

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ АБИОТИЧЕСКИХ СРЕД И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Проведен сравнительный анализ использования биолюминесцентных тест-систем на основе природных и рекомбинантных светящихся бактерий, а также выделенных из них люциферазных систем при исследовании абиотических сред и биологических жидкостей. Продемонстрированы особенности реагирования биолюминесценции на воздействие сыворотки крови, мочи, желчи, слюны, спинномозговой и других биологических жидкостей, что является основой для развития нового направления использования биолюминесцентного анализа в биологии и медицине.

Изучение феномена бактериальной люминесценции в последние десятилетия стало одним из интенсивно разрабатываемых направлений в микробиологии [23, 27]. Проведенные исследования позволили достаточно полно охарактеризовать молекулярную организацию люминесцирующей системы [13] и ее генетический контроль [17, 20]. Значительный прогресс достигнут в понимании механизмов межклеточной коммуникации у бактерий в процессе развития люминесцентной реакции, приведший к открытию «эффекта кворума» [5, 19]. Пристальное внимание уделяется также изучению бактериальной люминесценции в естественных условиях обитания, что позволило оценить ее биологическую роль в двухкомпонентных (*Photobacterium* spp. или *Vibrio* spp. – глубоководные морские организмы) [1, 21] и трехкомпонентных (*Photorhabdus luminescens* – энтомопатогенные нематоды – насекомые) [18] симбиотических системах.

Не менее значимыми стали успехи в практическом использовании явления бактериальной люминесценции при проведении биотестирования загрязнения поверхностных водоемов, промышленных стоков и почв [14], а также определении степени токсичности вновь синтезируемых химических соединений и фармацевтических препаратов [24]. В основу данной группы методов была положена оценка изменения (преимущественно снижения) интенсивности биолюминесценции после воздействия анализируемого вещества. При этом важными особенностями люминесцентных тест-систем, выгодно отличающими их от прочих инструментов биоиндикации, являются быстродействие, точность и чувствительность к интегральному действию поллютантов.

Наиболее известными производимыми для этих целей люминесцентными тест-системами являются Microtox [15] и LUMISTox [28], созданные на основе живых лиофилизированных клеток *Vibrio fischeri*. Сконструированы и трансген-

ные микроорганизмы с клонированными генами люминесцентной системы различных природных светящихся бактерий, что позволило отказаться от необходимости добавления хлорида натрия в исследуемый раствор при использовании галофильных морских люминесцирующих микроорганизмов и еще больше упростило процедуру биотестирования.

В России подобные люминесцентные тест-системы на основе морских светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* («Микробиосенсор В17-677F») и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* Z905, несущего плазмиду с lux-опероном *Photobacterium leiognathi* («Микробиосенсор ЕСК») [6], с 90-х годов XX века производятся в Институте биофизики Сибирского отделения Российской Академии наук [7]. Выполняемые в этом же направлении в Московском государственном университете исследования завершились разработкой серии бактериальных тест-систем под общим названием «Эколюм», представленных не только природными и генноинженерными конструкциями с генами свечения морских светящихся бактерий, но и рекомбинантным штаммом *Escherichia coli*, несущим lux-оперон почвенной люминесцирующей бактерии *Photorhabdus luminescens* с более высоким температурным оптимумом люминесценции [10]. Нашли свое применение и бесклеточные тест-системы, содержащие комплексы высокоочищенных бактериальных ферментов (люциферазы, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы), один из которых – КРАБ (комплект реактивов для биолюминесцентного анализа) выпускается Институтом биофизики СО РАН.

Дальнейшее совершенствование биолюминесцентных тест-систем связано с конструированием оригинальных штаммов, позволяющих определять не только острую токсичность, но и генотоксичность [16] или другие биологические эффекты химических загрязнителей. Предпринимаются успешные попытки по созданию бак-

териальных биосенсоров, проявляющих специфичность реагирования на определенные группы экотоксикантов, в частности на тяжелые металлы [22], нафталин и салицилат [9], гербициды [25] и т. д.

В то же время следует указать, что клонирование различных lux-оперонов в микроорганизмах вида *Escherichia coli*, проявляющих свойства как комменсалов (в толстом кишечнике человека и млекопитающих), так и потенциальных патогенов (при переходе через эндозоологические барьеры), создало условия для формирования принципиально нового направления использования биолюминесцентного анализа в биологии и медицине – тестирования различных биологических жидкостей и биосред макроорганизма с акцентом на определение их противoinфекционной резистентности. В этой связи нами начата серия исследований, посвященных изучению особенностей реагирования бактериальной люминесценции на воздействие сыворотки крови, мочи, слюны, спинномозговой и других биологических жидкостей, а также сравнительному анализу использования биолюминесценции при тестировании абиотических и биологических сред [2, 3].

