

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ мониторинг **ЭКОТОКСИКАНТОВ** (ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ЛЮМИНОМЕТРИЯ)

Разработаны технологии биолюминесцентного анализа токсинов с использованием свободных фотобактерий и иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта.

В силу высокой чувствительности, быстродействия и стабильности люминесцентные биосенсоры перспективны для экспресс-мониторинга тяжелых металлов, алифатических и ароматических ксенобиотиков и других токсичных агентов в режиме реального времени в водных акваториях и промышленных стоках, а также для использования в контроле за процессами биотрансформации и деградации токсинов.



Введение

Современная стратегия люминесцентного биомониторинга окружающей среды основывается на определении общей токсичности образца (по уровню тушения свечения биосенсора на природных штаммах фотобактерий) и специфической генотоксичности (по активации свечения мутантов или генинженерных штаммов, со встроенным комплексом сенсорных и люминесцентных генов).

Широта практического применения фотобактерий в биомониторинге среды связана с чувствительностью биолюминесцентной реакции клеток к широкому спектру токсинов с цитотоксичным и (или) генотоксичным действием. Интенсивность свечения природного или генинженерного объекта служит количественным индикатором общей или специфичной токсичности образца. Эмиссионный ответ для широкого круга токсинов хорошо коррелирует с реакцией стандартных биотестов на рыбах, ракообразных, простейших — величина 50 %-ного тушения свечения (EC50) коррелирует с величиной LD50, с коэффициентами корреляции 0,8–0,95 [1, 2].

В качестве люминесцентных биосенсоров используются как свободные, так и иммобили-

В.В. Куц,
ассистент
биологического
факультета,
Московский
государственный
университет
им. М.В. Ломоносова
(МГУ
им. М.В. Ломоносова)

К.А. Аленина,
научный сотрудник
биологического
факультета,
Московский
государственный
университет
им. М.В. Ломоносова
(МГУ
им. М.В. Ломоносова)

лизованные клетки. Реализован коммерческий выпуск тест-систем «Microtox» (Azur Environmental), Toxalert (Merck) на основе бактерий *Photobacterium phosphoreum* [1], а также «Mutatox» [3], «Vitatox» [4] на основе *Vibrio fischeri* и др. Разработаны процедуры получения лиофилизированных и иммобилизованных клеток разных видов фотобактерий, а также технологические операции применения этих препаратов для дискретного и непрерывного биомониторинга экотоксикантов [5–7]. Значительная часть работ последних лет проведена на luxCDABE-маркированных штаммах *E. coli* и других видах бактерий в целях специфической детекции стрессовых состояний, ДНК повреждающих и мембранотропных агентов органической и неорганической природы [3, 5, 8, 9].

Результаты и их обсуждение

Технология люминесцентного биомониторинга

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

Светоизлучающие объекты:

◆ Природные светящиеся бактерии *P. phosphoreum*, *Vibrio harveyi*, *V. fischeri* и др.;

◆ Специфические мутанты *V. harveyi* и *V. fischeri*;

◆ Рекомбинантные штаммы многих видов бактерий с клонированными генами люциферазы.

На *рис. 1* показаны светящиеся бактерии в лабораторной культуре.

На клеточном уровне люминесцентный биосенсор включает в себя:

сенсорный элемент (S);

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 и др., прямо или косвенно связанные с люминесцентной системой. Реакция биосенсора — тушение свечения.

В мутантных и рекомбинантных штаммах сенсорными элементами являются промото-

О.В. Сенько,
научный сотрудник
химического
факультета,
Московский
государственный
университет
им. М.В. Ломоносова
(МГУ
им. М.В. Ломоносова)

Е.Н. Ефременко,
доктор биологических
наук, заведующий
лабораторией
химического
факультета,
Московский
государственный
университет
им. М.В. Ломоносова
(МГУ
им. М.В. Ломоносова)

А.Д. Исмаилов*,
доктор биологических
наук, ведущий
научный сотрудник
биологического
факультета,
Московский
государственный
университет
им. М.В. Ломоносова
(МГУ
им. М.В. Ломоносова)

ры специфически экспрессируемых генов защиты от органических ксенобиотиков, тяжелых металлов, мутагенов, в т.ч. ДНК-повреждающих агентов, мембранотропных веществ, ингибиторов ферментов биосинтеза липидов, транспортных белков, белков теплового и окислительного стресса. Реакция биосенсора на химические пускатели — активация свечения.

