

КОРРЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА С УЧЕТОМ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИССЛЕДУЕМЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Разработан математический аппарат, направленный на коррекцию результатов биолюминесцентного анализа с учетом оптических свойств исследуемых проб. С его использованием создана специализированная программа для ЭВМ, предназначенная для количественной оценки биолюминесценции бактерий, находящихся в оптически слабо прозрачных (окрашенных и/или мутных) средах. Применение данной программы при оценке биотоксичности углеродных наноматериалов позволило устранить искажающее влияние оптических свойств исследуемых соединений на результаты проводимого анализа.

Ключевые слова: биолюминесценция, биолюминесцентный анализ, углеродные наноматериалы, коррекция измерений.

Биолюминесцентный анализ – один из перспективных методов исследования, в основе которого лежит использование природных или генно-инженерных люминесцирующих микроорганизмов, а также выделенных из них ферментных систем генерации свечения [1]. В системах *in vivo* тесная интегрированность биолюминесценции с основными энергетическими потоками бактериальной клетки позволяет интерпретировать происходящие изменения интенсивности свечения как проявление токсического или летального эффекта, развивающегося в результате воздействия исследуемых факторов на сенсорный микроорганизм [2]. В свою очередь возможность ингибирования биолюминесценции *in vitro* в результате химической модификации ферментов, разрушения интермедиатов реакции, действия через неспецифические акцепторы электронов и др. [3] положена в основу варианта т.н. «люциферазного биотестирования» (по названию ключевого фермента генерации свечения – бактериальной люциферазы). В целом быстрое действие, высокая чувствительность и точность методов биолюминесцентного анализа определили их высокую востребованность при исследовании химических соединений, природных сред и живых систем [4].

В связи с тем, что результативным параметром реакции биолюминесценции является аппаратно регистрируемое свечение, важным ограничением оказывается сложность анализа мутных или окрашенных образцов, оптические свойства которых способны оказать собственное искажающее воздействие на результаты исследования. Известная попытка решения обо-

значенной задачи связана с разработкой т.н. «теста вспышки» (англ. – flash test), основанного на кинетической регистрации интенсивности свечения сенсорного микроорганизма при его смешивании с анализируемой пробой [5]. При этом расчет соответствующих относительных величин проводится на основе сопоставления сигнала в первые секунды после внесения пробы (I_{peak} – соответствует исходной интенсивности свечения с учетом поглощения и рассеивания анализируемого образца) и его интенсивности на 30-й секунде инкубации (I_{30s} – отражает изменение интенсивности свечения при воздействии анализируемого образца). Для ряда токсикантов, в том числе органических загрязнителей, столь короткое время оказывается достаточным, чтобы оценить их присутствие в пробе [6]. В то же время для выявления биологического эффекта иных веществ и соединений требуются значительно более длительные периоды воздействия, что заставляет проводить дополнительные измерения на 15-й или 30-й минутах контакта и в целом снижает ценность предложенного подхода.

В полной мере сказанное относится к широкой группе углеродных наноматериалов (УНМ), чье повреждающее воздействие в отношении сенсорных микроорганизмов имеет выраженную зависимость от времени совместной инкубации и развивается в интервале от нескольких часов [7] до нескольких суток [8]. При этом планируемое расширение сферы применения биолюминесцентного анализа в направлении оценки биологической активности УНМ определяет актуальность и необходи-

мость устранения искажающего влияния их собственных оптических свойств на результаты проводимого исследования. В этой связи целью настоящей работы явилась разработка математического аппарата, позволяющего осуществлять коррекцию результатов биолюминесцентного анализа с учетом оптических свойств исследуемых углеродных наноматериалов, представленных аморфным углеродом, одно- и многостенными углеродными нанотрубками, а также C60- и C70-фуллеренами. Соответственно при достижении указанной цели были поставлены и последовательно решены задачи, связанные с (а) распределением источников свечения (люминесцирующих бактерий) в объеме анализируемой пробы; (б) различиями в спектральных характеристиках бактериального свечения и поглощающих свойств УНМ.

