

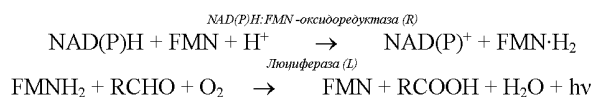
## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ И ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА

Представлены новые результаты, касающиеся создания высокочувствительного экспрессного биолюминесцентного метода анализа токсичности природных и сточных вод, основанного на применении многокомпонентного иммобилизованного реагента. Проведен анализ чувствительности иммобилизованного биолюминесцентного реагента к образцам воздуха разной загрязненности.

**Ключевые слова:** экологический мониторинг, биолюминесценция, биферментная система светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, иммобилизация, токсичность природных вод, загрязнение воздуха.

Современный подход, широко используемый в экологическом мониторинге, опирается на методы, требующие специализированных лабораторий с высококвалифицированным персоналом и дорогостоящим оборудованием. Для этих целей используются химический анализ и биотестирование. Биотесты показывают токсичность среды по реакции живых организмов [1], однако использование живых организмов делает биотесты длительными и сложными из-за необходимости поддерживать постоянство характеристик живых культур и организмов.

Замена в биотестах живых организмов на ферментативные препараты позволяет преодолеть нестабильность и получить надежные результаты. Так, к существенному улучшению характеристик биолюминесцентного теста привело использование в качестве тест-объекта ферментов светящихся бактерий [2]. Основной принцип ферментативного биотестирования – обнаружение токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на параметры биолюминесценции биферментной системы, одним из продуктов которых является излучение света в сине-зеленой области спектра:



Растворимые (лиофилизированные) препараты ферментов – люцифераза (L) и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза ® проявляют высокую чувствительность к действию токсических веществ, а метод анализа токсичности среды с использованием ферментов отличается экспрессностью [3]. Однако по сравнению с биотестом на светящихся бактериях анализ стал более сложным. При проведении тестирования в про-

цессе одиночного измерения необходимо смешивать более пяти компонентов в определенных концентрациях и пропорциях. Кроме того, растворы ферментов быстро инактивировались, поэтому требовалось их хранение при температуре 4–8 °С, что затрудняло проведение анализов в полевых условиях. Этим недостатком не имеет реагент «Энзимоллом», содержащий совместно иммобилизованные в крахмальный носитель NADH:FMN-оксидоредуктазу, люциферазу и их субстраты [4]. Применение иммобилизованного реагента позволяет существенно сократить время, необходимое для проведения анализа. Действительно, в состав реагента включены все необходимые для анализа компоненты – ферменты и их субстраты, активность реагента сохраняется в течение длительного времени без обеспечения специальных условий хранения, реагент характеризуется устойчивостью к изменениям физико-химических факторов среды, в том числе pH, ионной силы, температуры [5]. Использование реагента «Энзимоллом» должно привести к улучшению характеристик ферментативного биолюминесцентного анализа, а именно увеличению точности анализа и упрощению процедуры измерения.

Целью работы является создание высокочувствительного экспрессного биолюминесцентного метода анализа токсичности природных и сточных вод, основанного на применении многокомпонентного иммобилизованного реагента «Энзимоллом», а также анализ чувствительности иммобилизованного биолюминесцентного реагента к образцам воздуха разной загрязненности.

### Методика

В работе использовали лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов, про-

изведенные в лаборатории нанобиотехнологии и бактериальной биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон лиофилизованного препарата КРАБ (комплект реактивов аналитической биолюминесценции) содержал 0,5 мг люциферазы (L) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и 0.18 ед. активности NADH:FMN-оксидоредуктазы (R) ЕС 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*). В работе использовали следующие реактивы: NADH, NAD<sup>+</sup>, FMN («Serva», Германия), тетрадеканаль («Merck», Германия); картофельный крахмал, гидрохинон, монофенол, пирокатехин, бензохинон, нафтохинон («Sigma», США), тимохинон («Aldrich», Германия), толухинон («Fluka», Германия); соли металлов (CuSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>2</sub>) марки ЧДА. Образцы исследуемых соединений растворяли в дистиллированной воде. Слаборастворимые в воде вещества предварительно разводили в этаноле. Для приготовления растворов ферментов и субстратов использовали 0.05 М калий-фосфатный буфер pH 6.8.