При проведении работы использованы природный изолят морской бактерии *Photobacterium phosphoreum* («Микробиосенсор В17-677F»), штамм почвенной люминесцирующей бактерии *Photorhabdus luminescens* Zm1, любезно предоставленный В.С. Даниловым и А.П. Зарубиной (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва), а также три рекомбинантных штамма *Escherichia coli*: Z905 (ИБСО РАН, Красноярск), «Эколюм-5» и «Эколюм-8» (МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва), в двух первых случаях несущие гены люминесцирующей системы *Photobacterium leiognathi* [6], а в последнем включающие lux-оперон *Photorhabdus luminescens* ZM1 [10]. В ряде экспериментов применялся ферментный препарат – «Комплект реактивов для биолюминесцентного анализа» (КРАБ), выпускаемый ИБСО РАН. В качестве регуляторов биолюминесценции использован пул сывороток здоровых доноров; моча здоровых лиц и больных с инфекциями органов мочевой системы; желчь от пациентов, прооперированных по поводу холецистита и онкопатологии; спинномозговая жидкость от больных с инфекциями центральной нервной системы и инсультами; слюна. Абиотические среды, исследованные с использованием биолюминесцентных тест-систем, были представлены

водой промышленного и хозяйственно-питьевого назначения, а также пробами из поверхностных водоемов, собранными в зоне Ириклинской ГРЭС (Оренбургская область). При проведении исследований люминесцирующие микроорганизмы в концентрации 10^9 КОЕ/мл в объеме 50 мкл смешивали с равными объемами исследуемых жидкостей, предварительно разведенных 0,85% раствором NaCl до концентраций от 100% до 10% от исходной с «шагом» в 10%. В качестве контроля использовали искусственную морскую воду (для *P. phosphoreum*) или 0,85% раствор NaCl (для *P. luminescens* и *E.coli*). При проведении исследований в температурном режиме +37° С все компоненты предварительно охлаждали // нагревали до соответствующей температуры. Смеси выдерживали в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут, после чего для остановки реакции в кюветы добавляли 10-кратный объем соответствующего солевого раствора и измеряли уровень люминесценции с использованием биолуцинометра «БЛМ-8820» (СКТБ «Наука», Красноярск). Результаты измерения выражали величинами биолюминесцентного индекса по формуле $БИ = (I_o / I_k) \cdot 100\%$, где I_o – интенсивность свечения бактерий в опытной кювете, I_k – интенсивность люминесценции бактерий в контрольной кювете.

Полученные результаты позволили констатировать как наличие некоторых общих тенденций формирования люминесцентного отклика при тестировании абиотических сред и биологических жидкостей (существование концентрационных, температурных и иных зависимостей), так и ряд существенных различий, касающихся особенностей реагирования отдельных биолюминесцентных тест-систем, направления изменения уровня свечения и др. (таблица).

При выполнении подобных исследований было подтверждено, что при исследовании абиотических сред различные микробные биосен-

Таблица 1. Особенности биолюминесценции при тестировании абиотических сред и биологических жидкостей

Сравниваемые параметры	Абиотические среды	Биологические жидкости
1. Изменение свечения при использовании различных природных и рекомбинантных люминесцирующих бактерий	Сходное	Имеет выраженные видовые и штаммовые особенности
2. Характер реагирования клеточных биосенсоров и выделенных из них ферментных люциферазных систем	Сходный	Различный
3. Механизм влияния анализируемого вещества на биолюминесценцию	Воздействие на метаболические пути бактериальной клетки	Воздействие на клеточную стенку бактериального биосенсора
4. Развитие бактерицидного эффекта в отношении бактериального биосенсора	Не типично	Типично

соры вне зависимости от того, относятся ли они к природным люминесцирующим микроорганизмам или представляют из себя трансгенные конструкции, имеют сходные зависимости изменения уровня свечения от концентрации исследуемого химического вещества // смеси веществ [4]. Не установлено достоверных отличий люминесцентного отклика и при сравнении рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих различные lux-опероны. При этом, несмотря на то, что чувствительность отдельных биосенсоров к некоторым химическим поллютантам может оцениваться как «более высокая» или «несколько менее выраженная», идентичность их реагирования при тестировании абиотических сред признается большинством исследователей [11]. В противоположность этому характер изменения биолюминесценции под воздействием биологических жидкостей (в частности, сыворотки крови) имеет достоверно выраженные штаммовые особенности, зависящие от видовой принадлежности микроорганизма-биосенсора [2], а в случае сравнения различных рекомбинантных штаммов *E. coli* – и от природы клонированной люминесцирующей системы.