В основу разрабатываемого математического аппарата был положен закон Бугера - Ламберта - Бера, описывающий характер ослабления параллельного монохроматического пучка света при распространении его в поглощающей среде и формализующий его выражением вида:

$$I(L | \lambda) = I_0(\lambda) \exp[-\alpha(\lambda)L] \quad (1),$$

где $I_0(\lambda)$ – интенсивность входящего светового пучка; $I(L|\lambda)$ – интенсивность исходящего светового пучка, попадающего на оптический регистратор; L – толщина слоя вещества, через которое проходит свет, α – показатель, характеризующий поглощение света с определенной длиной волны (λ).

В то же время особенностью решаемой задачи является то, что излучаемый бактериями свет (аналог $I_0(\lambda)$ в формуле 1) возникает не вне, а внутри самой анализируемой пробы. В подобном случае каждый его источник (люминесцирующая бактериальная клетка) находится от обращенной к оптическому регистратору стороны кюветы на расстоянии x в диапазоне от 0 до L , что определяет существенные различия в поглощении излучаемого света при его прохождении через суспензию УНМ. Соответственно интенсивность сигнала люминесценции, поступающего на фотоприемник от тонкого слоя толщиной dx , расположенного на расстоянии x от удаленной грани кюветы, будет ослабевать в соответствии с зависимостью:

$$dI_x(\lambda) = I_0(\lambda) \exp[-\alpha(\lambda)(L-x)] dx / L \quad (2)$$

Одновременно возможным допущением является то, что все присутствующие в пробе люминесцирующие микроорганизмы относительно равномерно распределены по ее объему. В подобных условиях интегрирование выражения (2) позволяет выразить суммарную интенсивность достигающего фотоприемника светового сигнала на длине волны λ , возникающего по всему объему анализируемой пробы и частично поглощаемого находящимся в пробе анализируемым веществом, как:

$$I(L | \lambda) = I_0(\lambda) \int_0^L \exp[-\alpha(\lambda)(L-x)] dx / l = \\ = \frac{I_0(\lambda)}{\alpha(\lambda)L} [1 - \exp(-\alpha(\lambda)L)] \quad (3)$$

Для последующих преобразований вводим величину $D_i(\lambda)$, которая характеризует оптическую плотность среды, в которой развивается биолюминесценция, и может быть прямо количественно измерена в кювете толщиной l на соответствующей длине волны λ с использованием предназначенных для этого регистрирующих устройств. При этом считаем необходимым подчеркнуть возможность различных численных значений L – слоя, в котором развивается биолюминесценция, и l – слоя, в котором проводится измерение поглощения. В свою очередь, учитывая, что в наиболее общем виде $D_i(\lambda) = \alpha(\lambda)l$, при преобразовании выражения (3) получаем:

$$I(L | \lambda) = \frac{I_0(\lambda)}{D_i(\lambda)(L/l)} [1 - \exp(-D_i(\lambda)(L/l))] \quad (4)$$

Приведенная выше формула действительна для монохроматического излучения, т. е. света, испускаемого при определенной длине волны λ . В то же время биолюминесценция природных и рекомбинантных люминесцирующих бактерий характеризуется достаточно широким спектром, в отсутствие модулирующих его флуоресцентных белков, имеющим относительный максимум 485 ± 5 нм [9]. При этом подобный спектр в диапазоне от 400 до 600 нм (рисунок 1а) может быть выражен через ряд чисел $g(\lambda)$, в долях единицы характеризующих световую эмиссию, излучаемую на определенной длине волны λ относительно суммарной световой эмиссии, для которого верно выражение:

$$\sum_i g(\lambda_i) = 1 \quad (5)$$

Соответственно в отсутствие поглощения парциальная интенсивность свечения $I_0(\lambda)$, выраженная через подобный «нормированный» спектр люминесценции $g(\lambda_i)$, может быть представлена как:

$$I_0(\lambda) = kg(\lambda) \quad (6),$$

где множитель k не имеет размерности и характеризует мощность источника люминесцентного сигнала. Суммируя (6) по длинам волн, получаем интегральный по спектру сигнал свечения в отсутствие поглощения:

$$I_0 = \sum_{i=1}^n I_0(\lambda_i) = k \sum_{i=1}^n g(\lambda_i) = k \quad (7)$$

С другой стороны, следует указать, что спектры поглощения исследуемых углеродных наноматериалов, имеющие максимумы в ультрафиолетовой зоне спектра (рисунок 1б), в диапазоне длин волн бактериальной биолюминесценции также характеризуются неидентичными значениями $D_i(\lambda)$. Соответственно расчетная задача, основанная на выражении (4) и учитывающая как интегральный по спектру сигнал, так и вариабельность поглощения на определенных длинах волн, может быть записана в виде:

$$I(L) = \sum_{i=1}^n I(L|\lambda_i) = \sum_{i=1}^n \frac{I_0(\lambda_i)}{D_i(\lambda_i)(L/l)} [1 - \exp(-D_i(\lambda_i)(L/l))] \quad (8)$$

