

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

**КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ СО РАН**

Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова

Физико-химические основы биолюминесцентного анализа

Рекомендуется Сибирским региональным
учебно-методическим центром высших учебных заведений Мини-
стерства образования России для межвузовского
использования при подготовке студентов биологических,
физических и химических факультетов

Красноярск 2002

УДК 543
ББК 24.534
К 889

Рецензенты: д-р.хим. наук, с.н.с. Института химии и химической технологии СО РАН В.Е. Тарабанько
канд.физ.-мат. наук, проф. КрасГУ А.Г. Сизых.

Кудряшева Н.С., Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н.
К 889 Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: Учеб.пособие/ Краснояр. гос.ун-т. - Красноярск, 2002. - 154 с.

Представлен курс лекций и лабораторных работ по теме «Электронное строение молекул и закономерности их воздействия на биолюминесценцию». Дан обзор по использованию биолюминесцентного анализа.

Предназначено для студентов биологических и физических факультетов госуниверситетов.

Пособие подготовлено в рамках проекта «Исследовательская кафедра биофизики» ФЦП «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки» и при поддержке Министерства образования Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития для независимых государств бывшего Советского Союза, грант © REC-002, программа "Фундаментальные исследования и высшее образование".

© Красноярский
государственный
университет, 2002

© Н.С. Кудряшева,
В.А. Кратасюк,
Е.Н. Есимбекова, 2002

ISBN 5-7638-0346-9

ВВЕДЕНИЕ

Сильной стороной российской (в том числе и советской) школы всегда были фундаментальное образование, анализ природных явлений со строго научных позиций и формирование у студентов аналитического мышления. Однако для советской школы не характерна была направленность на решение насущных проблем действительности; знания, полученные студентами и школьниками, часто носили чисто теоретический характер, не использовались на практике. В связи с этим в настоящее время в предметных областях педагогики остро чувствуется нехватка демонстрационных материалов, простых лабораторных работ, практикумов, обучающих ориентироваться в окружающей среде.

Данное пособие включает курс лекций и лабораторных работ по темам «Электронное строение молекул и закономерности их воздействия на биолюминесценцию». «Физико-химические основы биолюминесцентного анализа», а также обзор по практическому использованию биолюминесцентного анализа для студентов биологических и физических факультетов госуниверситетов. Целью авторов данного учебного пособия являлось, с одной стороны, углубление фундаментальных знаний у студентов, специализирующихся в изучении свойств живой материи, с другой - демонстрация связи фундаментальных основ строения вещества с практически используемым методом - биолюминесцентным анализом.

Учебное пособие основывается на современных представлениях в области строения вещества и результатах последних исследований взаимосвязи электронного строения соединений с их воздействием на биолюминесценцию, проводимых в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН (г.Красноярск). Рассмотрено действие различных групп органических и неорганических соединений на биолюминесцентную ферментативную систему. Под электронным строением катионов металлов понимаются природа и заполненность

внешних орбиталей катиона и его радиус; закономерности изменения и периодичность свойств металлов определяются его положением в таблице Менделеева. Для органических молекул электронное строение - совокупность электронных подсистем (атомов, групп атомов, составляющих данную систему). Главная характеристика электронного строения органических молекул - относительное положение уровней энергии электронно-возбужденных состояний с учетом их природы и мультиплетности. Закономерности изменения и периодичность свойств органических молекул описываются систематикой молекул по спектрально-люминесцентным свойствам, введенной профессором Д.Н. Шигориным (НИФХИ им.Карпова, Москва). Воздействие органических и неорганических соединений рассмотрено в данном пособии с точки зрения их влияния на элементарные физико-химические процессы в биолюминесцентной системе (перенос энергии, электрона, водорода). Этот подход доказал свою перспективность для понимания механизмов светоизлучения в биолюминесцентных системах. Показана возможность практического использования новых полученных результатов, так как все вышеперечисленные закономерности использовались авторами для разработки нового направления биолюминесцентного анализа – ферментативного биолюминесцентного биотестирования. Основы этого направления изложены в недавно опубликованном научно-учебном пособии "Экологическая биофизика" (научно-педагогическое издание в 3 томах под общей редакцией проф. И. И. Гительзона и проф. Н. С. Печуркина) - Том 1. Фотобиофизика экосистем. - М.:Логос, 2001.–350с.

Предлагаемое пособие демонстрирует способ практического применения научных результатов на примере создания новых методов биолюминесцентного анализа, формирует у студентов научно-методический подход при анализе свойств материи на основе ее строения, обучает приемам конструирования аналитических систем с заданными свойствами на основе физико-

химических закономерностей функционирования сложных биологических систем.

Учебник предназначен для студентов физических, химических и биологических факультетов, а также научных сотрудников, использующих биолюминесцентный анализ в экологических исследованиях.

Авторы выражают благодарность своим соавторам по научной работе Е.Н.Немцевой, Е.Н.Ветровой, Н.Н.Рем-мель.

Работа является итогом исследований, выполненных при поддержке грантами РФФИ (N 98-02-18054, N 01-03-32843), Красноярского научного фонда (7F0202-D), Федеральной целевой программы «Интеграция» №А0021, Программы Министерства высшего образования Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований CRDF REC002, Интас 2001 N562, Программы научного сотрудничества между Нидерландами и Российской Федерацией (NWO-Russia N 047-007-005), и грантом NATO CLG-974984.

