

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В. А. Кратасюк
подпись инициалы, фамилия
«__» _____ 2017г

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Биолюминесцентные платформенные технологии для мониторинга

загрязнения воздуха

06.04.01 Биология

06.04.01.03 Биофизика (сетевая)

Руководитель _____ асс. каф.биофизики, к.б.н. И.Г.Торгашина
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ А.И.Юнусова
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент _____ доц., к.б.н. Т.В.Рожко
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
Глава 1 Обзор литературы	4
1.1. Антропогенное загрязнение атмосферного воздуха в городах и методы оценки уровня загрязнения атмосферного воздуха в России и за рубежом	4
1.1.1 Контактные методы экологического контроля.....	5
1.1.2. Дистанционные методы экологического контроля.....	9
1.1.3. Биологические методы экологического контроля.....	11
1.2. Билюминесцентный метод оценки качества воздуха.....	15
1.2.1. Светящиеся бактерии в роли биотестов.	15
1.2.2. Биотесты на основе использования ферментативных реакций светящихся бактерий.	19
1.2.3. Воздействие химических соединений на билюминесцентные тест-объекты	21
Глава 2 Материалы и методы	Ошибка! Закладка не определена.
2.1. Пробообработка	Ошибка! Закладка не определена.
2.2. Реактивы и материалы	Ошибка! Закладка не определена.
2.3. Методика определения активности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза	Ошибка! Закладка не определена.
Глава 3 Результаты исследований	Ошибка! Закладка не определена.
3.1. Влияние проб воздуха, отобранных с помощью сорбционных трубок, на активность биферментной системы светящихся бактерий .	Ошибка! Закладка не определена.
3.2. Влияние проб воздуха, отобранных с помощью медицинских шприцов, на активность биферментной системы светящихся бактерий .	Ошибка! Закладка не определена.
3.3. Влияние проб воздуха, отобранных с помощью аспиратора и сосудов Рихтера на активность биферментной системы светящихся бактерий	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	24

Глава 1 Обзор литературы

1.1. Антропогенное загрязнение атмосферного воздуха в городах и методы оценки уровня загрязнения атмосферного воздуха в России и за рубежом

Воздух на сегодняшний день представляет собой ведущий объект окружающей среды, с которым связано наибольшая часть всех негативных воздействий окружающей среды на здоровье (Голиков, 2015, Branco et al., 2014, Rich, 2017, Davalos et al., 2017).

Согласно экспертам из Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) около 72 % случаев преждевременной смерти связаны с загрязнением атмосферного воздуха. Около 70% это ишемические болезни сердца и инсульты, 14 % - хронические болезни легких и острые инфекции нижних дыхательных путей и другие респираторные заболевания, 14 % - рак легких (Соколов, 2015).

Загрязнения атмосферного воздуха, по данным ВОЗ в 2012 году, является канцерогенными для человека, а наличие твердых частиц в воздухе тесно связано с повышением заболеваемости раком легких. Также наблюдается связь между загрязнением атмосферного воздуха и заболеваемостью раком мочевыводящих путей и мочевого пузыря. (Информационный бюллетень ВОЗ, 2016).

Степень загрязнения атмосферы зависит от количества выбросов вредных веществ и их химического состава, от метеорологических условий, определяющие перенос, рассеивание выбрасываемых веществ и от высоты, на которой осуществляется выбросы.

Наблюдения за загрязнением атмосферы, проводимые как составная часть государственного мониторинга атмосферного воздуха, осуществляются органами Росгидромета, совместно с органами Роспотребнадзора и другими ведомствами, при участии органов федеральной власти и местного самоуправления субъектов Российской Федерации.

Для того чтобы получить объективную информацию о состоянии и об уровне загрязнения окружающей среды необходимо иметь в своем арсенале надежные средства и методы экологического контроля, которые делят на: контактные, бесконтактные (дистанционные) и биологические, а показатели – на функциональные и структурные (Якунина и др., 2009, Вартанов и др., 2009).

Наиболее информативными являются структурные контрольные показатели, так как они дают непосредственную информацию об объекте окружающей среды, которая была подвергнута загрязнению, а также всю необходимую информацию о загрязнителях (концентрация загрязняющего вещества, различные коэффициенты загрязнения, уровень и степень загрязнения и т.д.) (Якунина и др., 2009, Вартанов и др., 2009).

1.1.1 Контактные методы экологического контроля

К этому виду относят все виды химического, физико-химического и физического методов анализа. К химическим методам относят: гравиметрический и титриметрический; к физическим: магнитную спектроскопию, масс-спектрометрию, рентгено-спектральный анализ; к физико-химическим: спектральные, электрохимические, хроматографические (Якунина и др., 2009, Вартанов и др., 2009).

Наиболее часто используемые методы это спектральный, хроматографический, электрохимический (Якунина и др., 2009, Вартанов и др., 2009). Все методы включают в себя пробообработку, проведение анализа, сбор, обработку и интерпретацию результатов.

Пробообработка

Пробообработка включает в себя: отбор проб, обработка проб с их дальнейшей консервацией и транспортировкой, хранение проб, подготовка к анализу. Для того чтобы результаты были максимально правильными необходимо выбрать оптимальный метод отбора проб, также важно место отбора проб и чистота пробоотборников и тары для ее хранения. Подготовка

проб в основном идет методом концентрирования, также существует метод химической модификации исследуемого вещества. Концентрирование идет двумя путями: сорбция на твердых поверхностях или экстракция растворителем и методом уменьшения объема пробы (путем выпаривания, вымораживания или соосаждения) (Якунина и др., 2009, Вартанов и др., 2009).

Способы отбора проб воздуха преимущества и недостатки

Отбор проб воздуха осуществляется согласно РД 52.04.186-89 на специальных постах (стационарные, маршрутные, передвижные (подфакельные)). На стационарных постах осуществляется регулярный отбор проб воздуха и предназначен для непрерывной регистрации содержания загрязняющих веществ в атмосфере. Маршрутные посты предназначены также для регулярного отбора проб, если нет возможности установить стационарные посты в тех или иных точках местности или в случае извлечения проб воздуха в отдельных районах. Передвижные (подфакельные) посты служат для отбора проб непосредственно под дымовым (газовым) факелом для дальнейшего выявления зоны влияния данного источника.