Репортерный элемент природных фотобактерий композиционно состоит из 5 генов биолюминесцентного оперона — *luxCDABE* и регуляторных генов *luxI* и *luxR*; репортерным элементом генинженерных штаммов является беспромоторный транспозон *luxCDABE*. Генинженерный 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.

Трансформация химической энергии в световой сигнал всеми типами биосенсоров осуществляется на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений стандартными фотодетекторами.

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 - химического, трансформирующего химическую энергию в световую, и фотоэлектронного, преобразующего световой поток в электрический сигнал.

Интегральная биодетекция токсинов

В оценке неспецифической токсичности пробы критерием токсичности служит уровень тушения биолюминесценции. На *рис. 2* показана визуальная картина ингибирования биолюминесценции возрастающими концентрациями токсиканта и определение степени токсичности образца.

В результате проведенных нами и в других лабораториях исследований [1, 7, 10] оптимизированы технологии получения и условия хранения препаратов с высокостабильной эмиссией, разработаны оригинальные методики практического применения тест-системы для биомониторинга воды. Биолюминесцентный анализ различных классов токсинов успешно реализован с

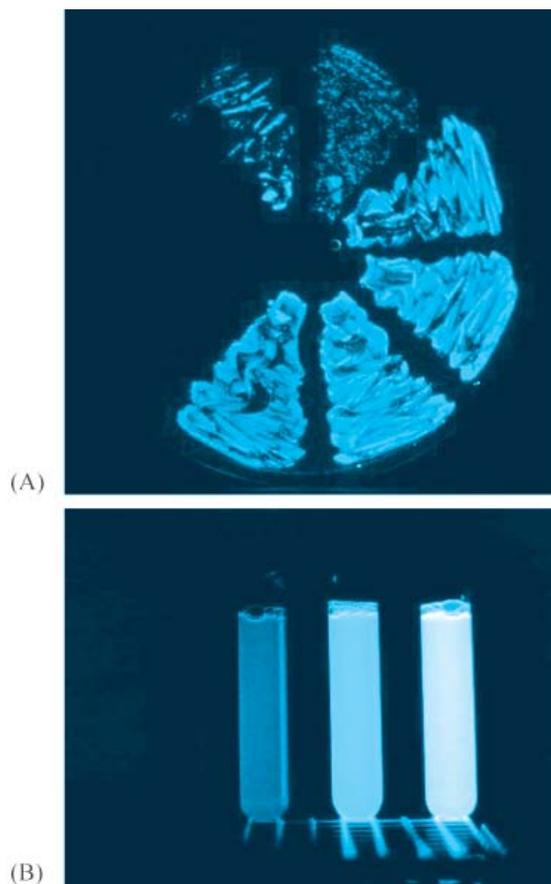


Рис. 1. Светящиеся бактерии *P. phosphoreum* в лабораторной культуре на твердой (А) и в жидкой (Б) средах.

