были применены природные фотобактерии, на свечение которых токсичные агенты оказывают ингибиторное действие. Использование этих бактерий продиктовано необходимостью введения контроля на цитотоксичное действие веществ. Соответствующая компьютерная обработка позволяет проводить как дискретный, так и непрерывный мониторинг токсикантов со специфической и общей токсичностью образцов [29]. Установлено, что тонкие пленки геля с клетками стабильны в течение 6 ч при 26° и способны определять митомицин С до концентрации 25 мкг/л. Концентрация клеток в носителе $1-3 \times 10^7$ эффективна в аналитических процедурах. В работе [18] проведен детальный анализ стабильности биосенсоров в комбинированной системе, чувствительной к температурному воздействию и других физических и химических параметров биодетекторной системы на примере соединений, вызывающих стрессовую реакцию клеток (тепловой шок, действие SOS-агентов, нарушение в биосинтезе белков, пероксидный и оксидативный стресс). В работе [15] подробно описаны результаты исследования за десятилетний период по технологиям получения генно-инженерных штаммов, процедурам иммобилизации, способам хранения и применения природных и генно-инженерных штаммов в лабораторном и практическом использовании биосенсоров в токсикологическом биомониторинге. Принципиальным отличием указанных систем является создание комбинированного комплекса оптоволоконного детектора с биодетекторами. Результаты по усовершенствованию технологии получения комбинированных биосенсоров на основе иммобилизованных на оптоволоконных нитях природных и рекомбинантных штаммов для цитотоксичного и генотоксичного анализа представлены в работах [18, 23, 30].

Вместе с тем необходимо отметить, что для иммобилизованных в агаре, агарозе, альгинате клеток характерна недостаточно высокая стабильность свечения, связанная с чувствительностью клеток к относительно высоким (до 30–50°) температурам гелеобразования. Следует отметить, что также могут использоваться альгинатные гели, имеющие относительно низкую температуру гелеобразования. Тем не менее для фотобактерий, у которых температурный оптимум свечения 15–25° (в зависимости от вида), температурное воздействие приводит к образо-

ванию темновых мутантов. Важное значение для жизнеспособности морских фотобактерий играет и солевой состав среды. Оптимальные концентрации для эмиссионной активности клетки 2–6% NaCl. Са-альгинатные гели могут частично дестабилизироваться при этих концентрациях солевых растворов за счет замещения в геле Са на ионы Na. Кроме того, возможно комплексообразование Ca^{2+} и Sr^{2+} с фосфатными и карбонатными ионами при использовании их в качестве буферных растворов. Более устойчивы в солевых растворах Sr-альгинатные матрицы. Криопротекторные свойства альгинатных гелей играют положительную роль при хранении иммобилизованных препаратов при низких температурах, однако для более эффективного хранения требуется дополнительный компонент – глицерин (10–30%). В работе [11] представлены данные по иммобилизации клеток фотобактерий *Photobacterium phosphoreum* в пяти разных гелеформирующих материалах: агаре, агарозе (в том числе в агарозе, плавящейся при низких температурах), полиакриламиде, кальций (стронций) – альгинате. Установлено, что используемые технологии иммобилизации по-разному влияют на стабильность фотобактерий. Среди выбранных носителей наиболее эффективно проявили себя альгинатные гели, иммобилизация в которых приводила к существенным повышениям стабильности свечения клеток. Длительность свечения альгинат-глицериновой суспензии клеток при инкубации в 3%-ном NaCl при 4° достигала четырех недель (детектируемый уровень биолюминесценции суспензии – до шести недель). Длительность свечения свободных клеток (NaCl, глицериновая суспензия) в тех же условиях инкубации не превышала двух недель. Иммобилизованные в агаре клетки характеризовались существенно меньшей стабильностью, чем свободные. Клетки в агарозных носителях имели приблизительно ту же длительность свечения, что и свободные клетки – две недели.

Альгинат-глицериновая суспензия полностью сохраняла исходный уровень свечения при хранении –80° в течение 12 недель. При хранении –20° альгинатной суспензии клеток эмиссионная активность падает аналогично наблюдаемому снижению при 4°. Авторы подробно анализируют преимущества и недостатки материалов для иммобилизации, технологические процедуры и условия хранения. Технологические операции и условия непрерывного биомониторинга разработаны и оптимизированы в приложении к Са-альгинатным препаратам как наиболее стабильным при эмиссионной активности. Клетки в полиакриламидном геле (ПААГ)

практически мгновенно теряли люминесцентную активность после процесса завершения реактивации. Стабильность свечения иммобилизованных в агаре и агарозном геле была существенно ниже, чем в свободных (90% активности терялось за две недели). Все это свидетельствует о том, что процедура иммобилизации в данных носителях фотобактерий отрицательно отражается на клеточном метаболизме. Наиболее стабильное свечение наблюдалось в суспензии клеток в альгинате. По мнению авторов, низкая стабильность свечения клеток, иммобилизованных в агаре и агарозе, связана с чувствительностью фотобактерий к относительно высоким (до 50°) температурам, которые используются при гелеобразовании. Это объяснение логично вытекает из хорошо известных и детально описанных температурных эффектов на свечение фотобактерий. Температурное воздействие (30–36°, 30–60 мин) приводит к образованию т.н. TS, TSAS и других тусклых и темных мутантов. Особо сильное воздействие температурный фактор оказывает на бактерии *Photobacterium phosphoreum*, большинство из которых имеет максимум биолюминесцентной активности при 15–18°.