Одновременно с отбором проб производится измерение некоторых метеорологических параметров: температура воздуха, скорость и направление ветра, состояние погоды и др.. Существует несколько режимов отбора проб: разовый – продолжающийся 20-30 минут; дискретный – при котором в один поглотительный прибор или на фильтр в течение суток через равные промежутки времени отбирается несколько проб (3-8 разовых проб); суточный – пробы отбираются непрерывно в течение суток (РД 52.04.186-89, МУК 1611-77-1719-77).

Отбор проб воздуха делят на две большие группы: аспирационные способ отбора проб и отбор проб в газовые пипетки и сосуды (РД 52.04.186-89, МУК 1611-77-1719-77).

Аспирационные способы отбора проб воздуха – основаны на протягивании определенного объема воздуха через поглотительную среду

(сорбент или раствор) или специальные фильтры, это зависит от состояния, свойств и качества измеряемого вещества. Для этого необходимо иметь поглотительный прибор с поглотительной средой или патрон с фильтром, аспиратор и реометр (ротаметр).

Газообразные вещества легче растворить в жидких растворах, растворы подбирают в зависимости от того в какой степени данное вещество растворяется и способно реагировать с сорбентом, в некоторых случаях также применяется твердые сорбирующие поверхности, способные удерживать в себе газообразное вещество.

В качестве жидких поглотителей часто используют: дистиллированную воду, органические растворители, спирты, и специальные поглотительные смеси, которыми наполняются поглотительные приборы. К твердым поглотительным средам относятся зернистые сорбенты – силикагель, активированный уголь. Для измерения токсичных веществ, твердые сорбенты помещают в поглотительные приборы или специальные трубки. Для исследования аэрозолей используют специальные фильтры (аналитические фильтры аэрозольные) из тонких волокон (РД 52.04.186-89, МУК 1611-77-1719-77).

Для протягивания изучаемого воздуха через поглотительную среду используют специальные приборы: водяной аспиратор, электроаспираторы, пылесосы, водоструйные насосы и т.д.

Самым простейшим прибором является водяной аспиратор, устроенный по принципу сообщающихся сосудов. Объем воды равен количеству воздуха, протянутого через поглотительный прибор. Скорость протягивания такого аспиратора в среднем равен 1-2 л/мин.

Электроаспираторы работают по такому же принципу, что и водные аспираторы, но в отличие от простого водяного аспиратора снабжены несколькими реометрами для определения скорости просасывания воздуха

(скорость 0,1-1 л/мин и 10-20 л/мин). Также электроаспираторы позволяют отбирать несколько проб одновременно.

Пылесосы и водоструйные насосы используются совместно с реометром или ротаметром, для определения объема воздуха проходимо через поглотительную среду или фильтры. Еще один очень распространенный прибор это эжекторный аспиратор «АЭРА», имеющий баллон со сжатым воздухом, его используют в условиях, где нельзя применить электроаспиратор (при наличии в воздухе взрывоопасных газов в шахтах, на химических предприятиях). Время фиксируют при помощи секундомера при включении и выключении прибора (РД 52.04.186-89, МУК 1611-77-1719-77).

Отбор проб в сосуды или газовые пипетки – этот метод используется, если концентрация исследуемого вещества в воздухе очень высока и для определения данного вещества нет необходимости отбора большого объема воздуха.

Отбор проб в газовые пипетки (бутыли): сосуды наполняются жидкостью, которая не способна реагировать и растворять определяемое вещество. В качестве жидкости используют насыщенный раствор хлористого натрия, воду и т.д. Данную жидкость выливают в месте отбора проб, а отверстия в сосудах закрывают.

Отбор проб вакуумным способом: отбор производится в бутылки и газовые пипетки объемом в 1-2 литра. Удаление воздуха из сосуда производится при помощи вакуумного насоса (насос Камовского), степень разряжения воздуха определяется открытым ртутным манометром или вакуумометром. Для отбора проб воздуха вынимают стеклянную палочку и постепенно открывают зажим, из-за создаваемой разности давления исследуемый воздух попадает в сосуд, после отбора пробы зажимы закрывают.

Отбор проб обменным способом: бутылку или газовую пипетку присоединяют к аспиратору и пропускают через него десятикратный объем воздуха со скоростью 2 л/мин. Для того чтобы вещество не оседало на стенках

сосудов. Затем после отбора проб сосуд отсоединяют от aspirатора, краны закрывают, а резиновые трубки зажимают.

Отбор проб воздуха в резиновые камеры: отбор проб этим способом можно производить лишь в том случае если исследуемое вещество не реагирует с резиной. Обычно для этого способа используют камеры футбольных мячей. В камеру при помощи насоса закачивается воздух, а выдыхаемый воздух собирается в мешки Дугласа. (По ГОСТУ 17.2.3.01-86).

1.1.2. Дистанционные методы экологического контроля

Эти методы являются вспомогательными и используются в совокупности с контактными методами, они позволяют получить дополнительную информацию, которая позволит получить полноценную оценку качества окружающей среды.

Дистанционные методы основаны на использовании двух свойств зондирующих (электромагнитных, гравитационных, акустических) полей: взаимодействовать с изучаемым объектом и переносить полученную информацию на датчик. Дистанционные методы экологического контроля делятся на активные и пассивные. Активные методы основаны на использовании отраженных лучей от объектов исследования, направленного на эти объекты специальными излучателями (радиационный передатчик, лазер), а при пассивных методах идет регистрация отраженных, переизлученных или прошедших зондирующих полей, созданным самим объектом изучения (Якунина и др., 2009, Вартанов и др., 2009).

Также методы подразделяются на аэрокосмические и геофизические. Методами аэрокосмического исследования являются оптическая фото-видеосъемка, радиотепловая, радарная, инфракрасное, радиолокационная и другие виды съемок. Геофизические методы применяются для изучения состава, строения и состояния горных пород, в которых в тех или иных условиях могут развиваться опасные геологические процессы. Этот метод

также включает в себя картографирование, топографию местности, изучение составов почвы и их происхождения. Метод больше всего подходит для изучения загрязнения почвы (Якунина и др., 2009, Вартанов и др., 2009).

В экологическом мониторинге широко применяется информация, полученная со спутников. Свободный прием информации со спутников на Земле осуществляется Всемирной метеорологической организацией согласно концепции «Открытого неба». На наземных станциях производится прием, демодуляция, первичная переработка и подготовка спутниковой информации к их дальнейшему вводу на персональный компьютер.