Процедура получения иммобилизованного многокомпонентного реагента «Энзимоллом» заключалась в следующем [4], [5]: суспензию крахмала нагревали до полного растворения, охлаждали до температуры 25 °С, последовательно вносили ферменты – люциферазу, NADH:FMN-оксидоредуктазу, а так же их субстраты – NADH и тетрадеканаль, интенсивно перемешивали. Далее, с использованием автоматической станции пробоподготовки («Erpendorf», Германия) дозировали полученную смесь и высушивали при 40 °С. Многокомпонентный иммобилизованный реагент «Энзимоллом» представляет собой высушенный диск диаметром 6 мм, сухой вес 1,5±0,2 мг.

При тестировании в качестве контроля измеряли максимум интенсивности свечения I<sub>к</sub> реагента «Энзимоллом» при добавлении к нему

300 мкл дистиллированной воды и 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN. Затем в отдельной кювете измеряли максимум интенсивности свечения I<sub>о</sub> в присутствии 300 мкл анализируемого образца. При биотестировании с использованием растворимых ферментов реакционная смесь для измерения I<sub>к</sub> содержала 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 6,8; 5 мкл раствора КРАБ; 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканалья; 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN; 100 мкл 0,4 мМ раствора NADH. После достижения I<sub>к</sub> в кювету добавляли 50 мкл анализируемого образца воды или раствора анализируемого вещества заданной концентрации и измеряли I<sub>о</sub>.

Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения (I<sub>о</sub>/I<sub>к</sub>)·100%. При проведении анализов токсичности сточных и очищенных вод ООО «Енисейский целлюлозно-бумажный комбинат» г. Красноярск рассчитывали коэффициент токсичности (КТ) образцов воды по формуле: КТ = [(I<sub>к</sub> – I<sub>о</sub>)/I<sub>к</sub>] × 100%. Исследуемые образцы сточных вод поступали из цеха очистки промышленных стоков ООО «Енисейский ЦБК». Характеристики образцов, любезно предоставленные сотрудниками химической лаборатории комбината, представлены в таблице 1, где проба №1 – поступающая в цех сточная вода, проба №2 – сточная вода после механической очистки, проба №3 – очищенная вода на выходе из очистных сооружений.

Критерием токсичности воды было снижение на 20 % и более максимальной интенсивности свечения реагента «Энзимоллом» при добавлении анализируемого образца воды, по сравнению с интенсивностью свечения в контрольной пробе. Качество воды устанавливали на основе ее токсикологических характеристик через величину биологически безопасного разбавления согласно таблице 2.

Таблица 1. Результаты химического анализа сточной и очищенной воды лаборатории цеха очистки промышленных стоков ООО «Енисейский Целлюлозно-бумажный комбинат»

№	Определяемый компонент	Ед. изм	Результат измерений		
			Проба №1	Проба №2	Проба №3
1	pH	ед. pH	6,5	6,2	3,3
2	ХПК	мг/дм <sup>3</sup>	3000	2200	2000
3	Взвешенные вещества	мг/дм <sup>3</sup>	300	74	51
4	Аммоний ион	мг/дм <sup>3</sup>	66	53	48
5	Нитриты	мг/дм <sup>3</sup>	<0,02	<0,02	<0,02
6	Нитраты	мг/дм <sup>3</sup>	6,2	0,1	0,1

Пробы воздуха для анализа чувствительности растворимого и иммобилизованного биолюминесцентного реагента «Энзимоллом» к образцам воздуха разной степени загрязнения были предоставлены Лабораторией хроматографических методов анализа ЦКП СФУ. Отбор проб осуществляли на открытом воздухе в чистом (проба 1, Академгородок) и загрязненном (проба 2, Крас ТЭЦ) районах г. Красноярска. Абсорбцию органических загрязнений воздуха в воду осуществляли с помощью стандартного аспираторного устройства марки АПВ-4-12В-40 со скоростью 1,0 л/мин. Химический состав полученных растворов был проанализирован в той же лаборатории на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890А. Чувствительность биотеста оценивали по количеству разведений воздушных проб, абсорбированных водой, необходимому для того, чтобы максимальное значение биолюминесценции отличалось не более чем на 20% от контрольного. Сравнение двух типов биолюминесцентных биотестов проводили также по таким характеристикам как простота использования, время анализа одной пробы, чувствительность, условия хранения без потери активности.

Измерения проводили на биолюминометре Lumat LB 9507 фирмы «Berthold Technologies» (Германия). Измерения каждой экспериментальной точки проводили не менее чем в пяти параллельных измерениях.