*1.1. ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА АТОМОВ
И ХИМИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ*

*1.1.1. Квантово-механическая модель атома
Шредингера и строение электронной оболочки атома*

Основой современной теории строения атома является квантово-механическое описание атома, предложенное Шредингером. Сущность его заключается в том, что движение микрообъекта описывается волновым уравнением, а определение местоположения объекта производится по вероятностным принципам. Шредингер применил уравнение волнового движения к движению электрона в атоме. При этом энергия электрона оказалась зависимой только от некоторой волновой функции ψ . В самом общем виде уравнение Шредингера можно записать как

$$-\frac{h}{2\pi^2m}\left(\frac{\partial^2\psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\psi}{\partial z^2}\right) + U\psi = E\psi,$$

где U - потенциальная энергия электрона; E - полная энергия электрона; ψ - волновая функция, характеризующая движение электрона.

Первая особенность уравнения Шредингера состоит в том, что оно имеет решение только при некоторых определенных значениях энергии электрона E и не имеет решения при промежуточных, т.е. поведение электрона в атоме имеет дискретный (квантовый) характер. Вторая особенность состоит в том, что его решения показывают вероятность нахождения электрона в той или иной точке пространства вокруг ядра атома и никак не связывают эту вероятность с траекторией движения

электрона. Третья особенность - сложность его решения для многоэлектронных систем.

На рис.1 показан вид волновых функций для состояния с наименьшей энергией атома водорода. Сама волновая функция имеет ограниченный физический смысл, зато ее квадрат ψ^2 является мерой вероятности нахождения электрона в некотором объеме на расстоянии r от ядра. Наиболее важное значение имеет вид функции $4\pi r^2 \psi^2$. Она определяет вероятность нахождения электрона в некотором шаровом слое ($4\pi r^2$ - поверхность шара радиусом r) на расстоянии r . Максимум этой функции для электрона с наименьшей энергией находится на расстоянии боровского радиуса от ядра.

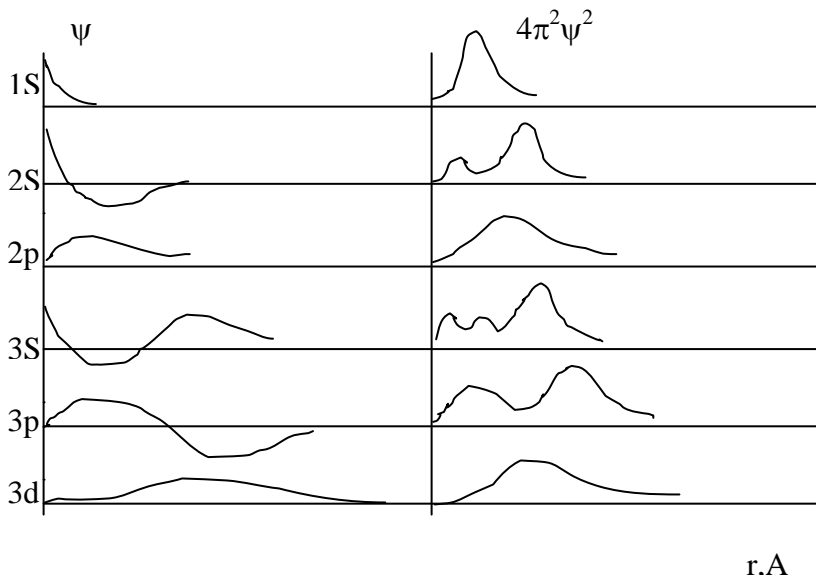


Рис.1. Волновые функции электрона в атоме водорода для состояний с наименьшей энергией

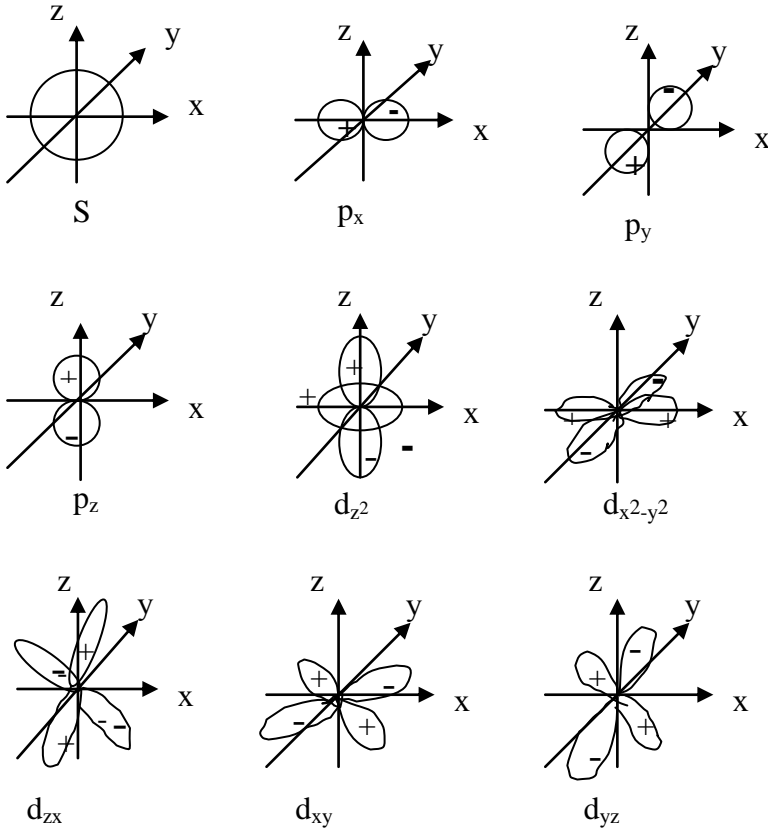


Рис.2. Схема пространственного расположения s-, p- и d-орбиталей

На рис.2 показано пространственное расположение волновых функций электрона. Поверхности (так называемые пограничные поверхности) проведены так, что внутри них электрон находится большую часть времени (90%). Таким обра-

зом, вместо боровских орбит, подобно орбитам планет, квантовая механика ввела понятие пространства, в котором электрон находится большую часть времени. Эти пространства получили название орбиталей. Интерпретация орбиталей состоит в следующем. Электрон часто бывает удобно рассматривать как бы размазанным в пространстве орбитали в виде электронного облака, поэтому величина ψ^2 служит также и мерой электронной плотности в данном объеме. В этом смысле под орбиталью можно понимать пространство, заключающее около 90% электронного облака.