На территории России активно развивается сеть станций приема данных со спутников NOAA (американские метеорологические спутники). Такие сети станций существуют в Москве (Институт космических исследований РАН, ВНИИ ГОЧС МЧС), в Иркутске (Институт солнечно-земной физики СО РАН), в Салехарде (Госкомитет по охране окружающей среды Ямало-Ненецкого автономного округа), во Владивостоке (Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН) и в Красноярске (Институт леса СО РАН) (Вартанов и др., 2009).

Традиционно загрязнение природной среды контролируют при помощи физических, химических, физико-химических и биологических анализов проб воды, воздуха и почвы (Чеснокова, 2007). Все эти методы основаны на сравнение содержания загрязняющего вещества в анализируемой пробе с фоновыми концентрациями или с установленными нормативами (ОДК, ПДК).

В связи с возникшей экологической ситуацией в современном мире, гигиенические нормативы, созданные для охраны здоровья человека, а также для того чтобы не допустить экологической катастрофы в окружающей среде, в большинстве случаев не способствуют нормальному функционированию окружающей среды. В связи с этим стали активно внедряться методы биологического мониторинга.

Проанализировав зарубежную литературу, было выявлено, что методы экологического мониторинга в данной области аналогичны с отечественными методами. Различия лежат лишь в названиях этих методов и их классификации. За рубежом методы экологического мониторинга подразделяют по видам выброса на три типа: 1) методы связанные с плановыми выбросами, 2) методы для неорганизованных выбросов, 3) методы для случайных выбросов (Gillespie et al., 2017).

1.1.3. Биологические методы экологического контроля

Эффективными методами экологического контроля на сегодняшний день являются биологические методы – биоиндикация и биотестирование (биотоксикология). Биологические методы экологического контроля позволяют диагностировать негативные изменения в природной среде при низких концентрациях загрязняющих веществ (Якунина и др., 2009, Бубнов и др., 2007).

Преимущество данных методов заключается в том, что они отражают степень опасности в окружающей среде для всех живых организмов, в том числе и для человека. Биологические методы являются интегральными и позволяют в полной мере оценить состояние окружающей среды, суммируют все без исключения биологически важные данные об окружающей среде, выявляют наличие в ней комплекса загрязнителей, а также способны указать на места и пути скоплений различного рода загрязнителей и выявить возможные пути их попадания в экологические системы (Чеснокова, 2007, Якунина и др., 2009, Бубнов и др., 2007).

Объектом исследования методов биоиндикации является изучение организмов или сообщества организмов-индикаторов в их естественных средах обитания. Биоиндикаторы – группа особей одного вида или сообщества, по наличию, состоянию и поведению которых можно с большей достоверностью можно судить о свойствах окружающей их среды, в том числе о присутствии в

ней загрязнителя и его концентрации (Мелехова и др., 2007, Бубнов и др., 2007, Чеснокова, 2007).

Методы биоиндикации могут быть простыми, это визуальный осмотр, а также и сложным, который включает в себя изучение иммунных и генетических изменений биоиндикатора (организм-индикатор). Основные виды методов биоиндикации:

- визуальный - включает в себя определение внешних изменений под действием неблагоприятного (загрязняющего) фактора (изменение окраски, краевое пожелтение листьев растений, замедленный рост, слабые стебли, образование гнили и т.д.). Широко применяется в сельскохозяйственной культуре;
- популяционные и экосистемные – в данных методах используют популяционные или экосистемные показатели: численность и биомасса отдельных видов, наличие тех или иных видов в данном сообществе, а также их соотношением, распределение по обилию и т.д. Метод очень популярен при изучении водных экосистем, а также, биоты обитающей в лесах, так как в этих сообществах легко можно отследить динамику изменений тех или иных показателей;
- патолого-анатомический и гистологический методы – относятся к группе методов биоиндикации с более достоверными данными, которые позволяют сделать, долгосрочны прогнозы о влиянии тех или иных веществ на среду обитания биоиндикаторов;
- эмбриологический метод – изучает влияние изменений в окружающей среде на развитие живого организма на ранних этапах развития (на этапе дробления, формирования зародышевых органов). В качестве биоиндикаторов выступают, как правило, живые организмы, способные к быстрому развитию и дающее многочисленное потомство (моллюски, рыбы, насекомые, земноводные);

- также существует ряд более точных и трудоемких методов: иммунологические (основанны на изучении изменений иммунной системы живых организмов в ответ на воздействие неблагоприятного фактора); генетические (анализ генетических изменений, которые проявляются в виде определенных мутаций при воздействии загрязняющего вещества на биоиндикатор) (Туровцев и др., 2005, Чеснокова, 2007, Мелехова и др., 2007).

С помощью методов биоиндикации можно исследовать уже состоявшегося или происходящего загрязнения окружающей среды загрязняющими веществами, он не может дать более точную оценку вреда, которую нанесет тот или иной загрязнитель, так как для проявления изменений необходимо время. Разработка единой системы показателей токсичности веществ для окружающей среды весьма затруднительна. Биоиндикаторы не могут быть универсальными, их необходимо подбирать для каждой среды самостоятельно, исходя из свойств этой среды. Также метод биоиндикации малоэффективен в холодное время года. Не смотря на, эти минусы методы биоиндикации широко эксплуатируются в России и за рубежом (Adersen et al., 2016, Sawidis et al., 2011, Salo et al., 2012, Tarricone et al, 2015, Annangi et al., 2016, Kalinovic et al., 2016, Vukovic et al., 2015, Iodice et al., 2016), это связано с тем, что эти методы малозатратные, не требуют громоздких и дорогостоящих приборов и простота метода являются бесспорным достоинством (Туровцев и др., 2005, Чеснокова, 2007, Мелехова и др., 2007).

В основе биотестирования лежат реакции тест-объекта (организма, помещенного в исследуемую среду) в лабораторных условиях. Этот метод позволяет дать оценку токсических свойств загрязняющего вещества на модельные живые организмы (Чеснокова, 2008, Мелехова и др., 2007).

Биотестирование обладает рядом преимуществ: простота метода, доступность, универсальность, экспрессность и дешевизна. При помощи тест-систем (тест-организмов) можно легко обнаружить залповые выбросы с определенного предприятия, можно получить информацию о вреде

загрязняющего вещества в считанные минуты, не ожидая, когда окружающая среда начнет на нее реагировать. В отличие от других методов (аналитического и биохимического мониторинга) биотестирование дает возможность определить уровень опасности данного вещества (Мелехова и др., 2007).