Важное значение имеют данные по изучению кинетики свечения в ходе инкубации иммобилизованных в альгинатном носителе клеток. Авторами установлена нестабильность свечения, которая связывается с физической нестабильностью Са-альгинатных гелей. Объяснение тем, что нестабильность эмиссии связана с частичным замещением ионов Ca^{2+} в носителе на ионы Na^+ , достаточно логично и обоснованно. Замена Ca^{2+} на Sr^{2+} в носителе повышала стабильность препаратов. В работе отмечено расхождение в количественных величинах биотестирования ряда токсинов с классическим тестом («Microtox», «Azur Enviromental», США). Одновременно отмечена хорошая корреляция со свободными клетками тех же бактерий. Предполагается, что расхождение между тест-системами связано с различием в диффузионных характеристиках токсичных агентов. Аналитическая процедура дискретного анализа (на Са, Sr-альгинатных гелях) апробирована на солях пяти тяжелых металлов: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, NaAsO_2 , NiCl_2 , CdCl_2 , HgCl_2 , а также SDS и пентахлорфеноле (ПХФ). Как отрицательное явление необходимо отметить длительность процедуры тестирования (5 ч) при комнатной температуре. Авторы отмечают существенные различия в кинетике ингибирования указанными токсинами между свободными и иммобилизованными клетками, хотя пороговые чувствительности достаточно близки. Кроме того, наблюдалась стимуляция свечения низкими концентрациями ПХФ (меньше 0,1 ppm)

и CdCl_2 (меньше 10 ppm). Разработанные для дискретного биомониторинга процедуры использованы при непрерывном анализе токсинов. Условия непрерывного биомониторинга токсинов в протоке были оптимизированы по стабильности и эффективности (быстродействию) анализа, что предусматривало применение системы охлаждения реактора. Авторы акцентируют внимание на том, что взаимодействие токсинов с клеточными мишенями зависит от гидродинамических параметров. Параметры были оптимизированы: скорость протока 25 мл/ч, время запаздывания после введения токсина 37 с, время введения токсина 1–2 мин. Стабильность свечения препарата – более 40 мин. Пульсовое введение токсиканта в проток с иммобилизованными клетками приводит к обратной кинетике ингибирования. При вымывании токсиканта потоком наблюдается полное или частичное восстановление эмиссии препарата, что позволяет проводить многократный биомониторинг на одном и том же биосенсоре. Естественно, что эффект «доза/время» проявляется в кинетическом профиле тушения и реверсии свечения. Основным выводом данной работы заключается в том, что иммобилизованные в Sr-альгинатном геле клетки *Ph. phosphoreum* могут эффективно использоваться для дискретной и непрерывной детекции выбранных токсинов. Соответствующее компьютерное обеспечение является основой для практического применения непрерывного мониторинга окружающей водной среды в режиме реального времени [11]. Иммобилизованные в Sr-альгинатном геле бактерии *Ph. phosphoreum* эффективно применены в технологии непрерывного мониторинга токсикантов [8, 11].

Работа [31], посвященная биомониторингу водной токсичности, основана на непрерывном культивировании *Ph. phosphoreum*. Внимание в работе уделено возможной проблеме появления темновых мутантов (после 10 дней инкубации), которые начинают доминировать, вызывая быстрое тушение свечения. Для исключения этой проблемы авторами предложена система, основанная на специальном (fluidized-bed reactor) реакторе с иммобилизованными в альгинате клетками. Иммобилизованные в альгинатной суспензии клетки росли и непрерывно подавались в поток. Авторами установлено, что доминирование темновых форм существенно приостанавливается внутри гранулы иммобилизованного материала и не наблюдается спада биолюминесценции. Относительно высокая скорость разбавления предотвращает заселение другими микроорганизмами реактора. Концентрация клеток и эмиссионная активность в разработан-

ном режиме культивирования достаточна для наблюдения за токсичностью водной среды в течение четырех недель. Принципиально, что фотобактерии способны размножаться внутри альгинатных гранул и выходить в водную среду. Одним из важных экспериментов в данной работе является анализ выживаемости клеток в носителе в ходе процедуры иммобилизации, хранения и использования клеток. Оценку проводили путем подсчета колоний после разрушения матрикса $\text{Na}_6\text{O}_{18}\text{P}_6$ (6-натриевый фосфат). В работе отмечено, что после 24 ч внутри гранул альгинатной суспензии во всем объеме образовывались микроколонии различных форм и размеров. С помощью электронной микроскопии установлено, что основная масса клеток распределяется в объеме матрикса, незначительное количество клеток прикреплено к поверхности носителя. В разработанном режиме культивирования с учетом начальных операций в течение 40 ч 80% клеток относятся к дикому типу. Появление темновых мутантов при культивировании, как правило, начиналось на 7-й день и продолжалось вплоть до 100% к 10-му дню культивирования. Авторы выдвинули предположение, что мутации затрагивают не иммобилизованные, а выходящие в раствор клетки. Соответственно, можно считать, что матрикс носителя защищает иммобилизованные клетки от мутагенеза.

В работе приведены модельные опыты по анализу токсичности HgCl_2 на иммобилизованных и свободных клетках. Установлено, что иммобилизованные клетки более чувствительны к указанному токсину, однако эти различия незначительны. Результаты исследований рассматриваются как возможность практического применения системы для анализа токсичности воды в режиме реального времени. При этом разработанные технологические операции существенно защищают от темнового мутагенеза. Использование аналитической системы в данном случае возможно в течение более 30 дней. В работе предложены условия защиты от заражения системы другими микроорганизмами. Клетки в иммобилизованном материале реагируют на наличие в среде HgCl_2 до 0,5 мг на 1 л токсиканта [31]. Новое технологическое решение комплексного биомониторинга токсинов представлено в работе [32]. В указанной работе разработана система многоканального биомониторинга токсинов в водной среде с использованием ряда рекомбинантных бактерий, содержащих luxCDABE-оперон. Каждый канал системы конструировали из двух мини-биореакторов, необходимых для ступенчатого непрерывного процесса, причем каждый канал содержал определенный рекомбинант-

ный штамм с клонированным геном фотобактерий: DPD2440 (fabA:luxCDABE), DPD2794 (recA:luxCDABE), TV1061 (grpE:luxCDABE), которые в большей или меньшей степени чувствительны к действию мембранотропных агентов, ДНК и белок-разрушающих агентов соответственно. Взаимодействие этих агентов с рекомбинантными бактериями вызывает индукцию свечения. Наряду с данными штаммами, в работе в качестве контрольного использовали конститутивный штамм, биолюминесцентная реакция которого подавлялась токсинами, характеризуя клеточную токсичность. Модельные эксперименты выполнены с использованием в качестве токсичных агентов фенола и митомицина С. Отработаны и оптимизированы операции биомониторинга в целях последующих применений в практических задачах анализа токсичных химикатов окружающей среды. Для практического анализа использованы пробы воды из двух разных силовых установок (ядерных и термоэлектронных). Непрерывный биомониторинг осуществляли путем выращивания бактерий в реакторах: в первых реакторах выращивали биомассу бактерий, которую затем подавали во второй реактор, куда вводили пробу воды с токсином. Каждый канал отражал специфический профиль биолюминесцентного ответа, соответствующий химической природе токсичного агента в пробе. Сравнение биолюминесцентного сигнала между стандартным токсичным веществом и вытекающим водным раствором позволяло определять истинную эквивалентную токсичность в водном потоке. Разработанная система непрерывного многоканального биомониторинга токсинов может рассматриваться, по мнению авторов, как новая стратегия защиты биообъектов от загрязнителей окружающей среды (альтернативная система быстрого мониторинга и контроля водной среды). В работе особое внимание уделено получению рекомбинантных штаммов, а также технологическим операциям биомониторинга в протоке, которые отработаны, оптимизированы на моделях и применены в анализе воды охлаждающей ядерной и термоэлектронной установке. Авторы отмечают, что пробы, используемые для биомониторинга стабильны в течение 1 недели при 4° и рН 7,0. Процессы биотестирования проводили в режиме реального времени с использованием автоматического компьютерного контроля. Все используемые агенты стимулировали индукцию свечения, однако для всех наблюдалась разница в максимальной интенсивности эмиссии и длительности лаг-фазы. Время анализа достаточно длительное — до 500 мин, при этом высокие концентрации токсинов вызывали не индук-