* Адрес для корреспонденции: anvaris@list.ru

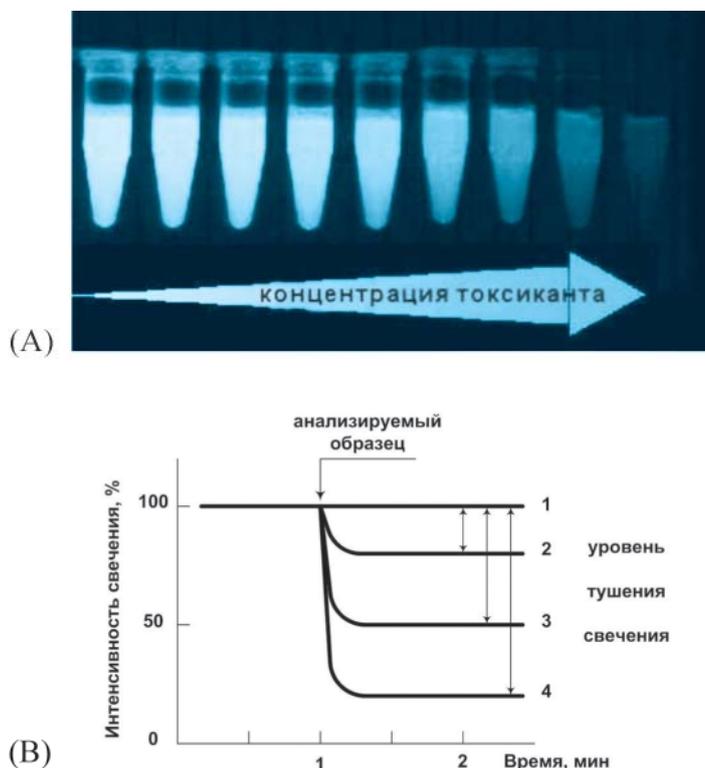


Рис. 2. (А) Принцип билюминесцентного тестирования токсичности. (Б). Определение степени токсичности образца. Индикатор степени загрязненности — уровень тушения свечения фотобактерий: 1. Образец не токсичен (нет тушения свечения); 2. Образец малотоксичен (тушение свечения $\leq 20\%$); 3. Образец токсичен (тушение свечения $\sim 50\%$); 4. Образец сильно токсичен (тушение свечения $\geq 80\%$).

использованием в качестве биосенсоров свободных клеток *P. phosphoreum*, *V. harveyi*, *V. fischeri*. В табл. 1 представлены значения полумаксимального ингибирования свечения (EC50) фотобактерий выборочными группами токсинов.

Специфическая биодетекция токсинов

В системах специфической детекции токсинов на генинженерных штаммах (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescence* и др. в свободной или иммобилизованной форме) реализуется обратный принцип — величина активации свечения при включении специфических генов-мишеней, сцепленных с Lux CDABE опероном [3–6, 8]. Индукция билюминесцентного ответа lux-рекомбинантных клеток на ионы Zn, Hg, пентахлорфенол и ряд других токсикантов наблюдается в течение 1–2 ч. Основная сложность применения lux-маркированных бактерий связана с технологией конструирования генинженерного биосенсора. Кроме того, не исключается возможность неспецифического взаимодействия токсичного агента с альтернативными биологическими мишенями клетки.

Иммобилизованные фотобактериальные биосенсоры

Иммобилизация фотобактерий позволяет повысить стабильность биосенсора при хранении и длительность его применения. В качестве носителей для получения иммобилизованных фотобиосенсоров используются как природные, так и синтетические гель формирующие агенты. Определяющими критериями при выборе матрицы и технологии иммобилизации являются интенсивность и стабильность люминесцентной реакции клеток в носителе [5, 6, 10]. В задачах по созданию билюминесцентных токсикологических биосенсоров для дискретного и непрерывного мониторинга токсикантов наибольшее распространение получили Ca^{2+} и Sr^{2+} -альгинатные гели [11, 12]. Альгинатные биосенсоры формируются в виде пленок или гранул, которые используются в процедурах биотестирования как в изолированном виде, так и закрепленными непосредственно на поверхности фотодетектора.

Перспективны для практического применения комбинированные системы: «биосенсор — фотопроводник-фотодетектор» с нанесенными на торцы оптоволоконных нитей Са-альгинатного геля с lux-сенсорными клетками [13].

Наряду с указанными гель-формирующими агентами в иммобилизации микроорганизмов успешно применяются криогели поливинилового спирта (ПВС) [14]. Криогели ПВС обладают рядом структурных и физико-химических свойств, имеющих существенное значение для создания люминесцентных биосенсоров.

Гетерофазность структуры матрикса, формирующаяся в ходе процедуры замораживания/оттаивания, оптимальна для стабилизации клеток. Наличие макропор (0,1–1 мкм) снимает диффузионные ограничения «эластичной» структуры для субстратов и молекул токсинов самой различной химической природы. Особое значение для практического применения имеет термостабильность гелей. Физические характеристики сформированных ПВС-криогелей устойчивы в широком диапазоне положительных температур, вплоть до 70–80 °С, 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 фотобактерий. Дополнительным преимуществом ПВС-криогелей является высокая

Таблица 1

Величины полумаксимального тушения свечения (EC₅₀) свободных клеток *P. phosphoreum* токсинами за 15 мин анализа