Чрезвычайно важной характеристикой орбитали является вид ее симметрии. Орбитали, имеющие шаровую симметрию, носят название s-орбиталей. Орбитали, имеющие вид гантелей, называются p-орбиталями. Более сложный вид имеют d- и f-орбитали. Из решения уравнения Шредингера следует, что в электронном уровне может быть одна s-орбиталь, три p-орбитали, пять d- и семь f-орбиталей. Оси трех p-орбиталей расположены под углом 90° друг к другу. Расположение пяти d-орбиталей показано на рис 2.

Дискретные квантовые состояния электрона в атоме проявляются в различии форм орбиталей и отсутствии промежуточных между ними форм, в определенном расположении орбиталей в пространстве, когда некоторые направления предпочтительно заполняются электронами, а другие пустуют. Существует система квантовых характеристик электрона (обозначаемых формально квантовыми числами), которая определяет, какие характеристики движения изменяются скачкообразно.

Главное квантовое число. Главное квантовое число n определяет энергию электрона и может принимать любые целочисленные значения: 1, 2, 3... Энергию электрона в атоме водорода можно определить из уравнения

$$E = -\frac{e^2}{2r_b} \frac{1}{n^2} = -13,6 \frac{1}{n^2}, \text{ эВ,}$$

здесь e - заряд электрона; r_b - боровский радиус, равный $0,53 \text{ \AA}$.

Графически энергию квантовых состояний электронов в атоме водорода можно изобразить при помощи уровней энергии. На рис.3 горизонтальные линии соответствуют значениям энергии электрона в атоме водорода. Энергия связи электрона с ядром оценивается количеством энергии, необходимой для его удаления от ядра на бесконечное расстояние. Поэтому значения энергии электрона указываются со знаком минус. На ближайшем к ядру энергетическом уровне энергия электрона минимальна.

Излучение или поглощение энергии происходит при изменении квантового состояния электронного облака, т.е. при изменении его энергии.

Орбитальное квантовое число. Энергетические уровни обычно представляют собой совокупность подуровней. Это связано с тем, что энергия электрона зависит не только от расстояния от ядра, но и от момента количества движения (mvr). Этот орбитальный момент количества движения электрона также подчиняется законам квантования, т.е. принимает не любые, а только вполне определенные значения. Величина орбитального момента количества движения электрона определяется квантовым числом l (орбитальное квантовое число), которое может принимать целочисленные значения от 0 до $(n-1)$. Каждому значению l соответствует определенная форма орбитали. Квантовые подуровни с различными величинами l ($l = 0, 1, 2, 3 \dots$) чаще всего обозначают буквами (соответственно, s-, p-, d-, f-подуровни), а электроны, находящиеся в этих состояниях, s-, p-, d-, f-электронами. Решения уравнения Шредингера показывают, что s-электроны ($l=0$) имеют орбитали в форме шара, p-электроны ($l=1$) - форму гантели, d-электроны - форму розетки или сложной гантели (см. рис.2).

Е, эВ

$n \infty$ (свободный электрон)

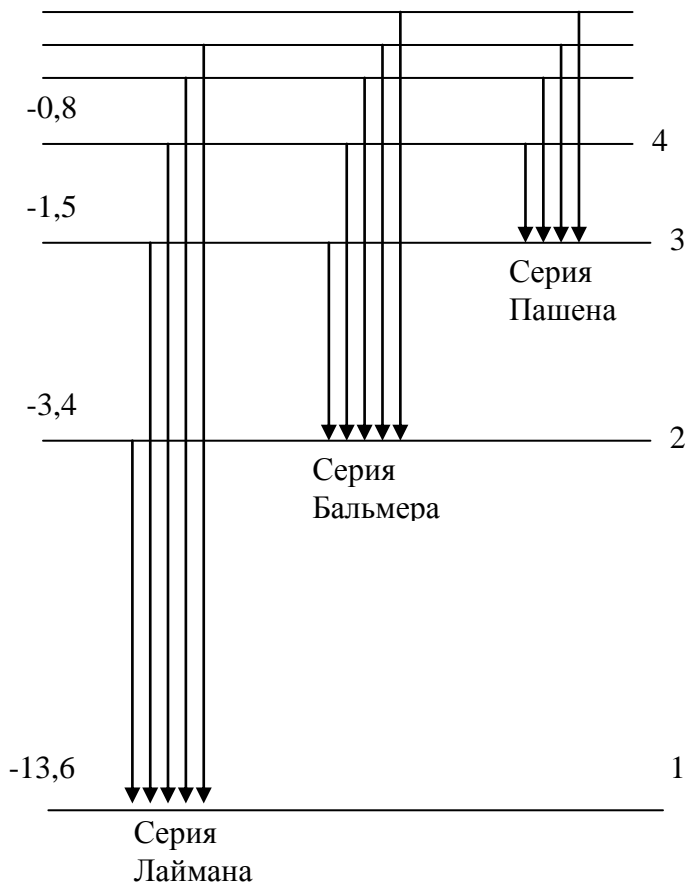


Рис.3. Схема уровней энергии и квантовые переходы электрона в атоме водорода

Магнитное квантовое число m . Если поместить атом в магнитное поле, то в зависимости от расположения орбитали по отношению к внешнему магнитному полю энергия орбиталей с одинаковым орбитальным числом l будет различна. Эта энергия, определяемая взаимодействием внешнего магнитного поля и собственного магнитного поля, которое возникает при движении электрона по орбитали, также изменяется скачками. Вследствие этого орбитали располагаются в пространстве определенным образом. Так, p -орбитали располагаются перпендикулярно друг другу по осям декартовых координат. В соответствии с направлением их обозначают - p_x , p_y , p_z .