цию, а тушение свечения рекомбинантных штаммов. Иными словами, при высоких концентрациях отсутствует специфичность реакции рекомбинантных штаммов. Метаболизм всех рекомбинантных штаммов реагирует на высокие концентрации токсинов тушением свечения. Фактически авторами показано, что при определенных концентрациях генотоксичное действие перекрывается цитотоксичным действием. Для индуцибельных рекомбинантных штаммов нет четких количественных данных по ингибиторному действию на наружные мишени мембран. При наличии подобных данных величина билюминесцентного ответа могла бы быть существенно скорректирована.

С другой стороны, необходимо отметить, что разработанная система биомониторинга достаточно сложна, трудоемка и длительна, хотя в принципе дает положительные результаты биотестирования токсинов. Обращает внимание на себя тот факт, что токсичный эффект по ингибированию свечения проявляется на всех рекомбинантных штаммах. По мнению авторов, разработанная система непрерывного биомониторинга может рассматриваться, как новое направление в идентификации природы и токсичного действия агентов и может быть также применена для детекции многих промышленных отходов и выбросов. Кроме того, авторы обращают внимание, что пробы перед анализом должны пройти предварительную обработку для удаления сопутствующих бактерий, которые могут попасть в пробу с последующей фильтрацией. Как основной результат данной работы можно рассматривать использование различных типов рекомбинантных штаммов для специфического биомониторинга токсинов [32].

Интегральная система биомониторинга воды (водная токсикология), использующая в качестве тест-объекта рекомбинантные бактерии, представлена в работе [33]. Разработанная система включала в себя 4 канала с двумя мини-биореакторами. В качестве тест-объектов выбраны рекомбинантные штаммы *E. coli* EVN2, DP1, DK1 и DPD279. Выбранные штаммы выполняют три специфические задачи защиты клетки от кислородного шока: защита клетки от действия O_2^- , H_2O_2 и ДНК-повреждающих агентов. Система биодетекции на указанных штаммах применена как для дискретного, так и для непрерывного мониторинга токсинов. В качестве индукторов использованы H_2O_2 и митомицин С, которые были введены во второй реактор. Первый реактор использовали для выращивания культуры указанных штаммов с последующим переносом их во второй биореактор. Установлено, что индукция билюминесцентного ответа зависима от дозы. При этом возрастание свече-

ния наблюдается только в небольшом диапазоне концентраций указанных индукторов. Как величина максимального ответа, так и скорость нарастания свечения специфичны для каждого токсиканта-индуктора, и при высоких концентрациях эффект индукции сменяется на ингибиторный эффект. В работе детально обсуждаются технологические операции непрерывного биотестирования, кинетические параметры индукции и тушения свечения, детально описываются различные варианты инструментального обеспечения непрерывного процесса. Особым преимуществом разработанной системы является миниатюризация системы детекции: 1–2 мл объем реактора. Авторы предполагают, что 4-канальная мини-мониторинговая система с разными рекомбинантными штаммами является крайне перспективной для специфического анализа определенных классов токсинов в окружающей среде.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФОТОБАКТЕРИЙ В КРИОГЕЛЕ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

Наряду с природными гель-формирующими агентами в иммобилизации микроорганизмов эффективно используются криогели поливинилового спирта (ПВС) [19, 34, 35]. Криогели поливинилового спирта, по сравнению с другими носителями, обладают рядом структурных и физико-химических свойств, оптимальных для иммобилизации светящихся бактерий.

Гетерофазность структуры матрикса, формирующаяся в ходе процедуры замораживания/оттаивания, оптимальна для инкапсулирования и стабилизации клеток. Наличие макропор (0,1–1 мкм) снимает диффузионные ограничения «эластичной» структуры сформированного криогеля для субстратов, токсинов и других соединений различной химической природы. Особое значение имеет термостабильность гелей. Физические характеристики сформированных ПВС-гелей устойчивы в широком диапазоне положительных температур, вплоть до 70–80°, что позволяет с высокой эффективностью реализовать работу биореактора в разных температурных режимах. Физико-химические параметры матрикса незначительно зависят от химического состава среды формирования геля, в частности, солевого состава, который имеет принципиальное значение для морских галофильных бактерий. Дополнительными преимуществами ПВС-гелей является высокая устойчивость к биоповреждениям микроорганизмами и грибами. Принципиально, что криогель ПВС не токсичен по отношению к включенным микроорганизмам.

Совокупность вышеизложенных характеристик свидетельствует о прогрессивности использования поливинилового спирта в технологии иммобилизации бактерий.

В то же время необходимо отметить ограниченное количество работ по применению этого носителя для иммобилизации светящихся бактерий или рекомбинантных штаммов с клонированными генами бактериальной биолуминесцентной системы.

В работах [21, 36, 37] проведены результаты иммобилизации светящихся бактерий *Ph. phosphoreum* в ПВС, полиуретане, полиакриламиде, Са-альгинате и Са-карбоксиметилцеллюлозе. Наилучшие результаты по интенсивности и длительности эмиссии получены с использованием Са-альгинатного геля. При этом отмечается, что препараты, иммобилизованные в криогеле ПВС, не люминесцируют непосредственно после проведения процедуры иммобилизации. Эмиссия света возникает после выдерживания препаратов в течение определенного срока при комнатной температуре.