### Результаты и их обсуждение

В качестве модельных поллютантов выбраны ряды фенолов, хинонов и солей тяжелых металлов, так как среди сточных вод промышленных предприятий они занимают одно из первых мест по распространенности и вредному воздействию на водоемы и их обитателей. Ранее было показано, что в присутствии фенолов, хинонов и солей металлов изменяются такие параметры реакции биолюминесценции, катализируемой биферментной системой L+R, как интенсивность свечения и время выхода свечения на максимум и предложены механизмы такого влияния [6], [7]. Так как чувствительности биолюминесцентной биферментной системы L+R недостаточно для тестирования фенолов и хинонов на уровне ПДК [6], необходимо было найти пути увеличения чувствительности анализа. В отличие от тестов на живых организмах это можно было сделать путем варьирования условий проведения тестиро-

Таблица 2. Соответствие кратности разбавления тестируемой пробы воды и токсикологических характеристик качества тестируемой воды

№	Кратность разбавления тестируемой пробы воды	Токсикологические характеристики качества тестируемой воды
1	1	Нетоксичная
2	2	слаботоксичная
3	от 3 до 10	токсичная
4	от 11 до 50	сильнотоксичная
5	> 50	гипертоксичная

вания. В работе были исследованы следующие способы увеличения чувствительности реагента «Энзимоллом» к действию поллютантов: варьирование состава иммобилизованного реагента, изменение соотношения объемов реакционной смеси и анализируемого образца, изменение порядка добавления компонентов биферментной системы и анализируемого образца, введение дополнительной процедуры инкубации реагента в анализируемом образце воды, выбор контрольного раствора для проведения биотестирования.

Была исследована зависимость чувствительности NADH:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы, иммобилизованных в крахмальный гель совместно с субстратами NADH и тетрадеканалем, к действию бензохинона и  $\text{CuSO}_4$  в зависимости от концентраций компонентов, входящих в состав иммобилизованного реагента. Показано, что уменьшение содержания какого-либо из компонентов приводит к повышению чувствительности реагента «Энзимоллом» к действию токсических веществ. Этот эффект можно объяснить тем, что для биферментной системы созданы нестационарные условия благодаря содержанию в составе реагента ненасыщающей концентрации одного из субстратов (NADH). Действительно, максимальная чувствительность биферментной системы к действию бензохинона и  $\text{CuSO}_4$  наблюдается в том случае, когда содержание NADH в диске составляло 0,1 мМ, т. е. при концентрации NADH в 1,3 раза ниже концентрации, соответствующей константе Михаэлиса для этого субстрата [5].

Для предотвращения инактивации ферментов, сохранения их активности при использовании и хранении в состав реагента «Энзимоллом» вводили стабилизаторы ферментов различного механизма действия – стабилизаторы SH-групп ферментов (ДТТ или меркаптоэтанол) и бычий

сывороточный альбумин (БСА). Внесение в состав иммобилизованного реагента добавок, стабилизирующих ферменты, приводит к увеличению активности биферментной системы L+R, повышению стабильности иммобилизованных ферментов при хранении, но снижает чувствительность реагента к токсическим веществам.

Было показано, что дополнительная инкубация реагента в анализируемом растворе приводит к увеличению чувствительности иммобилизованного реагента к сульфату меди, при этом чувствительность к бензохинону не изменяется. Инкубацию многокомпонентного реагента с контрольным или анализируемым раствором загрязняющего вещества проводили в течение 30–900 с, затем запускали реакцию раствором FMN и измеряли  $I_k$  и  $I_0$  соответственно. Ингибирование ферментов раствором сульфата меди возрастало с увеличением времени инкубирования и максимально при инкубации реагента в течение 300 с. Дальнейшее увеличение времени инкубации невозможно, так как существенно снижается активность иммобилизованного реагента даже при инкубировании с контрольным раствором. Таким образом, были найдены условия биотестирования водных растворов с использованием реагента «Энзимолум», обеспечивающие максимальную чувствительность реагента к действию токсических веществ.

Для сравнения чувствительности растворимой и многокомпонентной иммобилизованной биферментной системы L+R к действию модельных токсикантов эффективность воздействия

поллютантов на биолюминесцентную систему оценивали по параметру  $EC_{50}$ , который соответствует концентрации действующего вещества при ингибировании биолюминесценции на 50%. Значения  $EC_{50}$  были определены для различных классов органических поллютантов (табл. 3). Степень влияния исследуемых веществ на интенсивность свечения растворимой и иммобилизованной биферментной системы L+R на всем исследуемом диапазоне концентраций различалась. Наибольшую чувствительность к действию фенолов и хинонов показали иммобилизованные ферменты: 0,002 мг/л для пирокатехина, 0,02 мг/л для гидрохинона, 0,01 мг/л для бензохинона, 0,05 мг/л для толухинона, что соответствует или ниже ПДК. Наименьшая чувствительность реагента отмечена для солей тяжелых металлов (за исключением  $CuSO_4$ ). Из таблицы 3 видно, что чувствительность растворимой биферментной системы L+R к исследуемым загрязнителям выше по сравнению с иммобилизованным реагентом. Но, так как практически для всех изученных веществ, иммобилизованный реагент позволяет проводить измерения на уровне или даже ниже ПДК, то иммобилизованный реагент может быть использован при биотестировании природных и сточных вод.