Спиновое квантовое число. Электрон вращается вокруг собственной оси (по часовой стрелке или против нее). Вращательному движению, как и всякому другому виду движения, соответствует момент движения. Спиновый магнитный момент квантуется и может принимать значения $+1/2(h/2\pi)$ и $-1/2(h/2\pi)$, а спиновое квантовое число s - значения $+1/2$ и $-1/2$.

Заполнение электронных оболочек атомов описывается принципом Паули и правилом Хунда.

Принцип Паули: в атоме не может быть двух электронов в состояниях, характеризующихся четырьмя одинаковыми квантовыми числами.

Правило Хунда: в пределах подуровня электроны заполняют максимальное количество орбиталей.

Периодичность свойств химических элементов

Классификационным признаком элементов в периодической системе Менделеева является порядковый номер. Он, в свою очередь, определяет число положительных зарядов в ядре или число электронов вокруг ядра, распределенных по их орбиталям. Атомы элементов каждой группы имеют одинаковое строение внешних орбиталей. Периодичность электронного строения проявляется в том, что через определенное количество элементов снова повторяются s -, p -, d - и f -элементы с одинаковыми конфигурациями внешних электронных орбиталей

(подуровней). Периодичность электронных структур элементов приводит к периодическому изменению ряда физических свойств элементов - атомных радиусов, потенциалов ионизации, сродства к электрону. При передвижении вдоль периода системы наблюдаются также закономерные изменения в спектрах поглощения и испускания атомов, которые периодически повторяются.

Характерные оптические свойства атомов элементов периодической системы Менделеева определяются главным образом валентными электронами, расположенными на внешних орбиталях. Линии в спектрах поглощения и испускания элемента связаны в основном с электронными переходами $s - p$, $s - d$, $d - p$, $d - f$ и т.д. Элементы, стоящие в одной группе периодической системы, имеют подобные электронные конфигурации (совокупности атомных орбиталей различного пространственного строения) и сходные спектры. Наблюдается самая непосредственная связь между энергией электронных уровней (определяемой главным квантовым числом n), орбитальной природой (орбитальное квантовое число l) и мультиплетностью (спиновое квантовое число s), с одной стороны, и оптическими свойствами атомов, связанными с определенными правилами отбора, - с другой. Таким образом, периодичность физико-химических (в том числе и оптических) свойств атомов обусловлена распределением электронов по орбиталям или по энергетическим уровням этих орбиталей, которым можно приписывать соответствующие значения квантовых чисел n , l , m , s .

Аналогично атомам электронные переходы молекул можно также классифицировать по орбитальному признаку. В следующих разделах будет рассмотрена периодичность свойств молекул в зависимости от строения молекулярных орбиталей. Однако предварительно следует остановиться на закономерностях формирования химической связи при образовании молекул из атомов.

1.1.2. Метод молекулярных орбиталей

При образовании химической связи между атомами происходит перекрывание атомных орбиталей. Электроны в молекуле становятся общими для обоих атомов, образуя молекулярную орбиталь. Метод молекулярных орбиталей (ММО) рассматривает все электроны молекулы находящимися не на атомных, а на молекулярных орбиталях.

Типы молекулярных орбиталей

Когда электрон одного атома при сближении попадает в сферу действия другого атома, характер движения, а следовательно, и волновая функция электрона изменяются. В образовавшейся молекуле волновые функции или орбитали электронов неизвестны. Чаще всего молекулярные орбитали получают линейной комбинацией атомных орбиталей (ЛКАО). В простейшем случае молекулярную орбиталь можно получить как линейную комбинацию атомных орбиталей, складывая или вычитая волновые функции. Например, волновые функции или орбитали водорода $1s$ могут дать две линейные комбинации - одну при сложении (рис. 4а), другую при вычитании (рис. 4б). Когда волновые функции складываются (рис. 4а), то в области перекрывания плотность электронного облака, пропорциональная ψ^2 , становится больше, между ядрами атомов создается избыточный отрицательный заряд - и ядра атомов притягиваются к нему. Молекулярная орбиталь молекулы водорода, полученная сложением волновых функций атомов водорода, называется **связывающей** (рис.5). Если волновые функции вычитаются (рис. 4б), то в области между ядрами атомов плотность электронного облака становится равной нулю, электронное облако "выталкивается" из области между атомами. Образующаяся молекулярная орбиталь называется **разрыхляющей** молекулярной орбиталью (рис.5).

При образовании молекулы водорода из атомов s -орбитали образуют только σ -связь. Полученные молекулярные орбитали

обозначаются: сигма-связывающая - $\sigma_{\text{св}}$, и сигма разрыхляющая - $\sigma_{\text{р}}$, (рис.5).

Молекулярные орбитали, образованные 1s-атомными орбиталями, обозначаются $\sigma_{\text{св}}1s$ и $\sigma_{\text{р}}1s$.