При оценке отрицательного воздействия на биологические объекты, тест-организмы вводятся в среду, где присутствует загрязняющее вещество. Важное условие биотестирования – использовать генетически однородные лабораторные культуры. Эти культуры получают путем многократного исследования воздействий на них различных загрязняющих веществ. Генетически однородные культуры тест-организмов позволяют избежать ошибок при оценке влияния загрязнителя на эти организмы, так как они способны давать схожую ответную реакцию (Мелехова и др., 2007, Чеснокова, 2008).

Различают следующие виды биотестов:

- Острые биотесты (*acute tests*), по показателям выживаемости длятся от нескольких минут до 24-96 часов;
- Краткосрочные (*short-term chronic tests*) хронические тесты, длятся на протяжении 7 суток и заканчиваются, как правило, после получения первого поколения тест-объектов;
- Хронические тесты (*ghronic tests*), распространяются на общую плодовитость, к примеру, ракообразных, при этом охватывают три поколения.

В России и за рубежом в качестве тест-организмов применяются дафнии, инфузории и других водных биоценозов (Adams et al., 2016, Чеснокова, 2007). Биотестирование широко применяют для тестирования качества природных и сточных вод, так как этот метод позволяет за считанные минуты определить опасность данного водного ресурса для дальнейшего его использования.

Хотя эти методы сходны по конечной цели, необходимо помнить, что биотестиование осуществляется на уровне молекулы, клетки или организма и характеризует все возможные последствия загрязнения окружающей среды для

биоты, а биоиндикация используется на уровне организма, популяции или сообщества и дает характеристику, как правило, самого загрязнения.

1.2. Биolumинесцентный метод оценки качества воздуха.

На сегодняшний день многие страны переходят на ферментативную систему оценки качества окружающей среды, так как эта система позволяет непосредственно выявить влияние вредных веществ на организмы или определить на какую часть организма они имеют большее воздействие.

Одним из таких методов является биolumинесцентный. Преимущество биolumинесцентного метода заключается в том, что свечение можно легко и точно зарегистрировать в отличие от других тест-параметров, используемые в биотестировании (летальный исход, скорость роста, интенсивность дыхания, флуоресценция хлорофилла и т.д.).

Биolumинесценция – это явление излучения света живыми организмами, связанное с хемилуминесцентными реакциями, катализируемые специальными ферментами люциферазами (Гительзон и др., 1984).

В основе свечения всех живых организмов лежит хемилуминесцентный процесс преобразования энергии, в котором участвуют специфические ферменты – люциферазы, органические молекулы – люциферины и кислород (Shimomura et al., 1974).

Биolumинесценция с точки зрения биомониторинга является удобным тест-параметром, который может отражать состояние биolumинесцентного тест-объекта в условиях загрязнения. На данный момент существует множество аналитических методов и биотестов основанный на использовании биolumинесценции *in vivo* и *in vitro* (Деребин, 2009, Shilo et al., 1979, Shimomura, 2008).

1.2.1. Светящиеся бактерии в роли биотестов.

По современной классификации биolumинесцентные бактерии относят к родам *Photobacterium*, *Vibrio*, *Lucibacterium*. Люминесцентными видами рода

Photobacterium являются: *P. phosphoreum* и *P. leiognathi*. Люминесцентными видами рода *Vibrio* являются: *V. fischeri*, *V. logei*, *V. harveyi*, *V. splendida*. Современная таксономия биолюминесцентных бактерий окончательно не определена и постоянно развивается, в связи с этим классификация все время меняется (Baumann et al., 1980, 1981, 1983).

Светящиеся бактерии, свободно обитают в морской воде, относятся к сапрофитам: они питаются органическими веществами, растворенными в морской воде, разлагают останки умерших животных и растений, часто поселяются на мертвой рыбе и кальмарах (Гительзон, 1976, Данилов и др., 1990).

Все фотобактерии грамотрицательные подвижные палочки, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы (углеводы, спирты, органические кислоты и т.д.) (Гительзон и др., 1984, Shimomura, 2008). Большинство видов биолюминесцентных бактерий выделяют хитиназу, амилазу, липазу, желатиназу. Культивирование светящихся бактерий возможно на искусственных средах при добавлении NaCl 2-3 %, разные виды бактерий культивируются при разных температурах, например, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi* оптимально растут при 25°C и являются мезофиллами, а *Photobacterium phosphoreum* может расти и при более низких температурах, так как является криофилом. *Photobacterium phosphoreum* может обитать в водах, где t воды ниже 15°C (на глубине океана свыше 500 метров) (Дерябин, 2009, Shilo et al., 1979).

Возможность широко применять свойства биолюминесцентных бактерий в качестве тест-объектов стало возможным, благодаря, биотехнологии – рекомбинатных бактерий. Биотесты на основе живых светящихся бактерий отличаются от биотестов основанные на инфузориях, дафниях, водорослях, рыбах, тем, что в качестве тест-параметра используется биолюминесценция. Чувствительность бактерий к различным загрязняющим веществам зависит

от штамма бактерий, условий их культивирования (состава питательной среды, рН среды, фазы роста бактерий и т.д.).

Биотесты на основе светящихся бактерий часто превосходят известные и широко применимые биотесты, тем, что обладают высокой чувствительностью, быстродейственные, более точные, просты в применении и позволяют контролировать одновременно несколько загрязняющих веществ (Кратасюк, 1994).

Исследованиями в этой области занимались многие отечественные ученые: Гительзон И.И. (1987), Кратасюк (1994), Дерябин (2009), Куч (2005), Алексерова (2014), Данилов (1989) и др., а из зарубежных наиболее известны работы Belkin (2003), Vulich (1982), Hastings (1963, 1965, 1968, 1969, 1977, 1985), Heitzer (1994) и другие. Область применения биотестов на основе биолюминесцентных бактерий очень широка и представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Биотесты на основе биолюминесцентных бактерий

Название	Действующие вещества
Анализ загрязнения пищевых продуктов микотоксинами, (7,53-31,79- мкг/мл)	Рубратоксин В, зеараленон, пенициллин, патулин, цитринин, охратоксин А, РР-токсин, афлатоксин В1
Определение присутствия в среде антибиотиков (0,2 мкг/мл)	Тетрациклин, хлорамфеникол, стрептомицин, неомицин, гентамицин, канамицин
Обнаружение токсичных веществ в водных системах (промышленные сточные воды и т.п.)	Ароматические углеводороды, дыхательные яды, фенольные соединения и продукты их деструкции, сульфатный лигнин, окрашенные фракции стоков, фенолоксидазы, детергенты, пестициды, тяжелые металлы, кобальт, отходы производства стабилизаторов
Обнаружение токсичных веществ в воздушной среде (компоненты ракетного топлива и др.)	Диметилгидразин, альдегиды, спирты, ацетон, HCN, SO ₂ , H ₂ S, Cl ₂ , продукты облучения смеси N ₂ O и цис-2-бутена
Обнаружение загрязнения среды гербицидами	Монурон, диурон, нефурон, атразин