Методика проведения биотестирования с использованием иммобилизованного реагента «Энзимолум» была апробирована при анализе сточных вод ООО «Енисейский целлюлозно-бумажный комбинат» г. Красноярск. Исследуемые образцы воды различались по основным

Таблица 3. Действие рядов поллютантов на растворимую и иммобилизованную совместно с субстратами биферментную систему NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза

Класс вещества	Действующее вещество	ПДК, мг/л	$EC_{50}$ , мг/л	
			Растворимые L+R	«Энзимолум»
Хиноны	Бензохинон	0,1	0,05	0,01
	Нафтохинон	0,25	0,003	0,003
	Тимохинон		0,005	0,03
	Толухинон		0,01	0,05
Фенолы	Гидрохинон	0,2	0,03	0,02
	Монофенол	0,001	1128	1410
	Пирокатехин	0,1	2,2	0,002
Соли	$CuSO_4$	1	0,2	0,002
	$CdSO_4$	0,001	310	0,08
	$CoCl_2$	0,1	40	0,1
	$CrCl_2$	0,05	500	2,1

физико-химическим показателям (см. табл. 1). Проводили исследование показаний биотестирования при использовании для приготовления разведений анализируемого образца дистиллированной воды или фосфатного буфера. Согласно результатам биотестирования пробы №1 и 2 были признаны гипертоксичными, проба №3 – токсичной. Также показано, что токсичность проб уменьшается в ряду проба 1 > проба 2 > проба 3, что соответствует изменению химических характеристик анализируемых проб. Этот эксперимент подтвердил целесообразность и эффективность использования в биотестах иммобилизованного реагента вместо растворимой биферментной системы L+R.

Анализ чувствительности растворимого и иммобилизованного биолюминесцентного реагента к образцам воздуха разной загрязненности показал, что полученное количество разведений проб 1 и 2, абсорбированных водой, составляет для растворимой системы – 3 и 2000 раз, соответственно, а для иммобилизованной – 1 и 16000 раз соответственно. Разница между разведениями пробы 2 для растворимого и им-

мобилизованного тест-объекта, возможно, объясняется ограничениями по добавляемому объему, так как в растворимый тест-объект вносили пробы в количестве 4,5% от общего объема, в иммобилизованный – 97%.

Для анализа чувствительности иммобилизованного биолюминесцентного реагента к образцам воздуха разной загрязненности для определения состава загрязнений были проанализированы коэффициенты корреляции (табл. 4) остаточного свечения с тремя наборами данных:

- содержание органических загрязнителей в 6-ти пробах, абсорбированных в этаноле и воде (независимые переменные – концентрации циклогексанона, циклогексанола, фенола, уксусной и пропионовой кислот);
- содержание катионов в 17-ти водных пробах (независимые переменные – концентрации кальция, кобальта хрома, железа, калия, магния, марганца, натрия, стронция и цинка);
- содержание анионов в 17-ти водных пробах (независимые переменные – концентрации  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ).

Таблица 4. Результаты корреляционного анализа (наиболее значимые корреляции)

№	Зависимая переменная (остаточное свечение)	Самая высокая корреляция			Параметры линейной регрессии		
		N*	Коэффициент коррелиции	Независимая переменная (соединение/среда)	R <sup>2</sup>	A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> *	P*
1	Растворимая система	6	-0,65	фенол / вода	0,42	87,2±11,1 -2,3±1,3	0,0014 0,162
		6	0,9	циклогексанон / этанол	0,82	77±3,1 43,1±10,1	0,00005 0,013
		17	-0,67	магний / вода	0,44	95,2±3,0 -0,13±0,04	3,5·10 <sup>-15</sup> 0,0036
		17	-0,56	Cl <sup>-</sup> / вода	-	-	-
2	Иммобилизованный реагент	6	-0,92	фенол / вода	0,84	98,7±5,4 3,06±0,66	0,00005 0,00971
		6	-0,47	фенол / этанол	-	-	-
		17	-0,33	магний / вода	-	-	-
		17	-0,33	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> / вода	-	-	-

\*N – количество наблюдений (проб), A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> – коэффициенты линейной регрессии (свободный член и тангенс угла наклона), P – уровень значимости