Название	Формула	EC ₅₀ = LD ₅₀ мг/л, 15 мин
Тяжелые металлы		
Цинк	Zn ²⁺	1,0
Медь	Cu ²⁺	0,05,0
Ртуть	Hg ²⁺	0,02
Кадмий	Cd ²⁺	5,0
Свинец	Pb ²⁺	1,0
Анилины		
Пентахлороанилин	C ₆ H ₂ Cl ₅ N	12,0
2,3,4-трихлоранилин	C ₆ H ₄ Cl ₃ N	2,0
3,4-дихлоранилин	C ₆ H ₅ Cl ₂ N	0,4
2-хлоранилин	C ₆ H ₆ ClN	16,0
Анилин	C ₆ H ₇ N	64,0
Хлорфенолы		
2,3,4,5-тетрахлорфенол	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	0,3
2,3,4-трихлорфенол	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	1,8
2,3-дихлорфенол	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	4,0
Фенол	C ₆ H ₆ O	22,0
Пентахлорфенол	C ₆ HCl ₅ O	0,05
Хлорбензолы		
2,4,6-трихлорнитробензол	C ₆ H ₂ Cl ₃ NO ₂	0,7
2,4,6-дихлорнитробензол	C ₆ H ₃ Cl ₂ NO ₂	1,0
2-хлорнитробензол	C ₆ H ₄ ClNO ₂	4,0
Пестициды		
Диурон	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	16,0
Малатион	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	3,0
Карбарил	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	2,01
Диазинол	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	1,7
DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	7,0
Кельган	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	0,4

устойчивость к биоповреждениям микроорганизмами и грибами. Принципиально, что криогель ПВС нетоксичен по отношению к включенным микроорганизмам.

Иммобилизация в ПВС-криогеле клеток *V. fischeri* и генинженерного штамма *Pseudomonas putida* со встроенным lux-опероном из *Photobacterium luminescens* успешно реализована для биодетекции фенольных токсинов в промышленных отходах [15].

Нами [16] разработаны технология получения высокостабильных биосенсоров и аналитические операции применения иммобилизованных в криогеле ПВС фотобактерий для дискретного и непрерывного биомонито-

ринга экотоксикантов в режиме реального времени. В основе технологических процедур заложены следующие предпосылки.

Интенсивность и длительность свечения, в первую очередь, определяется специфическими природными свойствами вида и штамма фотобактерий. Наиболее критичным элементом люминесцентной реакции клетки является пул восстановленного флавина (субстрата люциферазы), который зависит как от активности дегидрогеназно-редуктазных ферментных комплексов начального участка дыхательной цепи, так и от уровня темновых утечек на пути переноса электронов на люциферазу. Наряду с физиологическими элементами люминесцентная активность контролируется физико-химическими параметрами (рН, температура, солевой состав). В рамках вышеизложенных критериев проведен скрининг различных штаммов фотобактерий и оптимизированы физико-химические условия применения аналитических препаратов для дискретного и непрерывного биомониторинга водных экотоксикантов. На рис. 3 представлены гранулы криогеля ПВС с иммобилизованными светящимися бактериями после процедуры замораживания/оттаивания.

При хранении при -80 °С биолюминесцентная активность гранул не изменялась в течение 2-летнего периода наблюдения. Люминесцентная активность иммобилизованных клеток при хранении в среде культивирования при 4 °С детектировалась по прошествии 1 месяца. Длительность применения индивидуального препарата при 10–15 °С была до 2 дней. Принципиально, что скорость затухания свечения свободных клеток существенно выше скорости затухания иммобилизованных. На рис. 4 показана временная зависимость свечения свободных и иммобилизованных клеток *P. phosphoreum* [17].

Таким образом, иммобилизованные в ПВС-криогеле клетки характеризуются не только высоким уровнем эмиссии, но и повышенной стабильностью люминесцентной активности клетки.