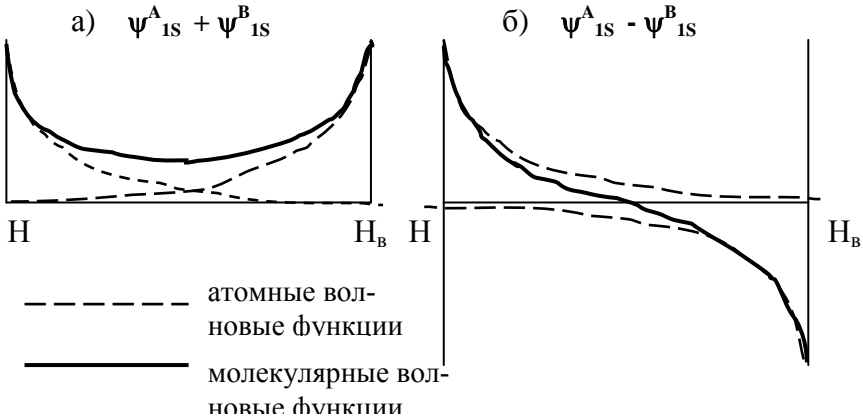


Рис.4. Взаимодействие волновых функций атомов водорода

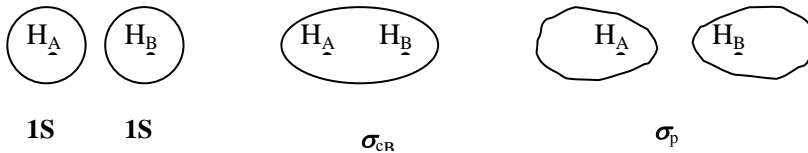


Рис.5. Образование связывающей $\sigma_{\text{св}}$ и разрыхляющей $\sigma_{\text{р}}$ орбиталей из атомных s-орбиталей

На связывающей молекулярной орбитали потенциальная энергия электронов оказывается меньше, чем на атомных орбиталях, а на разрыхляющей - больше (рис.6). По абсолютной величине увеличение энергии электронов на разрыхляющих орбиталях несколько больше уменьшения энергии на связывающих орбиталях. Электрон, находящийся на связывающей орбитали, обеспечивает связь между атомами, стабилизируя молекулу, а электрон на разрыхляющей орбитали дестабилизирует молекулу, т.е. ослабляет связь между атомами. Заселение разрыхляющей связи в каком-либо химическом процессе часто ведет к разрыву этой связи.

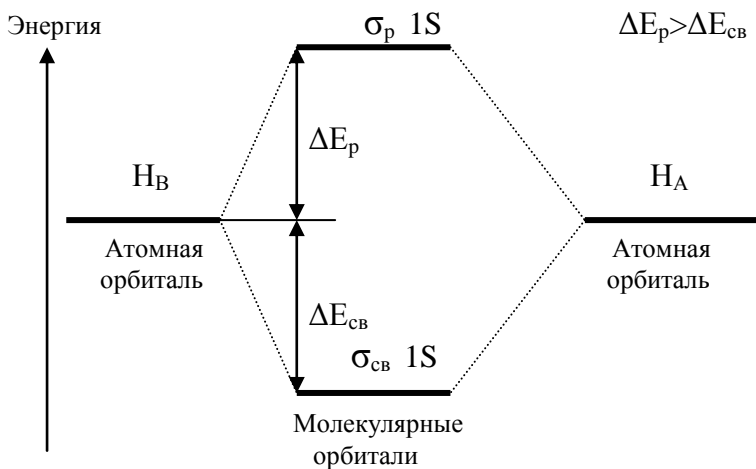


Рис.6. Изменение энергии атомных орбиталей при образовании связывающей и разрыхляющей молекулярных орбиталей

Молекулярные орбитали могут образовываться из $2p$ -орбиталей одинаковой симметрии. Связывающая и разрыхляющая σ -орбитали образуются из $2p$ -орбиталей, расположенных по оси x (рис.7а). Они обозначаются, соответственно, $\sigma_{sv}2p_x$ и σ_p2p_x . Связывающая и разрыхляющая π -орбитали образуются из $2p_z$ -орбиталей (рис.7б). Обозначаются они, соот-

ветственно, $\pi_{\text{CB}}2p_z$, π_p2p_z . Аналогично образуются $\pi_{\text{CB}}2p_y$ - и π_p2p_y -орбитали. На рис.8 приведено соотношение энергий молекулярных орбиталей, образованных из атомных $2p$ -орбиталей. Связывающие и разрыхляющие молекулярные орбитали, образованные из s - и p_x -орбиталей, показаны на рис.7в.