Название	Действующие вещества
Определение бактерицидной активности в сыворотке человека	Иммуноглобулины, комплементы
Моделирование влияния химических и физических факторов	Температура, давление, лекарственные препараты, анестетики (галотан), глицерин, сахара
Тест на мутагенность	Мутагены
Появление продуктов окисления керогена сланцев в технологических процессах	Высокомолекулярные кислоты и т.п.
Определение токсичности среды для рыб	Органические вещества

Биолюминесцентные бактерии в качестве тест-объекта используются в нескольких видах: клеточная суспензия, твердая среда, лиофилизированный препарат.

Клеточная суспензия широко применяется для оценки токсичности сточных вод целлюлозной промышленности, в результате загрязнения их фенольными соединениями и продуктами их распада (Гиль и др., 1983).

Использование твердых сред для оценки токсичности позволяет многократно использовать одну и ту же культуру клеток в высокочувствительных детекторах для непрерывного контроля загрязнения, например воздуха в шахтах, горных выработках и штольнях (Yordan et al., 1968).

Лиофилизированные бактерии являются стандартными тест-объектами для измерения интегральной токсичности исследуемых водных образцов, исключают необходимость культивирования бактерий в лабораторных условиях и тем самым поддерживают бактериальных культур.

1.2.2. Биотесты на основе использования ферментативных реакций светящихся бактерий.

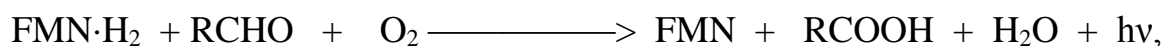
В биологическом мониторинге на основе биолюминесцентных систем долгое время использовали только интегральный метод оценки токсичности на светящихся бактериях (Bulich et al., 1981, Кратасюк и др., 1987). Несмотря на это, в литературе есть данные показывающие высокую чувствительность люциферазных реакций к действию токсических веществ (Кудряшева и др., 1994).

Сравнение влияния токсических веществ на биолюминесценцию *in vivo* и *in vitro* вывело зависимость между степенью токсичности в анализируемом образце и параметрами свечения в обеих биолюминесцентных системах, но в системе *in vitro* чувствительность в большинстве случаев выше в 100 иногда и 1000 раз.

Также установлено, что все изменения, происходящие в организме под действием загрязняющих веществ, начинаются на молекулярном уровне, в связи с этим использование в качестве тест-объектов ферментов жизнедеятельности биолюминесцентных бактерий, как один из параметров, отвечающих за свечение – является закономерным и оправданным.

Все виды люцифераз разных видов светящихся бактерий катализируют одну и ту же реакцию, где в качестве субстратов представлен флаavinмоноклеотид и кислород, а в качестве ко-субстрата – длинноцепочечный алифатический альдегид:

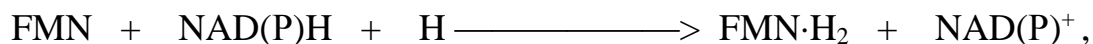
люцифераза



где FMN и FMN·H₂ – окисленная и восстановленная форма флаavinмоноклеотида, RCHO и RCOOH – длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая жирная кислота.

Считается, что в бактериях реакция, катализируемая люциферазой, сопряжена со второй ферментативной реакцией, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой:

оксидоредуктаза



где NAD(P)H и NAD(P)⁺ – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида.

Люцифераза билюминесцентных бактерий представляет собой гетеродимер с молекулярным весом 75 кДа, состоящий из α и β субъединиц (α-40 кДа, β-35 кДа), которые кодируются luxA и luxB генами люциферазного оперона. Принято считать, что α-субъединица обладает каталитическими свойствами, а β-субъединица принимает участие в формировании конформации активного центра (Hastings, 1965, 1969).

Также известно, что на бактериальной люциферазе расположено по одному центру связывания для субстратов – флавиномононуклеотида и альдегида. При этом сродство люциферазы к своим субстратам велико. (вставить ссылки на бактериальную люциферазу)

Светозлучение бактериальной билюминесценции наблюдается в синезеленой части видимого спектра с максимум длин волн 478-505 нм с интенсивностью эмиссии от 10³ до 10⁵ квант/с•кл. в зависимости от вида бактерий. Количество излучаемого света прямо пропорционально количеству люциферазы и каждого из субстратов.

Использование ферментов в биотестах позволяет увеличить достоверность результатов за счет того, что система переходит от живого объекта к реактиву, упрощая анализ, делая его экспрессным, автоматизированным за счет использования иммобилизованных реагентов. Становится возможным регулировать чувствительность физико-химических биотестов, также создать систему биотестов для биомониторинга путем использования цепей сопряжения ферментов с бактериальной люциферазой.

Варьирование чувствительности ферментативных тестов обуславливается изменением условий проведения анализа, а именно использование ферментативных реакций с различным механизмом сопряжения с реакцией, катализируемой бактериальной люциферазой: изменением состава реакционной смеси (количества фермента и субстрата, объем анализируемой пробы с разным содержанием токсической смеси); изменением последовательности добавления компонентов реакции; использованием различных форм препаратов фермента (фермент с разной степенью очистки, лиофилизированные или иммобилизованные препараты ферментов и т.д.) (Kratasyuk et al., 2003).

В настоящий момент разработаны и внедрены множество интегральных биолюминесцентных методов *in vivo* и *in vitro* для непрерывного экспресс-контроля состояния окружающей среды в промышленных районах и природно-хозяйственных комплексах. При помощи таких экспресс-методов контролируют залповые выбросы вредных веществ предприятиями, оценивают эффективность детоксикации сточных вод и работу очистных сооружений, а также оценивают экологическую опасность предприятий и отдельных районов (Тушкова и др., 1993).

1.2.3. Воздействие химических соединений на биолюминесцентные тест-объекты

Люминесцентные бактерии являются эталонным тест-объектом в экологическом мониторинге, так как сочетают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждений (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат и т.д.), с объективным и количественным характером отклика целостной системы на интегральное воздействие вредных веществ, также эти методы обладают высокой экспрессностью. Все это обеспечивается ферментом люциферазой, который обеспечивает эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, который доступен для экспрессных и количественных измерений (Ревазова и др., 2007).