В свою очередь с учетом (7) получаем полную зависимость, описывающую природу модуляции интенсивности сигнала биолюминесценции $I(L)$, поступающего на оптический регистратор из анализируемой пробы:

$$I(L) = I_0 \sum_{i=1}^n \frac{g(\lambda_i)}{D_i(\lambda_i)(L/l)} [1 - \exp(-D_i(\lambda_i)(L/l))] \quad (9)$$

Переформируя же уравнение (9), приходим к формуле, позволяющей на основе определенных в эксперименте величин рассчитать истинный суммарный уровень биолюминесценции микроорганизмов I_0 с учетом частичного поглощения излучаемого света при его прохождении через анализируемую пробу:

$$I_0 = \frac{I(L)}{\sum_{i=1}^n \frac{g(\lambda_i)}{D_i(\lambda_i)(L/l)} [1 - \exp(-D_i(\lambda_i)(L/l))] } \quad (10),$$

где $I(L)$ – экспериментально определенная в исследуемом образце толщиной L интенсивность биолюминесценции; $g(\lambda_i)$ – предварительно установленная в эксперименте доля его

световой эмиссии сенсорного микроорганизма на длине волны λ_i от суммарной интенсивности его свечения в диапазоне 400–600 нм; $D_i(\lambda_i)$ – определенное в каждой точке диапазона 400–600 нм в кювете шириной l значение поглощения исследуемой суспензии УНМ на длине волны λ_i . При этом желательным условием является проведение необходимых измерений с использованием оптических регистраторов с идентичной спектральной чувствительностью или, что еще предпочтительнее, их осуществление на одной и той же платформе, предусматривающей последовательное выполнение люминометрических и спектрофотометрических измерений. В частности, подобным требованиям удовлетворяет использованный при выполнении настоящей работы спектрофлюориметр «Флюорат-02-Панорама» (НПФ «Люмэкс», СПб, Россия).

В связи с трудоемкостью подобных расчетов при одновременной необходимости исследования от десятков до сотен анализируемых проб для практической реализации разработанного подхода нами была создана специализированная программа для ЭВМ [10], предназначенная для количественной оценки биолюминесценции бактерий, находящихся в оптически слабо прозрачных (окрашенных и/или мутных) жидких средах.

Основным назначением программы является оценка результатов биолюминесцентного биотестирования, выполняемого с исполь-

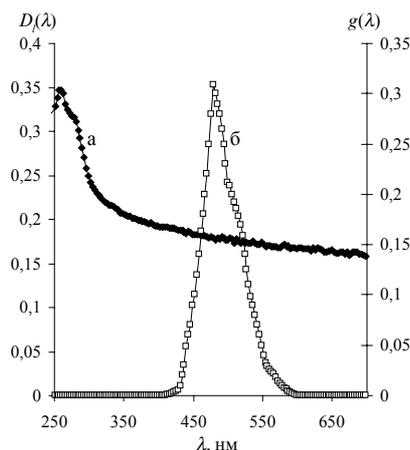


Рисунок 1. Спектры поглощения многостенных углеродных нанотрубок (а, ось ординат $D_i(\lambda)$) и биолюминесценции рекомбинантного штамма *E. coli* (б, ось ординат $g(\lambda)$). По оси абсцисс – длина волны (λ) поглощения или излучения соответственно. $l = 1$ см

зованием сенсорного рекомбинантного штамма *Escherichia coli* («Эколюм-9»), несущего *lux*-оперон природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* [11]. При этом программа использует заранее определенные для данного микроорганизма значения $g(\lambda,)$, характеризующие спектр его световой эмиссии. Одновременно налагаемые этим ограничения определяются невозможностью использования программы для оценки светимости биосенсоров с иными люминесцентными характеристиками.

В свою очередь разнообразие исследуемых углеродных наноматериалов и их использованных концентраций определило необходимость при проведении каждого конкретного расчета измерения оптических характеристик каждой отдельной анализируемой пробы с последующим экспортом полученных данных в соответствующий модуль программы. При этом важным требованием является проведение подобного измерения в диапазоне длин волн, соответствующем спектру световой эмиссии бактериального люминесцирующего биосенсора: от 400 до 600 нм с шагом 2 нм.