Вторым существенным отличием является особенность реагирования клеточных биосенсоров и выделенных из них ферментных люциферазных систем. При этом вновь, за редким исключением [8], отмечается тождественность реакции названных люминесцентных биотестов при воздействии химических токсикантов или содержащих их абиотических сред. В отличие от этого при тестировании ряда биологических жидкостей (в первую очередь – сыворотки крови) изменения уровней люминесценции бактериальных клеток и бесклеточных систем не имели синхронного характера. Более того, на фоне однозначно ингибирующего воздействия сыворотки крови на уровень свечения бактериальных биосенсоров бесклеточные ферментные системы в ряде случаев способны отвечать на подобные воздействия стимуляцией люминесцентного отклика, интенсивность которого коррелирует с присутствием продуктов эндоинтоксикации [12].

Что лежит в основе столь различного поведения биолюминесценции при воздействии абиотических сред и биологических жидкостей? Совокупность накопленных по этому вопросу данных позволяет в качестве основной причины называть механизм влияния анализируемого вещества (смеси веществ) на люминесцентный био-

сенсор. При этом в случае тестирования химических токсикантов, присутствующих в абиотических средах, основным является воздействие на метаболические пути бактериальной клетки, обычно не сопровождающееся развитием бактерицидного эффекта. В противоположность этому ведущей причиной, вызывающей изменение уровня люминесценции бактериальных биосенсоров при тестировании биологических жидкостей, является воздействие присутствующих в них антибактериальных агентов на клеточную стенку микроорганизма, что результируется в формировании бактерицидного эффекта [26].

С этих позиций становится понятной природа различий в реагировании различных микробных биосенсоров, каковая определяется особенностями строения и антигенного состава бактериальной клеточной стенки, являющейся основной «мишенью» для действия сывороточных факторов. При этом обычно рекомбинантные штаммы *E. coli* по сравнению с природными изолятами люминесцирующих бактерий проявляют повышенную чувствительность к сыворотке крови [2], что делает их наиболее привлекательными объектами для тестирования подобных биологических жидкостей. Следует также подчеркнуть, что интенсивность тушения люминесценции *E. coli* Z905 и «Эколюм-5» достоверно коррелирует с развитием бактерицидного эффекта, а также величинами бактерицидной активности сыворотки (БАСК), определенной традиционным «нефелометрическим» методом [3]. С другой стороны, при сопоставлении влияния сыворотки крови на люминесценцию живых бактериальных клеток и выделенных из них люциферазных систем, корреляционная связь между регистрируемыми результатами отсутствует, что также определяется существованием описанных выше механизмов.

Принципиально важным является и тот факт, что многие физиологические жидкости (моча, желчь и др.), в норме не содержащие бактерицидных компонентов, оказывают на свечение бактериальных биосенсоров стимулирующее действие. Данная ситуация изменяется при развитии различных инфекционных состояний, сопровождающихся появлением в составе данных биологических жидкостей бактерицидных агентов сывороточного или лейкоцитарного происхождения, что вновь ведет к ингибции бактериальной люминесценции. В этом контексте использование биолюминесцентного анализа позволяет интегрально оценить присутствие

в составе биологических жидкостей компонентов бактерицидных систем и, таким образом, провести дифференциацию между инфекционными и неинфекционными патологическими состояниями.

В целом же вся совокупность полученных результатов является основой для формирования нового направления биолюминесцентного анализа в биологии и медицине, направленного на тестирование биологических жидкостей макро-

организма с акцентом на определение их противoinфекционной резистентности или наличия (активности) инфекционного процесса. Разработка совокупности данных методов в каждом конкретном случае потребует выбора оптимального люминесцирующего биосенсора, обоснования порядка и условий осуществления биолюминесцентного анализа, а также разработки критериев оценки его результатов, что является задачей наших дальнейших исследований.