Интегральные биотесты на основе биолюминесценции работают на том принципе, что обеспечивают интегральное изменение биолюминесцентного сигнала в ответ на появление в анализируемом объекте широко класса загрязняющих веществ. Люминесцентные биотесты разрабатываются на основе изучения влияния поллютантов и ксенобиотиков на саму реакцию биолюминесценции.

Ингибиторы и активаторы биолюминесценции можно классифицировать в соответствии с механизмом их влияния на физико-химические процессы в клетке (миграция энергии, электрона, миграция водорода, который в полярных растворителях можно рассматривать, как сумму протонов и электрона) (Кузнецов и др., 1997)

Изменение эффективности данных процессов при добавлении вредных веществ к биолюминесцентной системе зависит от физико-химических свойств вредного вещества (сродство к электрону, редокс-потенциал, квантовый выход флуоресценции, энергия и природа электронно-возбужденных состояний, перекрывание спектра поглощения молекулы ксенобиотика и спектра биолюминесценции, количество и размер гидрофобных заместителей, включение в структуру поллютанта тяжелых атомов и т.п.) (Кудряшева и др., 2002).

Анализ литературы и экспериментальных данных демонстрирует целый спектр возможных механизмов действия разных веществ на биолюминесценцию *in vitro*. Когда ингибитор (вещество, в присутствии которого интенсивность биолюминесценции понижается) вносится в реакционную смесь до инициирования реакции, могут проходить следующие процессы (Гительзон и др., 1984, Кратасюк и др., 1982):

1. Химическая модификация аминокислотных остатков, в том числе в активном центре фермента.
2. Конкурентные и другие типы отношений между субстратами люциферазы, НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и ингибиторами.

3. Тушение возбуждения и разрушение интермедиатов (Кудряшева и др., 1996).

4. Действие на дегидрогеназы через неспецифические акцепторы электронов и ингибиторы дыхательной цепи.

5. Взаимодействие с альдегидами в зависимости от липофильности вводимых соединений.

В силу многокомпонентности биферментной системы один ингибитор может влиять по нескольким из этих путей. Такие сложные взаимодействия между компонентами реакций биолюминесценции и добавляемыми веществами находят отражение в сложном изменении параметров свечения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Андреева Е.Ю. Экология Красноярска - реальность и будущее / Е.Ю. Андреева // Сборник мат-лов Межд. конф. студ. аспирант. и мол. ученых « Проспект Свободный-2016», Красноярск.-2016. С.3-6.
2. Бубнов А. Г. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды: учебно-методическое пособие / А. Г. Бубнов, С.А. Буймова, А.А. Гуцин, Т.В. Цвекова; ГОУ ВПО Иван.гос.хим-технол.ун-т. –Иваново, 2007. -112С.
3. Вартанов А.З. Методы и приборы контроля окружающей среды и экологический мониторинг: учебно-методическое пособие/ А.З. Вартанов, А.Д. Рубан, В.Л. Шкуратник. –Москва: Изд-во «Горная книга» гос.горн.ун-та, 2009.-640 с.
4. Гиль Т.А. Гашение люминесценции светящихся бактерий как тест для оценки токсичности фенольных компонентов стоков / Т.А. Гиль, А.Э. Балаян, Д.И. Стом //Микробиология, 1983. – Т.52, №6. – С. 1014–1016.
5. Гительзон И.И. Живой свет океана /И.И. Гительзон // Москва: Наука. - 1976. -120 с.
6. Гительзон И. И. Светящиеся бактерии. / Гительзон И.И. Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др. //Новосибирск: Наука. -1984.
7. Голиков, Р.А. Характеристика риска здоровья от выбросов и сбросов в условиях реструктуризации промышленности крупного города: дис. ... канд. мед. наук: 14.02.01/ Голиков Роман Анатольевич. – Новокузнецк,2015. -137 с.
8. ГОСТ 17.2.3.01-86 Охрана природы. Атмосфера. Правила контроля качества воздуха населенных пунктов. – Взамен ГОСТ 17.2.3.01-77; Введ. 01.01.1987. - М.: Изд-во стандартов, 1987. 5 с.
9. Григорьев Ю.С. Биоиндикация загрязнений воздушной среды на основе замедленной флуоресценции хлорофилла листьев и феллодермы

- деревьев/ Ю.С. Григорьев, М.А. Бучельников // Экология. -1999. - № 4. - С. 303 - 305.
- 10.Григорьев Ю.С. Флуоресценция хлорофилла в биоиндикации загрязнения воздушной среды / Ю.С. Григорьев // Вестник МАНЭБ т.10, №4: 2005. - с. 77-91.
- 11.Данилов В. С. Бактериальная биолюминесценция /В.С. Данилов, Н.С. Егоров // Москва: МГУ. -1990.-152 с.
- 12.Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. // М.: Наука. – 2009. – с. 246.
- 13.Есимбекова Е.Н. Биолюминесцентный экспресс метод определения интегральной токсичности воды и загрязнения воздуха / Е.Н. Есимбекова, Н.В. Римацкая, И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк // Вестник ОГУ. -2013. -№ 10. – С. 122-127.
- 14.Качество атмосферного воздуха и здоровье [Электронный ресурс]: Центр СМИ ВОЗ, информационный бюллетень. / Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), 2016. - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/ru/>
- 15.Качество воздуха в крупнейших городах России за десять лет 2005-2016: аналитический обзор / ГУ «ГГО», Росгидромет, -Санкт-Петербург, -2016, -133с.
- 16.Кратасюк В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон //Успехи микробиологии, 1987 - N21 - С. 3-30.
- 17.Кратасюк В.А. Бактериальная биолюминесценция и биолюминесцентный анализ / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Биофизика.- 1982.- Т. 27.- 6. – С. 937 - 953.
- 18.Кратасюк В.А. Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение: Дис. ... док. биол. наук / В.А. Кратасюк – Красноярск, 1994. - М. 377 с.