Технология иммобилизации в ПВС-геле клеток *Vibrio fischeri* и генно-инженерного штамма *Pseudomonas putida* со встроенным lux-опероном из *Photobacterium luminescens* успешно реализована для биодетекции фенольных токсинов в промышленных отходах.

Можно полагать, что интенсивность и стабильность эмиссии иммобилизованных препаратов определяется типом носителя, процедурой иммобилизации и люминесцентными характеристиками выбранного штамма фотобактерий. Психрофильные штаммы *Ph. phosphoreum* обладают наиболее интенсивной и длительной люминесцентной активностью в глубоинной культуре (рис. 1) [20, 25].

Для изолированных клеток выход фотонов определяется как составом среды, так и условиями инкубации. Существенное значение в интенсивности и длительности биолуминесценции покоящихся клеток, кроме элементов питания, играют концентрация NaCl, температура и pH, комплексно воздействующих на люминесцентную активность клетки. Наиболее критично влияние температуры. Инкубация при температурах, превышающих оптимальные для каждого штамма значения, сопровождается существенным снижением или полной потерей люминесцентной активности биосенсора. Изолированные бактерии *Ph. phosphoreum* шт. 331 КМ МГУ способны сохранять люминесцентную активность в течение 2–4 недель в зависимости от температурного режима инкубации [9, 18]. В ряде работ отмечается, что иммобилизация фотобактерий в тех или иных носителях способна повышать стабильность свечения [25, 38, 39].

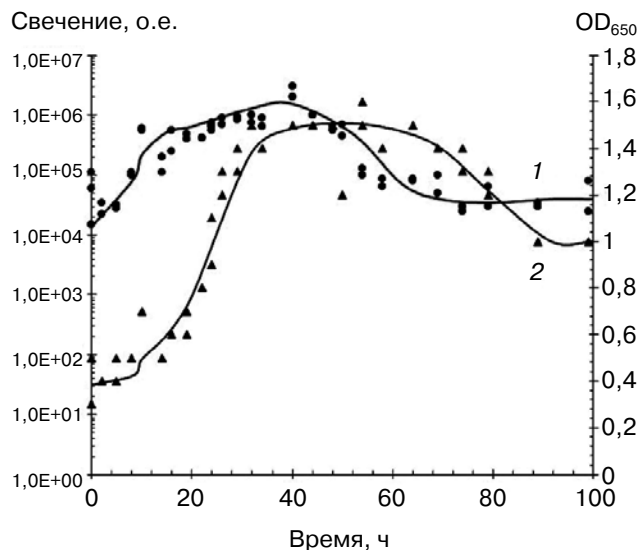


Рис. 1. Динамика роста и биолуминесцентной активности бактерий *Ph. phosphoreum* (шт. 331 КМ МГУ) из Белого моря при глубоинном культивировании при 20°. 1 — биолуминесцентная активность; 2 — оптическая плотность

Полученные нами результаты отражают технологические подходы и научные основы получения фотобиосенсоров на ПВС-носителе.

В основе научных подходов для получения высокоактивных биосенсоров с пролонгированной эмиссией заложены следующие предпосылки: 1) интенсивность и длительность свечения, как растущей культуры, так и покоящихся клеток, в первую очередь определяется специфическими природными свойствами вида и штамма фотобактерий; 2) люминесцентная реакция комплексно контролируется следующими элементами и процессами: метаболическим потенциалом клетки, обеспечивающим пул восстановленных эквивалентов; эффективностью переноса электронов на люциферазу, зависящую от активности дегидрогеназно-редуктазных ферментных комплексов и уровнем темновых утечек; физико-химическими параметрами (кислород, pH, температура, солевой состав), наличием активаторов и ингибиторов; 3) одним из наиболее узких звеньев эмиссионной активности клетки является пул восстановленного флавина.

ТЕХНОЛОГИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФОТОБАКТЕРИЙ В КРИОГЕЛЕ ПВС

Технологические операции по иммобилизации фотобактерий представлены на рис. 2. Принципиальным отличием данной схемы от обычно используемых процедур [34, 40], где ПВС ис-

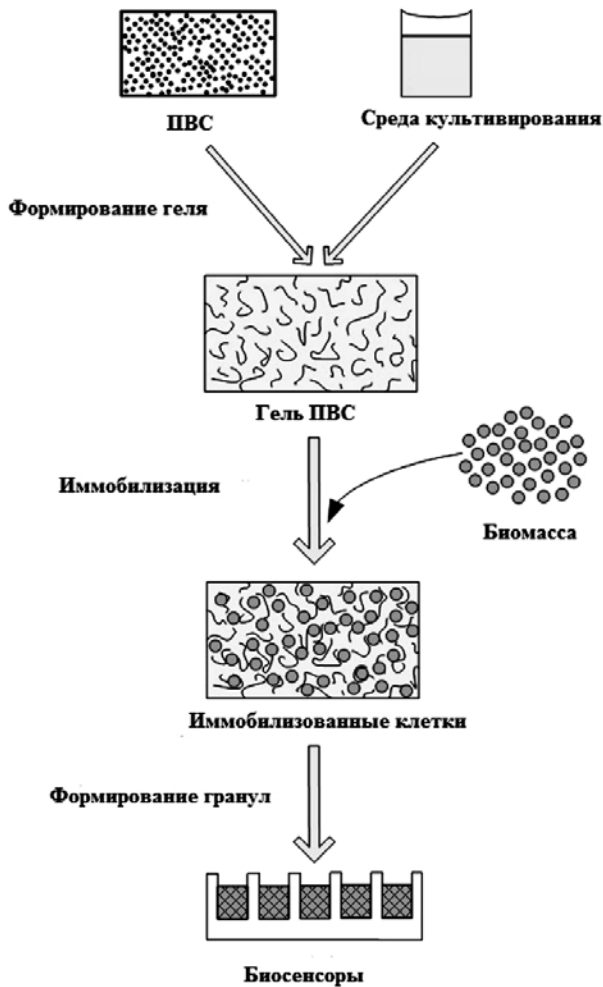


Рис. 2. Схема иммобилизации фотобактерий в криогеле поливинилового спирта

пользуется, как синтетическая матрица, а формирование геля осуществляется в простых солевых растворах, разработанная нами процедура включает введение в гель-формирующий раствор дополнительных компонентов, выполняющих роль субстратов и протекторов.

С использованием электронной микроскопии оценивали характеристики бинарной системы носитель–клетка: структуру геля после процедуры «замораживания/оттаивания», наличие прочно связанных клеток как на поверхности, так и в объеме носителя (рис. 3).