Помимо этого разработанная программа позволяет устанавливать значения L и l – толщины анализируемых проб, в которых проводится измерение биолюминесценции и поглощения и каковы могут быть не идентичны, варьируя от 1 см (стандартная кювета для спектрофотометра/люминометра) до десятых долей сантиметра (при проведении определений в ячейках 96-луночных планшетов).

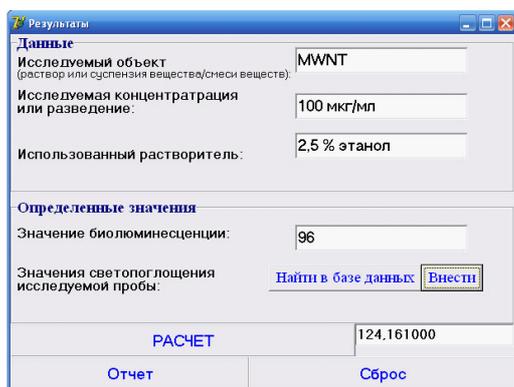


Рисунок 2. Окно программы для расчета истинной интенсивности свечения бактериального люминесцирующего биосенсора при его нахождении в суспензии тестируемого УНМ

Наконец ключевым вводимым значением является величина $I(L)$, соответствующая определенному в эксперименте значению биолюминесценции анализируемой пробы, содержащей исследуемый углеродный наноматериал и находящийся с ним в контакте сенсорный микроорганизм.

При соблюдении названных требований и ограничений нажатие клавиши «РАСЧЕТ» запускает вычисление искомой истинной интенсивности свечения микроорганизма, отражающей его функциональное состояние при подобном воздействии и представляемой в соответствующем окне программы (рисунок 2).

В качестве примера использования предложенного алгоритма действий на рисунке 3 приведены результаты оценки биотоксичности многостенных углеродных нанотрубок (ИПХФ РАН, Россия). Для повышения степени диспергированности данного углеродного наноматериала в соответствии с ранее разработанной процедурой [12] его навески в химически чистом этаноле интенсивно перемешивали пипетированием, после чего в течение 30 минут обрабатывали ультразвуком частотой 35 кГц в источнике ванного типа «Сапфир ТТЦ» (ЗАО ПКФ «Сапфир», Россия). На основе сформированной суспензии готовились двукратные водные разведения УНМ в диапазоне концентраций 0,78–100 мкг/мл, содержащие 2,5% исходного растворителя (этанола).

На первом этапе выполнения исследования светопоглощение каждой анализируемой пробы было оценено в диапазоне 400–600 нм, а полученные данные внесены в соответствующий модуль программы. На следующем этапе анализируемые пробы в объеме 0,9 мл помещались в измерительные кюветы, в которые вносилось по 0,1 мл предварительно восстановленного из лиофилизированного состояния бактериального биосенсора «Эколюм-9». После 60 минут инкубации кюветы помещались в измерительный блок, где проводилась аппаратная регистрация интенсивности свечения микроорганизма, а полученные значения также вносились в соответствующий модуль программы. Аналогичные измерения светимости осуществлены и в контрольных пробах в отсутствие тестируемой суспензии УНМ. Исходные и скорректированные с использованием программы значения светимости бактериального биосенсора использова-

ны для расчета индексов токсичности анализируемых проб, а также параметра ЕС50, отражающего концентрацию исследуемого вещества, вызывающего 50% тушение интенсивности свечения.

Как видно из данных, приведенных на рисунке 3, прямой учет значений светимости бактериального биосенсора при его контакте с многостенными углеродными нанотрубками мог приводить к заключению о наличии у названного образца УНМ токсических свойств, характеризующихся величиной $ЕС_{50} = 97$ мкг/мл. В то же время выполнение коррекционных процедур с учетом поглощающих свойств УНМ снимало подобную оценку, характеризуя многостенные углеродные нанотрубки в исследованном диапазоне концентраций как соединения с допустимым уровнем биотоксичности.