19. Кудряшева Н.С. Закономерности ингибирования бактериальной биолюминесценции *in vitro* хинонами и фенолами – компонентами сточных вод / Н.С. Кудряшева, Е.В. Шалаева, Е.Н. Задорожная, В.А. Кратасюк // Биофизика, 1994. – Т.39, №3. – С. 455–464.
20. Кудряшева Н.С. Действие солей металлов на бактериальные биолюминесцентные системы различной сложности / Н.С. Кудряшева, Е.В. Зюзикова, Т.В. Гутник, А.М. Кузнецов // Биофизика. – 1996. - Т. 41. – 6. - С. 1264 - 1269.
21. Кудряшева Н.С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа / Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова // Учебное пособие, - Красноярск: Изд-во КрасГУ, 2002. - 154 с.
22. Кузнецов А.М. Изучение характеристик реагентов для биолюминесцентных биотестов / А.М. Кузнецов, Н.А. Тюлькова, В.А. Кратасюк, В.В. Абакумова, Э.К. Родичева // Сибирский экологический журнал; Красноярск, 1997. - № 5 - С. 459-465.
23. Куц В. В. Ингибиторное действие фенольных экотоксикантов на фотобактерии при различных значениях рН. / В.В. Куц, Ю.М. Ильина, А.Д. Исмаилов, А.И. Нетрусов // Прикл. Биохим. Микробиол. – 2005. - №6. – с. 640-646.
24. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева, В.М. Глазер и др. // Москва: Академия. -2007. – 288 С.
25. МУК 1611-77-1719-77. Методические указания на определение вредных веществ в воздухе – М.: МЗ СССР, 1977.- вып.1-5.
26. Неверова О.А. Применение фитоиндикации в оценке загрязнения окружающей среды / О.А. Неверова // Биосфера.- 2012. –Т.1. -№1. –С. 82-92.

27. Никитин О.В. Контроль источников загрязнения атмосферного воздуха / О.В. Никитин. – Казань: Казан. ун-т, 2014. – 32 с.
28. РД 52.04.186-89 Руководство по контролю загрязнения атмосферы. – Введ. 01.07.1991. – М.: Гидрометеиздат, 1991. – 327 с.
29. РД 52.04.823-2015 Руководящий документ. «Массовая концентрация формальдегида в пробах атмосферного воздуха. Методика измерений фотометрическим методом с ацетилацетоном».
30. РД 52.04.799-2014 Руководящий документ «Массовая концентрация фенола в пробах атмосферного воздуха. Методика измерений фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина».
31. РД 52.04.792-2014 Руководящий документ «Массовая концентрация оксида и диоксида азота в пробах атмосферного воздуха. Методика измерений фотометрическим методом с использованием сульфаниловой кислоты и I-нафтиламина».
32. РД 52.04.793-2014 Руководящий документ «Массовая концентрация хлорида водорода в пробах атмосферного воздуха. Методика измерений фотометрическим методом».
33. РД 52.04.795-2014 Руководящий документ «Массовая концентрация сероводорода в пробах атмосферного воздуха. Методика измерений фотометрическим методом по реакции образования метиленовой синей».
34. Ревазова Ю.А. Методические рекомендации 01.020-07 Определение токсичности воздушной среды с помощью биотеста «Эколюм»: методические рекомендации разработаны: ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН (Ревазова Ю.А., Хрипач Л.В.), МГУ им. Ломоносова (Данилов В.С., Князев Т.А.), ФГУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора (Брагина И.В., Ластенко Н.С., Федосеева Т.А.) – М., 2007. – 15 с.

- 35.Соколов С.М. Количественные критерии гигиенической оценки воздействия на организм многокомпонентного загрязнения атмосферного воздуха // С.М. Соколов, Л.М Шевчук // Вестник ВГМУ, Минск. -2015. – Т.14. -№4. – С.86-91.
- 36.Соколов С. М.К вопросу оценки риска здоровью населения загрязнения атмосферного воздуха // С. С. Соколов, Л.М. Шевчук, А.Н. Ганькин, И.С. Позняк // Вестник ВГМУ, Минск. -2015. –Т.14. -№4. – С. 92-97.
- 37.Туоровцев В.Д. Биоиндикация: учебное пособие /В.Д. Туоровцев, В.С. Краснов // Тверь: ТвГУ. -2005. -178 С.
- 38.Тушкова Г.И. Экотоксикологическая оценка поверхностных и подземных вод Алтайского края / Г.И. Тушкова, Л.С. Эрнестова, И.В. Семенова, Н.А. Рябченко //В кн. Ядерные испытания, окружающая среда, здоровье населения Алтайского края - Т.2, кн.2 - Изд-во АГУ, Барнаул, 1993. - С. 112-123.
- 39.Чеснокова С. М. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды : учеб. пособие. В 2 ч. Ч. 1. Методы биоиндикации / С. М. Чеснокова ; Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд- во Владим. гос. ун-та, 2007. – 84 с.
- 40.Чеснокова С. М. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды : учеб. пособие. В 2 ч. Ч. 2. Методы биотестирования / С. М. Чеснокова ; Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд- во Владим. гос. ун-та. - 2008. – 92 с.
- 41.Якунина И.В. Методы и приборы контроля окружающей среды. Экологический мониторинг: учебное пособие/ И.В. Якунина, Н.С. Попов. –Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2009. -188с.
- 42.Adams M.D. A criticality index for air pollution monitors / M.D. Adams, P.S. Kanaroglou // Atmospheric pollution research. -2016. -№7. –P.482-487.
- 43.Adersen Z.J. Newborns health in the Danube Region: Environment, biomonitoring, interventions and economic benefits in a large prospective birth

- cohort study / Z.J. Adersen, R.J. Sram, M. Scasny, E.S. Gurzau et al. // Environment International. -2016. -№88. –P. 112-122.
44. Annangi B. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes / B. Annangi, S. Bonassi, R. Marcos, A. Hernandez // Mutation Research. – 2016. -№ 770. – P. 140–161.
45. Bansal P. Biomonitoring of air pollution using antioxidative enzyme system in two genera of family Pottiaceae (Bryophyta) / P. Bansal, S. Verma, A. Srivastaya // Environmental pollution, India. -2016. -№ 216. –P. 512-518.
46. Baumann P. Revaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*. / Baumann P., Baumann L., Bang S., Woolkalis M. // Curr. Microbiol. – 1980. – V. 4(3). P. 127-132.
47. Baumann L. The marine gram-negative eubacteria. / Baumann L., Baumann P. // In The procariotes. Stuttgart. Springer-Verlag. – 1981. – P. 83-181.
48. Baumann P. Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium*. A basis for a natural classification. / Baumann P., Baumann L., Woolkalis M., Bang S. // Ann. Rev. Microbiol. – 1983. – V. 37. – P. 363-398.
49. Belkin Sh. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. // Current Opinion in Microbiology. – 2003. – V. 6(3). – P. 206-212.
50. Branco P.T.B.S. The microenvironmental modelling approach to assess children's exposure to air pollution / P.T.B.S. Branco, M.C.M. Alvim-Ferraz, F.G. Martins, S.I.V. Sousa // Environmental Research, 2014. №135. P. 317–332.
51. Bulich A. A Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity / A.A. Bulich, D.Z. Isenberg // Instrum. Soc. Am. Trans., 1981. - V. 20, N1. - P. 29-33.
52. Bulich A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. // Process Biochem. -1982. – V. 17. – P. 45-47.