Электронная микроскопия показывает, что основное распределение клеток происходит в порах носителя ПВХ. При длительной инкубации при положительных температурах происходит интенсивное образование колоний прочно связанных клеток на поверхности носителя и формирование биопленки.

Эксперименты по анализу стабильности гранул с иммобилизованными клетками фотобактерий при хранении при отрицательных температурах проводили с использованием препаратов, сформированных на основе полной среды культивирования. При -80° 100%-ный уровень биолуминесцентной активности гранул сохранялся в течение двух лет. Остаточная активность гранул, хранившихся при -20° , за тот же период сохранялась на уровне 70%.

ФАКТОРЫ СТАБИЛИЗАЦИИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФОТОБАКТЕРИЙ В КРИОГЕЛЕ ПВХ

При использовании иммобилизованных фотобактерий в качестве биосенсоров особые требования предъявляются к длительности и стабильности свечения препаратов.

Нами [41–46] установлено, что определяющими элементами стабильности свечения иммобилизованных препаратов являются специфические природные характеристики люминесцентного цикла бактериального штамма. Наиболее критичными факторами для эмиссионной активности иммобилизованных клеток является среда формирования геля, температурный режим хранения, а также pH среды инкубации.

В таблице представлены данные по стабильности свечения штаммов при хранении изолированных клеток при разных температурах в среде культивирования. Показано, что при оптимальных условиях культивирования для каж-

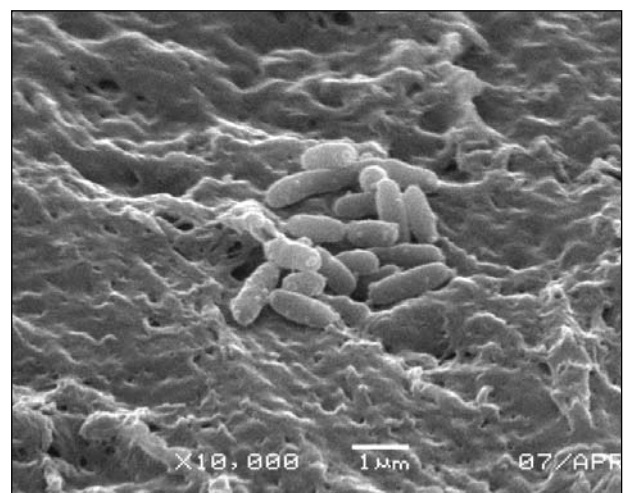


Рис. 3. Электронная фотография клеток на ПВХ-носителе в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,6

Интегральный выход фотонов и длительность эмиссии иммобилизованных в криогеле ПВС бактерий *P. phosphoreum*, *P. phosphoreum*, *V. harveyi*, *V. fischeri*

Штаммы фотобактерий	Иммобилизованные клетки		Свободные клетки	
	выход фотонов q, квант/кл	длительность свечения, сут	выход фотонов q, квант/кл	длительность свечения, сут
<i>P. phosphoreum</i> шт. 11040 (ATCC)	$1-5 \times 10^7$	14	10^6	3-7
<i>P. phosphoreum</i> шт. № 331 (КМ МГУ)	$1-5 \times 10^9$	42	10^8	14-21
<i>V. harveyi</i> шт. 292 MAV (ATCC)	$1-5 \times 10^6$	3	10^5	1-3
<i>V. fischeri</i> шт. № 6 (КМ МГУ)	$1-5 \times 10^6$	5	10^5	2-5

Примечание. Инкубацию проводили в 0,1 М Na-фосфатном буфере с 2%-ным NaCl, pH 7,8, при 4°.

дого штамма наиболее пролонгированной и интенсивной эмиссией обладает психрофильный штамм 331 КМ МГУ, выделенный из акватории Белого моря.

Данные, представленные в таблице, характеризуют общий интегральный выход фотонов и длительность свечения свободных и иммобилизованных клеток фотобактерий при соизмеримых концентрациях клеток в препарате и буфере: $1-2 \times 10^7$ кл/гранулу. Установлено, что иммобилизованные клетки обладают более пролонгированным свечением, чем свободные клетки всех использованных штаммов. При этом интенсивность и длительность свечения иммобилизованных препаратов находится в пропорциональном соответствии штаммовым отличиям этих параметров у свободных клеток: наиболее пролонгированным и интенсивным свечением обладают иммобилизованные клетки *Ph. phosphoreum* 331, наименьшей, — *V. harveyi*. Влияние состава среды формирования гелей на стабильность и удельную активность клеток при низкотемпературной иммобилизации труднопредсказуемо. Исходя из предположения, что среда формирования гелей должна оказывать влияние на стабильность и метаболическую активность клеток в носителе, прежде всего на стадии криогенного гелеобразования, проведен анализ эмиссионной активности и кинетики затухания свечения препаратов после процедуры «замораживание/оттаивание» в трех вариантах гелеформирующих сред: 1 — среда для глубинного культивирования (СК); 2 — полусинтетическая среда (СК без пептона); 3 — 3%-ный NaCl. Результаты анализа удельной активности гранул (таблица) после размораживания до 4° и стабилизации свечения клеток, показали, что наиболее эффективной средой формирования гелей является среда, используемая для культивирова-

ния бактерий. В данной среде после проведения криогенной иммобилизации и размораживания бактерии сохраняли практически 100%-ный уровень люминесцентной активности. Спад свечения гранул за 200 ч инкубации не превышал 1,5 порядка, детектируемый уровень свечения (10^{-6} от начального) гранул — более месяца. Исключение из среды формирования геля пептона приводит к снижению начальной эмиссионной активности гранул на 1–1,5 порядка. Существенный спад уровня свечения (в 10^3-10^4 раз) наблюдался при иммобилизации в гелях, сформированных в солевом растворе (3%-ный NaCl). Таким образом, состав среды формирования гелей оказывает существенное влияние на интенсивность и длительность эмиссии иммобилизованных препаратов. Концентрация носителя (5, 7, 10%) практически не меняет кинетические и эмиссионные параметры гранул. Кинетический профиль свечения гранул, сформированных на среде культивирования, несущественно зависит от состава среды инкубации. При инкубации гранул при 4° в трех разных средах: среде культивирования, 0,1 М Na-фосфатном буфере с 2%-ным NaCl, pH 7,6 и в растворе 3%-ного NaCl, установлены различия как в величине начальной эмиссии, так и в скорости затухания. Принципиально, что скорость затухания свечения свободных клеток во всех использованных средах существенно выше скорости затухания иммобилизованных. При инкубации гранул в 3%-ном NaCl затухание свечения происходит значительно быстрее, чем в буферной щелочной среде или в культуральной среде с pH более 7,5, вызванной более быстрым сдвигом pH в кислую область. Перенос потерявших свечение гранул из солевой среды в буферную среду полностью восстанавливает свечение. Очевидно, что основной лимитирующей стадией является скорость вос-

становления флавинового субстрата NAD-зависимыми дегидрогеназами. Анализ пула АТФ в иммобилизованных клетках в процессе инкубации в условиях дефицита энергетических субстратов или кислорода показал, что содержание АТФ в клетке остается постоянным ($\sim 10^{-18}$ моль/кл) в течение всего (более 200 ч) люминесцентного цикла, т.е. затухание свечения не является следствием энергетического дефицита иммобилизованных клеток.