Список использованной литературы:

1. Выдрякова Г.А., Кузнецов А.М., Примакова Г.А. и др. Люминесцентные бактерии – симбионты и комменсалы светящихся и несветящихся представителей морской фауны Индийского океана // Микробиология. – 1995. – Т. 64. – №5. – С. 692-695.
2. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г. Перспективы использования люминесцирующих бактерий для оценки бактерицидной активности биологических жидкостей макроорганизма / Матер. VIII съезда Всеросс. общ. микробиол., эпидемиол., паразитол. – М., 2002. – Т. 3. – С. 253.
3. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г., Русанов А.М. Технология оценки бактерицидной активности сыворотки крови с использованием природного и генноинженерного штаммов люминесцирующих бактерий / Матер. межд. научн. конф. «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий». – Саранск, 2001. – С. 178-179.
4. Ерошников Г.Е. Lux-оперон *Photorhabdus luminescens* ZM1 и его аналитическое применение. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Москва, 2003. – 24 с.
5. Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. «Quorum sensing» или как бактерии «разговаривают» друг с другом // Мол. биол. – 2001. – Т. 35. – №2. – с. 268-277.
6. Илларионов Б.А., Протопопова М.В. Клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi* // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 1987. – №8. – С. 41-46.
7. Каталог культур светящихся бактерий / Под ред. Э.К. Родичевой. – Новосибирск: Наука. Сиб. предприятие РАН. – 1997. – 125 с.
8. Кудряшова Н.С., Зюзикова Е.В., Гутник Т.В., Кузнецов А.М. Действие солей металлов на бактериальные биолюминесцентные системы различной сложности // Биофизика. – 1996. – Т. 41. – Вып. 6. – С. 1264-1269.
9. Лесняк Д.В., Попова Л.Ю. Конфликт: индукция-ингибирование люминесценции трансгенных бактерий в изучении экспрессии lux-генов // Биофизика. – 2002. – Т.47. – Вып.6, С. 1059-1063.
10. Манухов И.В., Завильгельский Г.Б., Данилов В.С. и др. Клонирование LuxAB-генов термостабильной люциферазы *Photorhabdus luminescens* ZM1 в *Escherichia coli* K12 // Биотехнология. – 1999. – №1. – С.40-43.
11. Марквичев Н.С., Мельниченко Е.Г., Бержанская Л.Ю. и др. Изучение кинетики роста и светопродукции генноинженерного штамма *Escherichia coli* (lum) // Биотехнология. – 1991. – №6. – С. 12-15.
12. Совцов С.А., Кратасюк В.А. Перспективы использования био- и хемилюминесцентных методов для характеристики хирургических эндотоксикозов / Препринт №161Б, Институт биофизики СО РАН. – Красноярск. – 1991. – 17с.
13. Baldwin T., Zeigler M., Raushel F. Structure, folding and mechanism of bacterial luciferase // *Bioluminescence and chemiluminescence. Perspective for the 21st Century*. – John Wiley & Sons, England, 1999. – P. 376-379.
14. Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2003. – V. 6. – №3. – P. 206-212.
15. Blaise C., Forghani R., Legault R. et al. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent // *Biotechniques*. – 1994. – V. 16. – №5. – P. 932-937.
16. Davidov Y., Rozen R., Smulski D. et al. Improved bacterial SOS promoter lux fusions for genotoxicity detection // *Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* – 2000. – V. 466. – №1. – P. 97-107.
17. Engebrecht J, Silverman M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1984. – V. 81. – P. 4154-4162.
18. Ffrench-Constant R., Waterfield N., Daborn P. et al. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2003. – V. 26. – №5. – P. 433-456.
19. Greenberg E.P. Quorum sensing in gram-negative bacteria // *ASM News*. – 1997. – V. 63. – P. 371-377.
20. Mancini J.A, Boylan M., Soly R.R. et al. Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique lux gene organization // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V. 263. – №28. – P. 14308-14322.
21. Nyholm S.V., Stabb E.V., Ruby E.G., McFall-Ngai M.J. Harvesting symbiotic vibrios: Imposing a magnet on the environmental haystack // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2000. – V. 97 // P. 10231-10294.
22. Ren S., Frymier P. The use of a genetically engineered *Pseudomonas* species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent // *Water Environ. Res.* – 2003. – V. 75. – №1. – P. 21-29.
23. Roda A., Guardigli M., Michelini E., et al. The possibility of detecting a few molecules using bioluminescence and chemiluminescence is exciting, especially in the context of miniaturized analytical devices. // *Anal. Chem.* – 2003. – P. 462-470.
24. Roda A., Guardigli M., Pasini P., Mirasoli M. Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – V. 377. – №5. – P. 826-859.
25. Shao C.Y., Howe C.J., Porter A.J., Glover L.A. Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68. – №10. – P. 5026-5033.
26. Virta M., Lineri S., Kankaanpää P. et al. Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64. – №2. – P. 515-519.
27. Węgrzyn G., Czyż A. How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology // *Oceanologia*. – 2002. – V. 44. – №3. P. 291-305.
28. Ziesenis K, Grabert E. A novel method for determining chronic toxicity with the LUMISTox luminescent bacteria test // *Bioluminescence and chemiluminescence: fundamental and applied aspects*. – 1994. – P. 76-78.