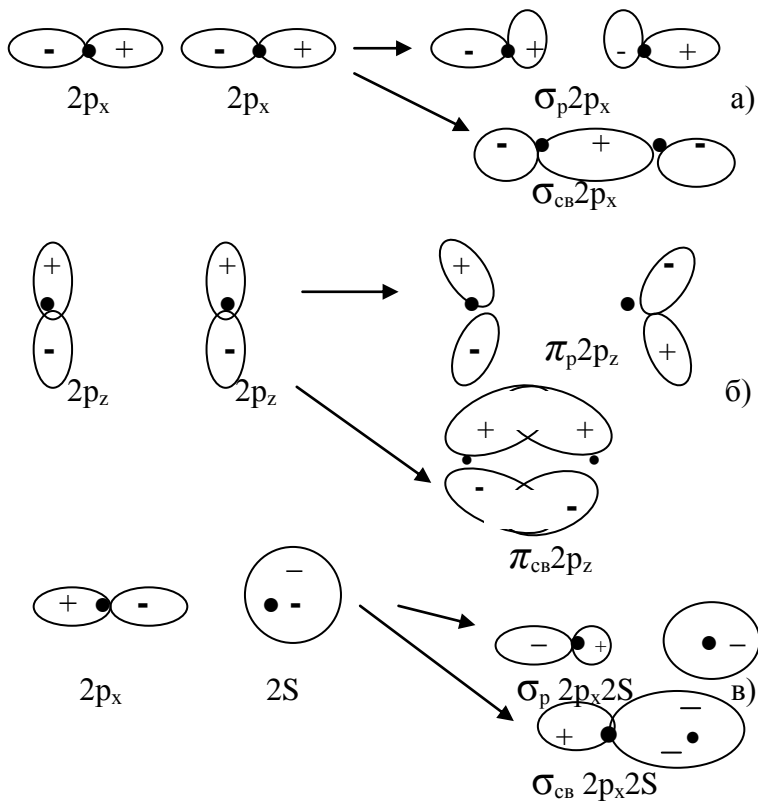


Рис.7. Различные случаи образования связывающих и разрыхляющих молекулярных орбиталей

Итак, при взаимодействии атомных орбиталей образуется система молекулярных орбиталей. На рис.7 показан набор молекулярных орбиталей, образующихся из 1s-орбиталей, на рис. 8 - набор молекулярных орбиталей, образующихся из атомных орбиталей второго электронного слоя 2s и 2p.

Энергия

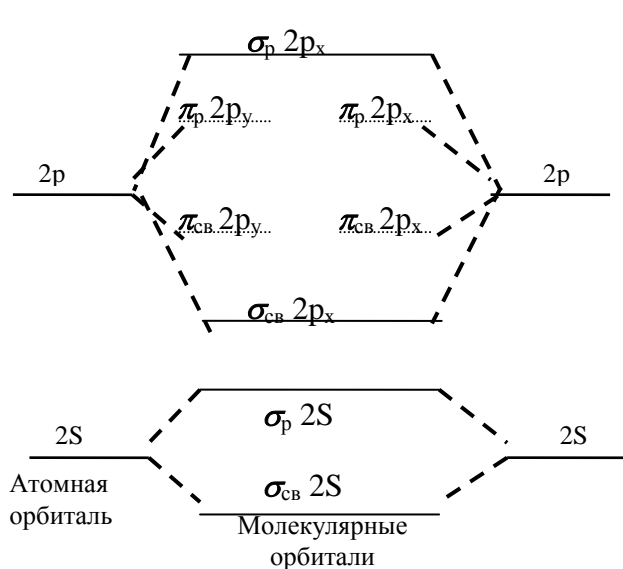


Рис.8. Система молекулярных орбиталей для молекул элементов II периода

Заполнение молекулярных орбиталей электронами происходит в порядке увеличения энергии орбиталей. Если молекулярные орбитали имеют одинаковую энергию (для $\pi_{св}$ - или π_p -орбиталей), то заполнение происходит по правилу Хунда так, чтобы спиновый момент молекулы был наибольшим. Каждая молекулярная орбиталь, как и атомная, может вместить два электрона. Магнитные свойства молекул связаны с наличием

неспаренных электронов: если в молекуле есть неспаренные электроны, то она парамагнитна, если нет - диамагнитна.

Если при образовании молекулы из атомов электроны в молекуле попадают на связывающие орбитали, то потенциалы ионизации молекул должны быть больше, чем потенциалы ионизации атомов, а если электроны попадают на разрыхляющие орбитали, то наоборот.

1.2. ПУТИ ВОЗБУЖДЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Люминесценция - свечение вещества, представляющее собой избыточное излучение по сравнению с тепловым излучением тела. Длительность люминесценции - от 10^{-10} с до нескольких часов. Люминесценция наблюдается в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях. Классифицировать люминесценцию можно двумя способами: по природе излучения и по способу получения электронно-возбужденных состояний. Рассмотрим эти два способа классификации люминесценции.

В соответствии с характеристиками природы излучения можно выделить флуоресценцию и фосфоресценцию. Излучательный переход между состояниями одинаковой мультиплетности называется **флуоресценцией**. В соответствии с определением это $S \rightarrow S$ и $T \rightarrow T$ -переходы. Однако практически мы имеем дело с $S \rightarrow S$ -переходами. Время жизни флуоресценции мало (приблизительно 10^{-10} - 10^{-8} с), она затухает сразу после прекращения возбуждения. Излучательный переход между состояниями разной мультиплетности называется **фосфоресценцией**. Обычно это $T \rightarrow S_0$ -переходы. Данный процесс является запрещенным (запрет по мультиплетности). Запрет может частично сниматься в результате спин-орбитальных взаимодействий. (Более подробно этот процесс рассмотрен в предыдущем разделе.) Время жизни фосфоресценции больше, чем флуоресценции (в связи с наличием запрета). Однако времен-

ные границы между этими двумя видами люминесценции отсутствуют.

Способ получения электронно-возбужденных состояний может характеризовать либо источник возбуждения, либо механизм возникновения люминесценции.

По механизму возникновения люминесценции выделяют свечение дискретных центров и рекомбинационную люминесценцию. В первом случае поглощающие и излучающие центры - одни и те же частицы (атомы, ионы, молекулы). Этот вид люминесценции встречается у органических веществ, их растворов и неорганических соединений. При рекомбинационной люминесценции акты поглощения и люминесценции разделены не только во времени, но и в пространстве. Такая люминесценция наблюдается, например, при рекомбинации электронов и дырок в неорганических кристаллах (кристаллофосфорах), радикалов или ионов в газах и жидкостях.