Таким образом, установлено, что одним из наиболее критичных элементов является сдвиг рН среды инкубации гранул, за счет образования фотобактериями кислых продуктов метаболизма. Тот факт, что при переносе затухших в солевой среде фотобактерий в буферную среду с рН 8,5 приводит к полному восстановлению эмиссионной активности, подтверждает данное предположение [43, 46]. Необходимо обратить внимание на ряд принципиальных моментов. По данным работ [21, 36], иммобилизованные в ПВС бактерии *Ph. phosphoreum* обладали невысокой стабильностью, восстановление люминесценции требовало длительной реактивации при комнатной температуре в специальных средах. Длительность свечения одна неделя. Возможной причиной невысокой стабильности свечения ПВС-иммобилизованных фотобактерий могла быть низкая концентрация (3%) ПВС и температура (-10°) гелеобразования. В работе [40] реализована иммобилизация клеток *V. fischeri* и генно-инженерного штамма *Ps. putida* со встроенным lux-опероном из *Ph. luminescence*. В технологии иммобилизации использован 14%-ный раствор ПВС, с замораживанием до -20° . В обоих случаях в качестве дополнительного криопротектора в раствор криогеля вводился глицерин (20–30%). Обращает на себя внимание высокий уровень шумов препарата, свидетельствующий о низкой удельной активности клеток и быстрое затухание свечения препарата. Вероятно, невысокая активность и нестабильность свечения связаны с тем, что формирование геля происходило в чистом солевом растворе NaCl без субстратов и протекторов. Нами [41, 42] оптимизированы технологические операции иммобилизации в ПВС-геле светящихся бактерий *Ph. phosphoreum*, с сохранением практически 100%-ного уровня эмиссионной активности клетки без введения дополнительного криопротектора и процедуры активации свечения.

Наличие высокого пула эндогенных субстратов, сохраняющихся во время процедуры «замораживания/оттаивания» объясняет высокий уровень удельной активности иммобилизованных клеток при инкубации в дефицитных средах или простом солевом растворе. Иммобилизация в

криогеле позволяет добиться и существенной пролонгации эмиссионной активности бактерий. Возрастание длительности свечения стабилизированных матрицей клеток показано на самых разных типах носителей [3, 23, 28]. Однако ни в одной работе природа этого явления не объясняется. Можно полагать, что увеличение общего выхода фотонов иммобилизованными бактериями обеспечивается за счет стабилизации структурной организации мембрано-связанных ферментных комплексов люминесцентной электронтранспортной системы, как это описано для других клеток и ферментных систем [19]. Полученные результаты показывают, что основными элементами интенсивности и стабильности свечения иммобилизованных фотобактерий являются специфические природные эмиссионные характеристики бактериального штамма, среда формирования геля, процедура замораживания и реактивации, температура хранения и инкубации, начальное значение рН и буферность среды инкубации препаратов. По результатам выполненных исследований можно сделать вывод, что выбор в качестве объекта иммобилизации психрофильного штамма *Ph. phosphoreum* шт. 331 КМ МГУ имеет определяющее значение для получения препаратов с интенсивной и пролонгированной эмиссией, существенное значение имеет и состав среды формирования геля. В работе [37] показано, что протекторное действие на эмиссионную активность иммобилизованных в Са-альгинате бактерий *Ph. phosphoreum* оказывают, наряду с глицерином, глюкоза, сорбитол, DL-треонин.

Диффузия клеток из матрикса криогеля в раствор практически отсутствует, о чем свидетельствует незначительная (менее 1%) начальная активность (возможно связанная с вымыванием клеток из поверхностных слоев), которая в ходе дальнейшей инкубации полностью исчезает за одни сутки. Наиболее критичным фактором для эмиссионной активности и стабильности фотобактерий в носителе является температурный режим хранения и инкубации препаратов. ПВС эффективно стабилизирует свечение клеток при хранении при отрицательных температурах без дополнительных криопротекторов. Тем не менее температура хранения -80° наиболее оптимальна. Сходные результаты получены на альгинатной суспензии клеток фотобактерий с глицерином, в соответствии с которыми биолюминесцентная активность сохранялась без изменений в течение года при хранении при -80° , в то время как при -20° наблюдалось значительное увеличение скорости затухания, с полной потерей свечения в течение 4-х недель [11]. Существенное значение для практи-

ческого применения иммобилизованных препаратов имеют результаты инкубации гранул в разных средах. Поскольку скорость затухания свечения незначительно зависит от состава среды инкубации гранул, биосенсор может эффективно использоваться в простых солевых растворах, что особенно важно при анализе тяжелых металлов.

БИОМОНИТОРИНГ ТОКСИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ФОТОБАКТЕРИЙ

Полученные препараты иммобилизованных в криогеле ПВС клеток использованы в качестве биосенсоров в дискретном и непрерывном биомониторинге различных классов экотоксикантов.

Оптимизированные условия получения и хранения иммобилизованных клеток служили основой использования люминесцентных гранул в качестве биосенсоров токсинов. Для снятия диффузионных ограничений для токсинов геометрические размеры гранул минимизированы (диски 1 × 4 мм). На рис. 4 представлены гранулы с иммобилизованными клетками фотобактерий. Геометрические параметры гранул составлял 1–2 мм в высоту и 5 мм (не более) в диаметре, вес гранул 50–100 мг.