Из полученных данных (табл.4) следует, что действующими на сигнал эффекторами могут быть фенол и ионы магния. Высокий коэффициент корреляции между остаточным свечением растворимой системы и концентрацией циклогексанона в этаноле (0,9) и качественная линейная регрессия свидетельствуют стимуляции свечения биферментной системы. Тушение тест-реакции фенолом лучше всего описывается линейной регрессией для иммобилизованного реагента: это единственная корреляция, которую удалось установить для данной системы. Интересным фактом является также положительная корреляция свечения бактерий и концентрации фенола в этаноле. Показано, что чувствительность иммобилизованного тест-объектов к воздушным загрязнениям, абсорбированным в воде, превышает чувствительность растворимого тест-объекта в 8 раз. Выявлены преимущества использования иммобилизованного реагента при биотестировании: экспрессность (время анализа до 7 минут), простота, высокая чувствительность (анализ разведений образца на уровне

1/16000), возможность увеличения объема анализируемой пробы до 97% общего объема по сравнению с растворимым. Отсутствие корреляций тест-реакции биолумinesцентного биотеста с индивидуальными концентрациями загрязнителей указывает на эффективность определения токсичности среды путем интегрального биотеста при невозможности использования химического анализа для этих целей.

Таким образом, разработан биолумinesцентный метод для экспресс-контроля состояния окружающей среды промышленных районов. Метод может также использоваться для контроля залповых вредных выбросов предприятий, для оценки эффективности работы очистных сооружений, а также для оценки экологической опасности предприятий и отдельных районов. Метод пригоден для использования, как в лабораторных, так и в полевых условиях. Применение иммобилизованных препаратов, включающих помимо ферментов также субстраты биферментной системы, позволяет максимально упростить процедуру проведения анализов.

22.08.2013

**Работа выполнена при поддержке мега-проекта «Биолумinesцентные биотехнологии» (договор №11.Г34.31.0058) в рамках Постановления Правительства РФ №220 от 9 апреля 2010 г. «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования», Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.А18.21.1911**

#### Список литературы:

1. Gonzalez, C., Greenwood, R., & Quevauviller, P. (Eds.). (2009) Rapid chemical and biological techniques for water monitoring. Chichester: Wiley.
2. Kratasyuk, V.A., Esimbekova E.N., Gladyshev M.I., Khromichuk E.B., Kuznetsov A.M., Ivanova E.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems // Chemosphere, 2001. V.42, N 8. P. 909-915.
3. Vetrova E., Esimbekova E., Rimmel N., Kotova S., Beloskov N., Kratasyuk V., Gitelson I. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water // Luminescence, 2007. V.22, N 3. P. 206 – 214.
4. Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н. Способ получения иммобилизованного многокомпонентного реагента для биолумinesцентного анализа. Патент РФ. 2005. №2252963.
5. Есимбекова Е.Н., Торгашина И.Г., Кратасюк В.А. Сравнение иммобилизованной и растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза // Биохимия, 2009. Т. 74, Вып. 6. С. 853-859.
6. Кудряшева Н.С., Шалаева Е.В., Задорожная Е.Н., Кратасюк В.А., Стом Д.И., Балаян А.Э. Закономерности ингибирования бактериальной биолумinesценции in vitro хинонами и фенолами – компонентами сточных вод // Биофизика, 1994. Т. 39, N 3. С. 455-464.
7. Deryabin, D. G., & Aleshina, E. S. (2008). Effect of salts on luminescence of natural and recombinant luminescent bacterial biosensors. Applied Biochemistry and Microbiology (Moscow), 44(3), 292–296.

**UDC 543.94, 577.151.03**

**Esimbekova E.N.<sup>2,1</sup>, Rimatskaya N.V.<sup>1</sup>, Sukovataya I.E.<sup>1</sup>, Kratasyuk V.A.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Siberian Federal University; <sup>2</sup>Institute of Biophysics SB RAS, e-mail: VKratasyuk@gmail.com

#### **BIOLUMINESCENT RAPID METHOD FOR ESTIMATION OF INTEGRAL WATER TOXICITY AND AIR POLLUTION**

The bioluminescent rapid method was developed to estimate the integral toxicity of natural and wastewater. Sensitivity analysis of immobilized bioluminescent reagent to samples with different air pollution carried out.

Key words: Ecological monitoring. Bioluminescence. The coupled enzyme system of bioluminescence bacteria NAD(P)H:FMN-oxidoreductase–luciferase, Immobilization, Integral water toxicity, Air pollution.