В соответствии с типом источника выделяют **фотолюминесценцию** (источник возбуждения - свет), **электролюминесценцию** (электрическое поле), **рентгенолюминесценцию** (рентгеновские лучи), **хемилюминесценцию** (химические реакции).

Наибольшее значение имеет фотолюминесценция. Фотолюминесценцию можно характеризовать спектрами люминесценции, поляризацией, квантовым выходом (отношение количества излученных квантов к количеству поглощенных квантов). Максимум спектра фотолюминесценции обычно сдвинут в длинноволновую область по отношению к максимуму спектра поглощения (**закон Стокса**). Спектры поглощения и флуоресценции приблизительно зеркально симметричны, если они изображены в шкале частот (правило зеркальной симметрии).

1.3. СИСТЕМАТИКА МОЛЕКУЛ ПО СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ СВОЙСТВАМ

1.3.1. Орбитальная классификация электронных переходов и состояний

Электронная структура молекул - это совокупность всех электронных орбиталей молекулы. Она включает в себя все частично автономные электронные подсистемы, локализованные на атомах и атомных группах молекулы. Рассмотрим классы ароматических и алифатических углеводородов. Их электронная структура включает орбитали σ , π и σ^* , π^* , следовательно, характеризуется основными состояниями σ , π и возбужденными состояниями σ^* , π^* (звездочка указывает на возбужденные состояния). Замещение атома углерода или водорода в молекулах этих классов на гетероатомы других элементов периодической системы приводит к возникновению новых классов молекул.

Исключим из рассмотрения в качестве гетероатомов в ароматических соединениях атомы водорода и углерода. Атомы элементов I – IV групп периодической системы обладают свободными (вакантными) p- и d-орбиталями, а элементы V-VII групп - занятыми s- и p-орбиталями и свободными d-орбиталями. Число и относительное положение орбиталей определяется порядковым номером элемента и главным квантовым числом. Участие занятых и свободных орбиталей гетероатомов, входящих в молекулы ароматических и алифатических соединений с сопряженными связями, в π -делокализации зависит от их пространственной ориентации, которая, в свою очередь, зависит от гибридизации. В упрощенном приближении σ -орбитали можно рассматривать локализованными между двумя атомами, а π -орбитали - делокализованными, образующими π -систему (подсистему) молекулы. В более общем случае многоатомные молекулы, особенно содержащие гетероатомы, можно представить как сложную систему, в которой проявляются двойственные свой-

ства электронов: делокализация и относительная локализация их орбиталей на определенных атомах и группах.

Вакантные и занятые орбитали гетероатомов, которые не принимают участия в образовании валентных связей, обозначаются, соответственно, ν - и l -орбитали. Эти орбитали могут принимать участие в π -делокализации, являясь при этом в какой-то степени автономными. В плоских молекулах (например, ароматические спирты, акридоны и др.) l -орбитали можно отождествлять с p_z -орбиталями (рис.9).

В случае неплоских молекул (например, соединения, содержащие атомы элементов V-VI групп) ось симметрии l -орбитали образует угол, отличный от 90° , с плоским фрагментом молекулы (некоторые ароматические амины, ароматические эфиры и др.).

Вакантными ν -орбиталями, принимающими участие в π -делокализации, являются свободные p -орбитали гетероатомов (например, $2p$, $3p$, $4p$ -орбитали атомов бора, алюминия, галлия в соответствующих производных бензола).

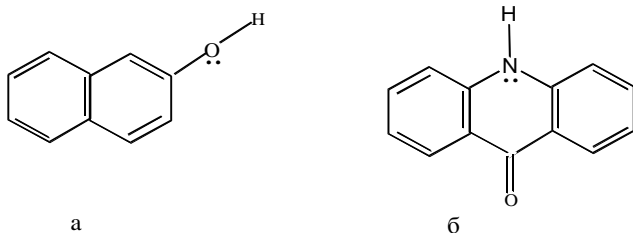


Рис.9. l -орбитали в ароматических спиртах (а) и акридолах (б).
 l -электроны обозначены точками

Новый класс молекул образуют соединения, в которых осуществляется sp^2 -гибридизация орбиталей гетероатомов (например, кислорода, азота, серы в группах $>C=O$, $>C=N-$, $>C=S$, $-N=O$, $-NO_2$, $-N=N-$ и др.). В этих случаях орбитали, занятые парой электронов гетероатома, расположены в плоскости молекулы (имеют p_x - или p_y -характер) и поэтому не могут участвовать в π -делокализации системы. Такие орбитали гетероатомов принято обозначать через n (рис.10). Орбитали n , l , v -типа способны принимать участие в образовании донорно-акцепторных связей.

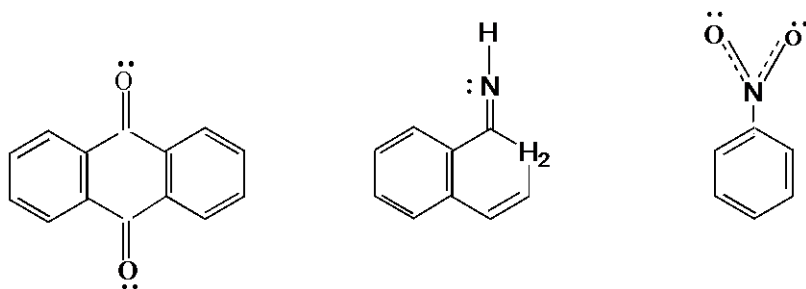


Рис.10. n -орбитали ароматических соединений.
 n -электроны обозначены точками

Определенная автономия отдельных атомных групп, содержащих гетероатомы, проявляется в спектрах поглощения и люминесценции органических соединений. Эти группы атомов (хромофоры) характеризуются определенными частотами колебаний и проявляются в спектрах молекул пиками с соответствующими длинами волн. Например, карбонильные группы дают слабоинтенсивный спектр поглощения в интервале длин волн 400-500 нм; π -система ароматических соединений – интенсивные пики поглощения, положение которых зависит от количества сопряженных орбиталей атомов, и т.д.