Кинетика ингибирования свечения полученных препаратов тяжелыми металлами и хлорфенолами сходна с кинетикой тушения свечения свободных клеток. Процедура анализа с использованием в качестве биосенсоров свободных и иммобилизованных клеток фотобактерий предусматривала инкубацию с токсином в течение 5, 15, 30 мин [10, 21]. Подобраны оптимальные физические и геометрические параметры биосенсора с минимальными ограничениями для диффузии токсинов. Установлено, что пороговая чувствительность свободных и иммобилизованных клеток к выбранным тушителям свечения (тяжелые металлы, хлорфенолы, алифатические и ароматические углеводороды, пестициды и гербициды) приблизительно одинакова.

Непрерывный биолюминесцентный мониторинг токсикантов успешно реализован на биосенсорах на основе ПВС-иммобилизованных психрофильных штаммов *Ph. phosphoreum*, обладающих длительной (свыше 100 ч в глубинной культуре) и интенсивной (10^5 квант/с.кл) люминесценцией [43, 46]. Измерения проводили в специально сконструированной камере с про-



Рис. 4. Люминесцирующие гранулы с иммобилизованными в криогеле ПВС бактериями *Ph. phosphoreum* шт. 331 ККМ МГУ

точной кюветой. Аппаратурное обеспечение включало, наряду со светорегистрирующим блоком, систему протока среды (2%-ный NaCl или морская вода, перистальтическая помпа) и систему инъекции пробы (токсикант в специфическом растворе, дозатор). Температура протока среды поддерживалась на постоянном уровне охлаждающим термостатом. Условия протока оптимизированы на основе анализа времени тушения свечения минимальными концентрациями токсикантов: скорость протока поддерживалась ниже скорости тушения свечения. Скорость протока — 0,5 мл/мин, время запаздывания инжектируемой пробы объемом 100 мкл — 2–5 с, объем реактора — 1,5 мл, сферическая гранула.

Установлено, что в режиме протока эмиссионная активность стабильна в течение суток при температуре раствора 20° (не более). Кинетический профиль тушения свечения зависит от концентрации токсиканта. Кинетика реверсии эмиссии отражает обратимость ингибиторного эффекта, связанного с вымыванием ингибитора протоком среды.

Таким образом, разработаны и оптимизированы технологические операции по иммобилизации светящихся бактерий в криогеле поливинилового спирта. Научно обоснованы наиболее важные физико-химические и биохимические элементы стабилизации свечения препаратов. Биосенсоры эффективно апробированы в анализе токсичных веществ в дискретном и непре-

рывном режиме биотестирования. Новый тип биосенсоров, основанный на иммобилизованных в криогеле ПВС клетках фотобактерий,

перспективен для практического применения в задачах экологического биомониторинга окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дерябин Д.Г. (2009) Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты, Наука, Москва, с. 246.
2. Danilov, V.S., and Ismailov, A.D. (1989) Bacterial luciferase as a biosensor of biologically active compounds. In *Applied Biosensors*, (Wise, D., ed.), Boston, pp. 39–78.
3. Mitchell, R.J., and Gu, M.B. (2006) Characterization and optimization of two method in the immobilization of 12 bioluminescent strains, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 192–199.
4. Parvez, S., Venkataraman, C., and Mukherji, S. (2006) A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environ. Int.*, **32**, 265–268.
5. Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., and Hansen, P.D. (2002) The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers, *Chemosphere*, **46**, 225–233.
6. Yin, J., Li, X., Zhou, C., and Zhang, Y. (2005) Luminescent bacterial sensors made from immobilized films of *Photobacterium phosphoreum*, *Chem. Res. Chinese Univ.*, **21**, 44–47.
7. Yoo, S.K., Lee, J.H., Yun, S.S., Gu, M.B., and Lee, J.H. (2007) Fabrication of a bio-MEMS based cell-chip for toxicity monitoring, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1586–1592.
8. Lee, J.H., Mitchell, R.J., Kim, B.C., Cullen, D.C., and Gu, M.B. (2005) A cell array biosensor for environmental toxicity analysis, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 500–507.
9. Bulich, A.A. (1979) Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In *Aquatic Toxicology. American Society for Testing and Materials* (Markings, L.L., and Kimerleeds, R.A., eds), Philadelphia, p. 8.
10. Sun, T.S., and Stahr, H.M. (1993) Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test, *J. AOAC Int.*, **76**, 893–898.
11. Verschaeve, L., Van Gompel, J., Thilemans, L., Regniers, L., Vanparys, P., and van der Lelie, D. (1999) VITOTOX bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **33**, 240–248.
12. Chun, U.-H., Simonov, N., Chen, Y., and Britz, M.L. (1996) Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*, *Resour. Conserv. Recy.*, **18**, 25–40.
13. Park, K.S., Baumstark-Khan, Ch., Rettberg, P., Horneck, G., Rabbow, E., and Gu, M.B. (2005) Immobilisation as a technical possibility for long-term storage of bacterial biosensors, *Radiat. Environ. Biophys.*, **44**, 69–71.
14. Heitzer, A., Malachowsky, K., Thonnard, J.E., Bienkowski, P.R., White, D.C., and Saylor, G.S. (1994) Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1487–1494.
15. Van Dyk, T.K., Majarian, W.R., Konstantinov, K.B., Young, R.M., Dhurjati, P.S., and Larossa, R.A. (1994) Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1414–1420.
16. Belkin Sh. (2003) Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants, *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 206–212.
17. Okamoto, K., Ishiura, M., Torii, T., and Aoki, S. (2007) A compact multi-channel apparatus for automated real-time monitoring of bioluminescence, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 535–538.
18. Polyak, B., Bassis, E., Novodvoretz, A., Belkin, Sh., and Marks, R.S. (2001) Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxicants: system optimization, *Sens. Actuators B Chem.*, **74**, 18–26.
19. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. (1994) Иммобилизованные клетки микроорганизмов, МГУ, Москва, с. 288.
20. Brodelius, P., and Vandamme, E.J. (1987) Immobilized cells systems. In *Biotechnology. A Comprehensive Treatise in 8 Volumes* (Rehm, H.J., and Reed, G., eds), VCH Verlag, Weinheim, **7a**, 405–464.
21. Makiguchi, N., Arita, M., and Asai, Y. (1980) Immobilization of a luminous bacterium and light intensity of luminous material, *J. Ferment. Technol.*, **58**, 17–21.
22. Arnold, M.A. (1990) Fiber-optic biosensors, *J. Biotechnol.*, **15**, 219–228.
23. Kohler, S., Belkin, S., and Schmid, R.D. (2000) Reporter gene bioassays in environmental analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 769–779.
24. Yin, J., Li, X., Zhou, C., and Zhang, Y. (2005) Luminescent bacterial sensors made from immobilized films of *Photobacterium phosphoreum*, *Chem. Res. Chinese Univ.*, **21**, 44–47.
25. Blume, L.J., Gautier, S.M., and Coulet, P.R. (1993) Design of bioluminescence-based fiber optic sensors for flow-injection analysis, *J. Biotechnol.*, **31**, 357–368.
26. Blume, L.J., Gautier, S.M., and Coulet, P.R. (1989) Design of luminescence photobiosensors, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4**, 543–550.
27. Cho, J., Park, K., Ihm, H., Park, J., Kim, S., Kang, I., Lee, K., Jahng, D., Lee, K., and Kim, S. (2004) A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 338–344.
28. Lee, B., Lee, J., Shin, D., and Kim, E. (2006) Statistical optimization of bioluminescence *Photobacterium phosphoreum* KCTC 2852, *Environ. Int.*, **32**, 265–268.
29. Marks, R., Polyak, B., Novodvoretz, A., and Belkin, Sh. (2001) Bacterial biosensors for environmental analysis, *G.I.T. Laboratory J.*, **3**, 122–123.
30. Premkumar, J.R., Ovadia, L., Marks, R.S., Polyak, B., Rosen, R., and Belkin, Sh. (2001) Antibody-based immobilization of bioluminescent bacterial sensor cells, *Talanta*, **55**, 1029–1038.
31. Kim, S.K., Lee, B.S., Lee, J.G., Seo, H.J., and Kim, E.K. (2003) Continuous water toxicity monitoring using immobilized *Photobacterium phosphoreum*, *Biotechnology Bioengineering*, **8**, 147–150.
32. Kim, B.Ch., and Gu, M.B. (2005) A multi-channel continuous water toxicity monitoring system: its evaluation and application to water discharged from a power plant, *Environ. Monit. Assess.*, **109**, 123–133.
33. Lee, J.H., and Gu, M.B. (2005) An integrated mini biosensor system for continuous water toxicity monitoring, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 1744–1749.
34. Lozinsky, V.I., and Plieva, F.M. (1998) Poly(vinyl-alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization.