Таким образом, предложенный алгоритм коррекции результатов биолюминесцентного анализа, реализованный в виде программы для ЭВМ и использованный при оценке биотоксичности углеродных наноматериалов, позволил устранить искажающее влияние оптических свойств исследуемых соединений на результаты проводимого анализа. В более же общем виде основным результатом работы явилось обоснование нового подхода к прове-

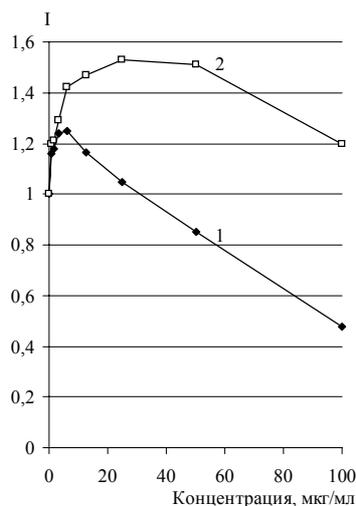


Рисунок 3. Величины биолюминесцентных индексов (I, отн. ед., по оси ординат), характеризующие изменение интенсивности свечения бактериального люминесцирующего биосенсора «Эколюм-9» при контакте с многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ). По оси абсцисс – концентрация МУНТ в суспензии, мкг/мл. Обозначения: 1 – при прямом использовании результатов эксперимента; 2 – после коррекции с учетом светопропускания исследуемых проб

дению биолюминесцентного биотестирования, предназначенного для исследования окрашенных или мутных растворов и суспензий.

Список использованной литературы:

1. Кудряшева Н.С., Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа. – Красноярск: КГУ, 2002. – 154 с.
2. Пшеничных Р.А., Масленникова И.Л., Никитина Н.М. Микробиолюминесценция (оптимизация сенсоров и расширение сферы использования реакции). – Пермь: Перм. гос. техн. ун-т., 2005. – 76 с.
3. Кратасюк, В.А. Люциферазное биотестирование: Биофиз. основы, методы и применение: Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.02. Красноярск, 1994.
4. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: Наука, 2009. – 246 с.
5. The BioTox™ flash test – an improved *Vibrio fischeri* test for rapid screening of water and sediment samples. – http://www.aboatox.com/environmental_analysis.html – 272 КБ.
6. Heinlaan M., Kahru A., Kasemets K., Kurvet I., Waterlot C., Sepp K., Dubourguier H.C., Douay F. Rapid screening for soil ecotoxicity with a battery of luminescent bacteria tests // *Altern. Lab. Anim.* – 2007. – Vol. 35. – №1. – P. 101-110.
7. Kang S., Herzberg M., Rodrigues D. F., Elimelech M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! // *Langmuir.* – 2008. – Vol. 24. – №13. – P. 6409-6413.
8. Zarubina A. P., Lukashov E. P., Deev L. I., Parkhomenko I. M., Rubina A. B. Biotesting the biological effects of single-wall carbon nanotubes using bioluminescent bacteria test-system // *Nanotechnologies in Russia.* – 2009. – Vol. 4. – №11-12. – P. 871-875.
9. Thouand G., Daniel P., Horry H., Picart P., Durand M.J., Killham K., Knox O.G.G., DuBow M.S., Rousseau M. Comparison of the spectral emission of *lux* recombinant and bioluminescent marine bacteria // *Luminescence.* – 2003. – Vol. 18. – №3. – P. 145-155.
10. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Болодурин И.П., Кучеренко М.Г., Никиян А.Н., Гончарова И.В., Фоломейкина С.В. Универсальная компьютерная программа «Определение интенсивности бактериальной биолюминесценции при исследовании окрашенных и мутных растворов» / Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ №2010611423 от 18.02.2010 г. – 608 КБ.
11. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьева Л.Н., Каташев Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе *lux*-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // *Вестник Московского Ун-та. Сер. 16: Биология.* – 2002. – №3. – С. 20-24.
12. Алешина Е.С., Дерябин Д.Г., Тлягулова А.С. Влияние растворителей на биотоксичность наночастиц углерода, выявляемую с использованием рекомбинантного люминесцирующего штамма *Escherichia coli* // *Вестник ОГУ.* – 2009. – №7 (101). – С. 421-426.