Дискретный анализ тяжелых металлов, хлорфенолов и пестицидов с использованием иммобилизованных в криогель ПВС клеток P. phosphoreum

Проведен сравнительный анализ кинетики ингибирования иммобилизованных в ПВС-криогеле клеток различными классами токсинов. Подобраны оптимальные физические и геометрические параметры биосенсора с минимальными ограничениями для диффузии токсинов. Установлено, что пороговая

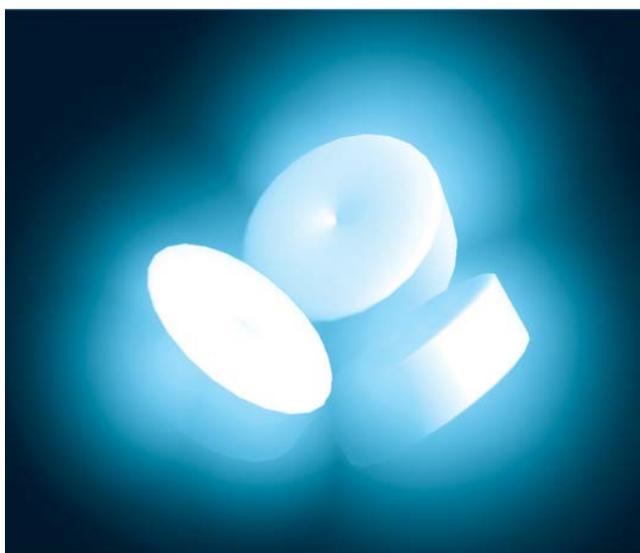


Рис. 3. Люминесцирующие гранулы с иммобилизованными в криогеле ПВС бактериями *P. phosphoreum* шт. 331 ККМ МГУ.

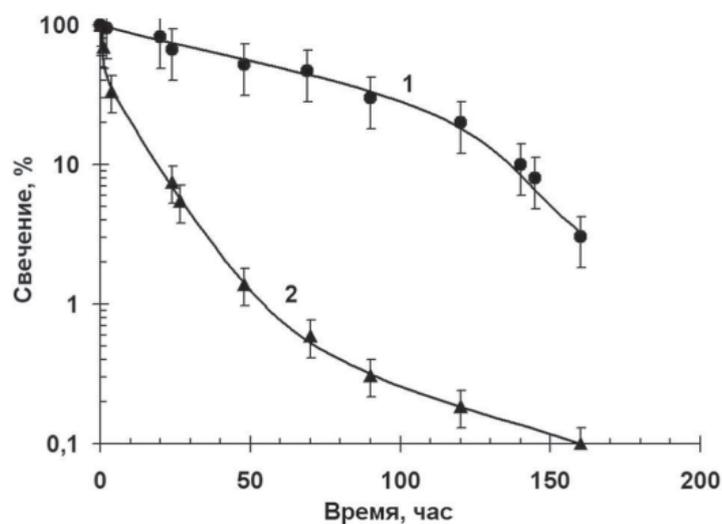


Рис. 4. Временная зависимость свечения свободных и иммобилизованных клеток *P. phosphoreum* шт. 331 КМ МГУ при 4 °С. 1 – иммобилизованные клетки; 2 – свободные клетки. Среда инкубации - 2,5 % NaCl.

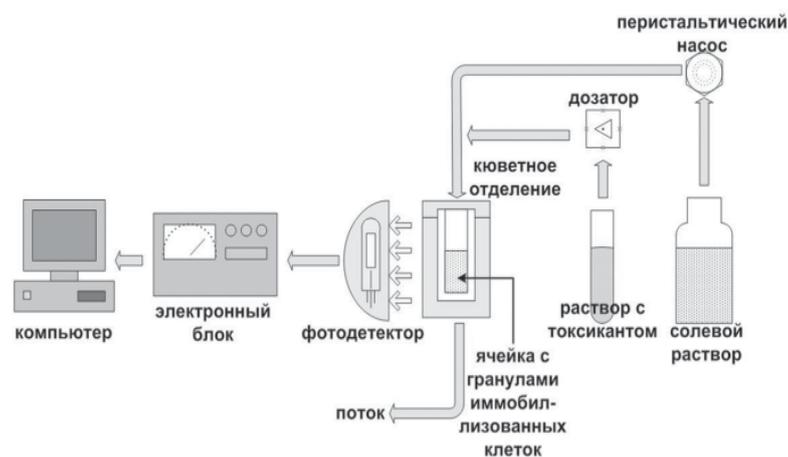


Рис. 5. Схема непрерывного мониторинга токсинов.

чувствительность свободных и иммобилизованных клеток к выбранным тушителям свечения (тяжелые металлы, хлорфенолы, алифатические и ароматические углеводороды, пестициды и гербициды) приблизительно одинакова и в целом соответствует литературным данным [1, 10, 16].