53. Danilov V.S. Bacterial luciferase as a biosensor of biologically active compounds. / V.S. Danilov, A.D. Ismailov // In Applied Biosensors, D. Wise ed., Boston. – 1989. – P. 39 -78 .
54. Davalos A. D. Current approaches used in epidemiologic studies to examine short-term multipollutant air pollution exposures / A. D. Davalos, T. J. Luben, A. H. Herring, J. D. Sacks // Annals of Epidemiology, 2017. № 27. P. 145-153.
55. Gillespie J. Estimation of spatial patterns of urban air pollution over a 4-week period from repeated 5-min measurements / J. Gillespie, N. Masey, M. R. Heal, S. Hamilton, I.J. Beverland // Atmospheric Environment, 2017. №150. P. 295-302.
56. Hastings J.W. Total quantum flux of isotropic sources / J.W. Hastings, G. Weber // Opt. Soc. Am. – 1963. - V.53(12). - P.1410-1415.
57. Hastings J.W. Molecular mechanism in bacterial bioluminescence: on energy storage intermediates and role of aldehyde in the reaction. / J.W. Hastings, Q.H. Gibson, J. Friedland, J. Spudich // Bioluminescence in progress. Acad. Press. – 1965. – P. 151-186.
58. Hastings J.W. Bioluminescence. // Annual Rev. Biochem. 1968. – V.37. – P. 597-630.
59. Hastings J.W. Structurally-distinct bacterial luciferases / J.W. Hastings, K. Weber, J. Friedland, A. Eberhard, F.W. Mitchell, A. Gunsales // Biochemistry. – 1969. – V.8 (12). – P. 4681-4689.
60. Hastings J.W. and Nealson K.H. Bacterial Bioluminescence // Annu. Rev. Microbiol. - 1977. – V.31. – P. 549–595.
61. Hastings J.W. Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. / J.W. Hastings, C.J. Potrikus, S.C. Gupta, M. Kurfurst, J.C. Makemson // Adv. Of microb. Physiol. – 1985. – V. 26. – P. 235-291.
62. Heitzer A. Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. / A. Heitzer, K. Malachowsky, J. E. Thonnard, P.


- R. Bienkowski, D.C. White, and G. S. Sayler // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – V.60(5). – P.1487-1494.
63. Iodice P. Air pollution monitoring using emission inventories combined with the moss bag approach / P. Iodice, P. Adamo, F. Capozzi, A. Di Palma, A. Spagnuolo, S. Giordano // *Science of the total environment*, Italy. -2016. - №541.-P. 1410-1419.
64. Kalinovic T.S. Elder, linden and pine biomonitoring ability of pollution emitted from the copper smelter and the tailings ponds / T.S. Kalinovic, S.M. Serbula, A.A. Radojevic, J.V. Kalinovic, M. M. Steharnik, J.V. Petrovic // *Geoderma*. - 2016. -№262. –P. 266-275.
65. Kratasyuk V.A. Polymer Immobilized Bioluminescent System for Biosensor and Bioinvestigations / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova // *PBM Series* – 2003.- V.1/ - P 307-341.
66. Rich D. Q. Accountability studies of air pollution and health effects: lessons learned and recommendations for future natural experiment opportunities / D. Q. Rich // *Environment International*, 2017. № 100. P. 62–78.
67. Salo H. Biomonitoring of air pollution in SW Finland by magnetic and chemical measurements of moss bags and lichens / H. Salo, M.S. Bucko, E. Vaahtovuori, J. Limo, J. Makinen, L.J. Pesonen // *Journal of geochemical exploration*, Finland. -2012. -№115. – P.69-81.
68. Sawidis T. Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities / T. Sawidis, J. Breuste, M. Mitrovic, P. Pavlovic, K. Tsigaridas // *Environmental pollution*. -2011. -№ 159. –P. 3560-3570.
69. Shilo M. Physiological characteristics underlying the distribution patterns of luminous bacteria in the Mediterranean sea and the gulf of Elate./ M. Shilo, T. Yetinson // *Appl. Environ. Microbiol.* 1979. – V.38(4), P.577–584.
70. Shimomura O. The aldehyde content of luminous bacteria and of an “aldehydeless” dark mutant. / Shimomura O., Johnson F.H., Morise H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. -1974. – V.71(12). – P. 4666-4668.

71. Shimomura O. Bioluminescence: Chemical principles and methods. / Shimomura O. // New Jersey: World Sci. Pub. – 2008. – P. 470.
72. Tarricone K. Toward standardization of sample collection and preservation for the quality of results in biomonitoring with trees / K. Tarricone, G. Wagner, R. Klein // Ecological indicators, Germany. – 2015. -№ 57. –P.341-359.
73. Vukovic G. Activemoss biomonitoring for extensive screening of urban air pollution: Magnetic and chemical analyses / G. Vukovic, M. A. Urosevic, Z. Goryainova, M. Pergal, S. Skriyanj, R. Samson, A. Popovic // Science of the total environment. -2015. -№ 521-522. – P. 200-210.
74. Yordan A.Z. Toxicant detector / A.Z. Yordan, E.R. Schnauss, E.H. Sie, A. Thanos // Pat. USA, 1968. - N 3370175.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В. А. Кратасюк
подпись инициалы, фамилия

«00» июня 2017г

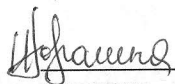
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Биолюминесцентные платформенные технологии для мониторинга
загрязнения воздуха**

06.04.01 Биология

06.04.01.03 Биофизика (сетевая)


Руководитель


подпись, дата

асс. каф.биофизики, к.б.н.
должность, ученая степень

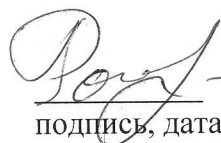
И.Г.Торгашина
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

А.И.Юнусова
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

доц., к.б.н.
должность, ученая степень

Т.В.Рожко
инициалы, фамилия

Красноярск 2017