Сведения об авторе:

Алешина Елена Сергеевна, зав. лабораторией кафедры микробиологии
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук
460018, Оренбург, пр-т Победы, 13, тел. (3532)372481, e-mail: esaleshina@mail.ru

Болодурина Ирина Павловна, зав. кафедрой прикладной математики, Оренбургского
государственного университета, доктор технических наук, профессор, 460018, Оренбург, пр-т Победы,
13, тел. (3532)372536, e-mail: prmat@mail.osu.ru

Дерябин Дмитрий Геннадьевич, зав. кафедрой микробиологии Оренбургского государственного
университета, доктор медицинских наук, профессор, 460018, Оренбург, пр-т Победы, 13, тел.
(3532)372481, адрес электронной почты: dgderyabin@yandex.ru

Кучеренко Михаил Геннадьевич, зав. кафедрой радиофизики и электроники Оренбургского
государственного университета, доктор физико-математических наук, профессор, 460018, Оренбург,
пр-т Победы, 13, тел. (3532)372457, адрес электронной почты: prmat@mail.osu.ru

Aleshina E.S., Bolodurina I.P., Deryabin D.G., Kucherenko M.G.

Correction of results of bioluminescent analysis in view of optical properties of observed carbonic nanomaterials
A mathematical tool has been developed aiming at correction of results of bioluminescent analysis in view of
optical properties of the examined samples. With its assistance a specialized computer application was created
to quantitatively evaluate bioluminescence of bacteria existing in faintly clear (colored and/or blurred)
environment. Use of this application while evaluating biotoxicity of carbonic nanomaterials allowed eliminating
distorting effect of optical properties of observed compounds on the results of carried out analysis.

Key words: bioluminescence, bioluminescent analysis, carbonic nanomaterials, measurements correction.

Bibliography:

1. Kudryashova N.S., Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N. Physical and chemical bases of the bioluminescent analysis. – Krasnoyarsk, 2002. – 154 p.
2. Pshenichnov R.A., Maslennicova I.L., Nikitina N.M. microbioluminescence (optimization of sensors and expanding the field of application of reaction) – Perm, 2005. – 76 p.
3. Kratasyuk V.A. Luciferase biotesting: Biophysical bases, methods and application: Diss. ... doctor biological sciences: 03.00.02 Krasnoyarsk, 1994.
4. Deryabin D.G. Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects. – Moscow, 2009. – 246 p.
5. The BioTox™ flash test – an improved *Vibrio fischeri* test for rapid screening of water and sediment samples. – http://www.aboatox.com/environmental_analysis.html – 272КБ.
6. Heinlaan M., Kahru A., Kasemets K., Kurvet I., Waterlot C., Sepp K., Dubourguier H.C., Douay F. Rapid screening for soil ecotoxicity with a battery of luminescent bacteria tests // *Altern. Lab. Anim.* – 2007. – Vol. 35. – №1. – P. 101-110.
7. Kang S., Herzberg M., Rodrigues D. F., Elimelech M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! // *Langmuir.* – 2008. – Vol. 24. – №13. – P.6409-6413.
8. Zarubina A. P., Lukashov E. P., Deev L. I., Parkhomenko I. M., Rubin A. B. Biotesting the biological effects of single-wall carbon nanotubes using bioluminescent bacteria test-system. // *Nanotechnologies in Russia.* – 2009. – Vol. 4. – №11-12. – P. 871-875.
9. Thouand G., Daniel P., Horry H., Picart P., Durand M.J., Killham K., Knox O.G.G., DuBow M.S., Rousseau M. Comparison of the spectral emission of *lux* recombinant and bioluminescent marine bacteria // *Luminescence.* – 2003. – Vol. 18. – №3. – P. 145-155.
10. Deryabin D.G., Aleshina E.S., Bolodurina I.P., Kucherenko M.G., Nikian A.N., Goncharova I.V., Folomeikina S.V. The universal computer program «Definition of intensity of a bacterial bioluminescence at research of the painted and muddy solutions» // State Certificate computer program registration №2010611423 from 18.02.2010 г. – 608 KB.
11. Danilov V.S., Zarubina A.P., Eroshnicov G.E., Solov'eva L.N., Kartashev F.V., Zavit'gelsky G.B. The bioluminescent sensor systems with *lux*-operons from various species of luminescent bacteria. // *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* – 2002. – №3. – P. 20-24.
12. Aleshina E.S., Deryabin D.G., Tlyagulova A.S. Influence of solvents on biotoxicity nanocarbon, revealed with use recombinant luminescent strain *Escherichia coli* // *Vestnik OSU.* – 2009. – №7 (101). – P. 421-426.