Система мониторинга в потоке

В последнее время опубликован ряд работ по биолюминесцентному мониторингу токсикантов в потоке, в частности [5, 6, 12]. Непрерывный биолюминесцентный мониторинг токсикантов успешно реализован нами на биосенсорах на основе ПВС-иммобилизованных психрофильных штаммов *P. phosphoreum*, обладающих длительной (свыше 100 ч в глубинной культуре) и интенсивной (105 кв./с.кл.) люминесценцией [17]. Измерения проводили в специально сконструированной камере с проточной кюветой. Аппаратурное обеспечение включало, наряду со светорегистрирующим блоком, систему протока среды (2 % NaCl или морская вода, перистальтический насос) и систему инъекции пробы (токсикант в маточном растворе, дозатор). Температура проточной 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, 1 сферическая гранула.

Схема системы непрерывного мониторинга с термостатированием представлена на рис. 5. Установлено, что в режиме протока эмиссионная активность стабильна в течение суток при температуре раствора 10–20 °С. Кинетический профиль тушения свечения зависит от концентрации токсиканта. Кинетика реверсии эмиссии отражает обратимость ингибиторного эффекта, хотя уровень свечения после вымывания токсиканта может не соответствовать исходному значению.

На рис. 6 представлена кинетика биолюминесцентного ответа в проточном режиме при инъекции возрастающих концентраций CuSO_4 .

С ростом концентрации токсинов время релаксации увеличивается, однако даже при концентрациях ингибиторов, превышающих EC_{50} на порядок при выбранной скорости протока, сохраняется не менее 10 % люминесцентной активности. Быстрое восстановление активности при отмыве ингибитора позволяет использовать один иммобилизо-

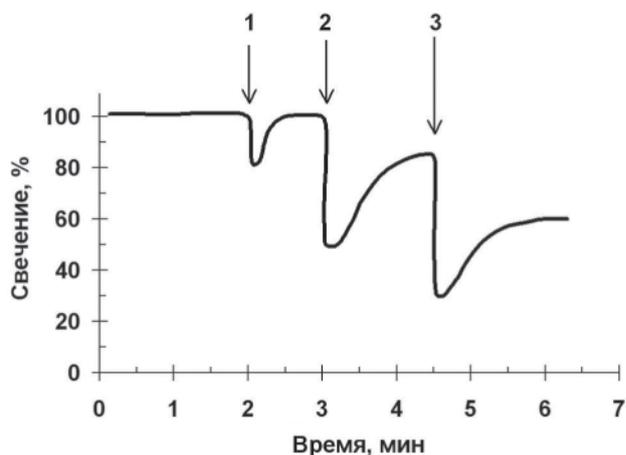


Рис. 6. Кинетика обратимого ингибирования свечения в проточке CuSO_4 . 1 – 50 мкМ; 2 – 0,5 мМ; 3 – 1 мМ.

ванный препарат для многократной детекции проб. 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.

Заключение

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, быстродействия и экономичности по сравнению с другими биотестами, могут использоваться для экспресс-детекции разнообразных ксенобиотиков,

гербицидов, инсектицидов, тяжелых металлов, а также в контроле за процессами биотрансформации и деградации токсинов. Люминесцентная реакция светящихся бактерий является чувствительным индикатором нарушений энергетического и структурного метаболизма организма, что обосновывает выбор в качестве идеального объекта исследований механизмов действия тех или иных групп токсинов именно светящихся бактерий.

Литература

1. Bulich A.A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments // *Aquatic Toxicology* / Eds. L.L. Markings, R.A. Kimerle. Philadelphia, American Society for Testing and Materials. 1979. P. 98–106.
2. Indorato A.M. Toxicity screening using MICROTOX® analyzer / A.M. Indorato, K.B. Snyder, P.J. Usinowicz // *Drug and medical toxicology*. Eds. D. Lin, B. Duthka. N.-Y., Marcel Dekker. 1984. P. 37–53.
3. Sun T.S. Evaluation and application of a bioluminescent bacterial genotoxicity test / T.S. Sun, H.M. Stahr // *J. AOAC Int.* 1993. V. 76, № 4. P. 893–898.
4. Verschaeve L. VITOTOX bacterial genotoxicity and toxicity test for the rapid screening of chemicals / L. Verschaeve, J. Van Gompel, L. Thilemans, L. Regniers, P. Vanparys, D. van der Lelie // *Environ. Mol. Mutagen.* 1999. V. 33, № 3. P. 240–248.
5. Cho J.C. A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium / J.C. Cho, K.J. Park, H.S. Ihm, J.E. Park, S.Y. Kim, I. Kang, K.H. Lee, D. Jahng, D.H. Lee, S.J. Kim // *Biosens. Bioelectron.* 2004. V. 20. P. 338–344.
6. Lee B. Statistical optimization of bioluminescence *Photobacterium phosphoreum* KCTC