- Overview of recent research and developments, *Enzyme Microbial Technol.*, **23**, 227–242.
35. Varfolomeev, S.D., Rainina, E.I., Lozinsky, V.I., Kalyuzhnyi, S.B., Sinitsyn, A.P., Makhlis, T.A., Bachurina, G.P., Bokova, I.G., Sklyankina, O.A., and Agafonov, E.V. (1989) Application of poly(vinyl alcohol) cryogel for immobilization of mesophilic and thermophilic microorganisms. In *Physiology of immobilized cells* (de Bont, J.A.M., Visser, J., Mattiasson, B., and Tramper, J., eds), Elsevier, Wageningen, pp. 325–330.
 36. Makiguchi, N., Arita, M., and Asai, Y. (1980) Optimum cultural conditions for strong light production by *Photobacterium phosphoreum*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 75–83.
 37. Makiguchi, N., Arita, M., and Asai, Y. (1980) Optimal conditions for frozen storage of immobilized luminous bacteria, *J. Ferment. Technol.*, **58**, 333–337.
 38. Лозинский В.Н. (1998) Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта, *Успехи химии*, **67**, 641–655.
 39. Bechor, O., Smulski, D.R., Van Dyk, T.K., LaRossa, R.A., and Belkin, S. (2002) Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants detection by *Escherichia coli* bearing fabA::lux fusions, *J. Biotechnol.*, **94**, 125–132.
 40. Philp, J.C., Balmand, S., Hajto, E., Bailey, M.J., Wiles, S., Whiteley, A.S., Lilley, A.K., Hajto, J., and Dunbar, S.A. (2003) Whole cell immobilization biosensors for toxicity assessment of wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste, *Anal. Chim. Acta*, **487**, 61–74.
 41. Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Куц В.В., Аленина К.А., Холстов А.В., Исмаилов А.Д. (2010) Люминесцентный биокатализатор для определения токсикантов. Патент № 2394910.
 42. Ефременко Е.Н., Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Исмаилов А.Д. (2014) Токсикологические биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum*, *Прикладная биохимия и микробиология*, **5**, 490–496.
 43. Alenina, K.A., Aleskerova, L.E., Kascheyeva, P.B., and Ismailov, A.D. (2012) The poly(vinyl alcohol)-immobilized photobacteria for toxicology monitoring, *Engineering*, **4**, 118–119.
 44. Ismailov, A.D., Kutz, V.V., and Yefremenko, E.N. (2010) Factors affecting the stability of a light emission at PVA-immobilized cells of *Photobacterium phosphoreum*, *J. Luminescence*, **25**, 166–167.
 45. Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Ефременко Е.Н., Мажуль М.М., Пискункова Н.Ф., Исмаилов А.Д. (2014) АТФ-пул и биолюминесцентная активность у психрофильных бактерий *Photobacterium phosphoreum*, *Микробиология*, **83**, 315–321.
 46. Куц В.В., Аленина К.А., Сенько О.В., Ефременко Е.Н., Исмаилов А.Д. (2011) Биолюминесцентный анализ токсикантов (экологическая люминометрия), *Вода: химия и экология*, **10**, 47–53.

PHOTOBIOSENSORS USING LUMINOUS BACTERIA

A. D. Ismailov*, L. E. Aleskerova

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Moscow 119991, Russia; E-mail: anvaris@list.ru*

Received January 20, 2015
Revision received March 2, 2015

The scientific basics of preparing luminescent biosensors using free and immobilized luminous bacteria are covered. Modern technologies of designing biological test systems, procedures of immobilization of bacteria in various carriers, and technologies of integrated and specific detection of toxins are described. Data on preparation and use in bio-monitoring of ecological toxins by natural and genetically modified strains of photobacteria are analyzed. Special attention is given to an immobilization of photobacteria in polyvinyl alcohol (PVA) cryogel. The basic physical, biochemical, and technological elements of stabilization of the luminescence of bacteria in the immobilized state are described. The results of application of the immobilized preparations of photobacteria in discrete and continuous bio-monitoring of various classes of ecological pollutants are presented.

Key words: bioluminescence, biomonitoring, luminous bacteria, biosensors, immobilization, gels, polyvinyl alcohol