2852 / B. Lee, J. Lee, D. Shin, E. Kim // *Environ. Int.* 2006. V. 32, № 2. P. 265–268.

7. Куц В.В. Ингибиторное действие фенольных экотоксикантов на фотобактерии при различных значениях pH / В.В. Куц, Ю.М. Ильина, А.Д. Исмаилов, А.И. Нетрусов // *Прикл. Биохим. Микробиол.* 2005. № 6. С. 640–646.

8. Lee J.H. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis / J.H. Lee, R.J. Mitchell, B.C. Kim, D.C. Cullen, M.B. Gu // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V. 21, № 3. P. 500–507.

9. Van Dyk T.K. Rapid and Sensitive Pollutant Detection by Induction of Heat Shock Gene-Bioluminescence Gene Fusions / T.K. Van Dyk, W.R. Majarian, K.B. Konstantinov, R.M. Young, P.S. Dhurjati, R.A. Larossa // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60, № 5. P. 1414–1420.

10. Ismailov A.D. Factors affecting the stability of a light emission at PVA-immobilized cells of *Photobacterium phosphoreum* / A.D. Ismailov, V.V. Kutz, E.N. Efremenko // *J. Lumin.* 2010. V. 25. P. 166–167.

11. Makiguchi N. Immobilization of a luminous bacterium and light intensity of luminous materials / N. Makiguchi, M. Arita, Y. Asai // *J. Ferment. Technol.* 1980. V. 58, № 1. P. 17–21.

12. Chun U.H. Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum* / U.H. Chun, N. Simonov, Y. Chen, M.L. Britzb

Ключевые слова:

токсикология,
биолюминесценция,
биосенсоры

// *Resour. Conserv. Recycl.* 1996. V. 18. P. 25–40.

13. Polyak B. Bioluminescent whole cell optical fiber sensor to genotoxicants: system optimization / B. Polyak, E. Bassis, A. Novodvoretz, S. Belkin, R.S. Marks // *Sens. Actuators, B.* 2001. V. 74, № 1–3. P. 18–26.

14. Lozinsky V.I. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments / V.I. Lozinsky, F.M. Plieva // *Enzyme Microb. Technol.* 1998. V. 23. P. 227–242.

15. Philp J.C. Whole cell immobilized biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste / J.C. Philp, S. Balmand, E. Hajto, M.J. Bailey, S. Wiles, A.S. Whiteley, A.K. Lilley, J. Hajto, S.A. Dunbar // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 487. P. 61–74.

16. Пат. 2394910 РФ / Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Куц В.В., Аленина К.А., Холстов А.В., Исмаилов А.Д. Люминесцентный биокатализатор для определения токсикантов. Заявлено 10.07.2008. Опубликовано 20.07.2010. Бюл. № 20.

17. Kuts V.V. Physiological and Emission Characteristics of the Luminescent Bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea / V.V. Kuts, A.D. Ismailov // *Microbiol.* 2009. V. 78, № 5. P. 554–558.



V.V. Kuts, K.A. Alenina, O.V. Sen'ko, E.N. Efremova, A.D. Ismailov

BIOLUMINESCENCE MONITORING OF ECOTOXICANTS

Toxin bioluminescence analysis with free photobacteria and ones immobilized in polyvinyl alcohol cryogel has been developed. As far as luminescent biosensors are very sensitive, high-performance, and

stable, their use in monitoring of heavy metals, aliphatic and aromatic xenobiotics and other toxic agents in wastewaters is very perspective. They are also of big importance in the process of biotransformation

and biodegradation in real-time mode.

Key words: toxicology, bioluminescence, biosensor