Итак, квантово-механическое рассмотрение молекул позволяет выделить 5 типов орбиталей - σ , π , n , l , v - и положить

их в основу классификации молекул. Уровни энергии орбиталей определяются порядковым номером элемента, главным квантовым числом, а также гибридизацией орбиталей. Обычно в соответствии со своим положением l -орбитали главным образом принимают участие в формировании основного состояния (π) (такая запись означает смешивание π - и l -орбиталей), а ν -орбитали - возбужденного состояния ($\nu\pi^*$) (эта запись означает смешивание ν и возбужденной π^* -орбитали). Электронную структуру молекулы можно характеризовать совокупностью уровней энергии молекулярных и атомных орбиталей, их природой и относительным положением.

Все рассматриваемые молекулы, согласно классификации Д.Н. Шигорина, могут быть разбиты по орбитальному признаку на 8 классов: I- $\sigma\pi$, II- $\sigma\pi\nu$, III- $\sigma\pi d$, IV- $\sigma\pi d\nu$, V- $\sigma\pi t$, VI- $\sigma\pi t\nu$, VII- $\sigma\pi t l$, VIII- $\sigma\pi t l\nu$ (табл.1). Молекулы этих классов имеют спектры, лежащие в видимой и ультрафиолетовой областях. При поглощении или выделении энергии между невозбужденными и возбужденными состояниями молекулы могут осуществляться электронные переходы. Для каждого класса молекул характерны свои типы переходов (табл.1, столбец "переход"). В табл.1 приведены переходы, лежащие только в видимой и ультрафиолетовой областях. Поэтому для некоторых классов соединений не указаны переходы с участием σ и σ^* -орбиталей.

Природа электронных состояний молекул (табл.1, последний столбец) определяется двумя основными характеристиками: орбитальной природой и мультиплетностью состояний, между которыми осуществляется переход.

Орбитальная классификация молекул, электронных переходов
и состояний

Молекула		Переход	Состояние
Класс	Орбитали		
I	$\sigma\pi$	$\pi \rightarrow \pi^*, \sigma \rightarrow \pi^*$	$S_0, S_{\pi,\pi}^*, T_{\pi,\pi}^*$
II	$\sigma\pi\nu$	$\pi \rightarrow \nu\pi^*$	$S_0, S_{\pi,\nu\pi}^*, T_{\pi,\pi}^*$
III	$\sigma\pi l$	$\pi l \rightarrow \pi^*$	$S_0, S_{\pi l,\pi}^*, T_{\pi l,\pi}^*$
IV	$\sigma\pi l\nu$	$\pi l \rightarrow \nu\pi^*$	$S_0, S_{\pi l,\nu\pi}^*, T_{\pi l,\nu\pi}^*$
V	$\sigma\pi n$	$n \rightarrow \pi^*, \pi \rightarrow \pi^*, \pi \rightarrow \pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\pi}^*, T_{n,\pi}^*, S_{\pi,\pi}^*, T_{\pi,\pi}^*, S_{\pi,\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi,\pi}^*\pi_n^*$
VI	$\sigma\pi n\nu$	$n \rightarrow \nu\pi^*, \pi \rightarrow \nu\pi^*, \pi \rightarrow \nu\pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\nu\pi}^*, T_{n,\nu\pi}^*, S_{\pi,\nu\pi}^*, T_{\pi,\nu\pi}^*, S_{\pi,\nu\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi,\nu\pi}^*\pi_n^*$
VII	$\sigma\pi n l$	$n \rightarrow \pi^*, \pi l \rightarrow \pi^*, \pi l \rightarrow \pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\pi}^*, T_{n,\pi}^*, S_{\pi l,\pi}^*, T_{\pi l,\pi}^*, S_{\pi l,\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi l,\pi}^*\pi_n^*$
VIII	$\sigma\pi n l\nu$	$n \rightarrow \pi^*, \pi l \rightarrow \nu\pi^*, \pi l \rightarrow \nu\pi^*\pi_n^*$	$S_0, S_{n,\nu\pi}^*, T_{n,\nu\pi}^*, S_{\pi l,\nu\pi}^*, T_{\pi l,\nu\pi}^*, S_{\pi l,\nu\pi}^*\pi_n^*, T_{\pi l,\nu\pi}^*\pi_n^*$

Наиболее используемая характеристика электронных состояний молекул - **мультиплетность** $M = 2S + 1$, где S - суммарный спин всех электронов молекулы. Состояния с полным спином $S = 0$ и $M = 1$ называются **синглетными** и обозначаются символом S . Состояния с $S = 1$ и $M = 3$ называются **триплетными** и обозначаются T . Триплетное состояние расположено ниже соответствующего синглетного на величину K_{ij} , где K_{ij} -обменный интеграл для двух электронов, один из которых находится на занятой орбитали i , а другой перешел на вакантную j .

Электронные состояния схематически изображаются уровнями энергии электронных состояний. Общая схема энергетических уровней многоатомных молекул может быть представлена так, как она изображена на рис.11 на примере соединения, принадлежащего V классу (*σππ*). Каждому из электронных уровней приписываются определенная мультиплетность и орбитальная природа. При этом каждому электронному состоянию соответствует набор колебательных подуровней.

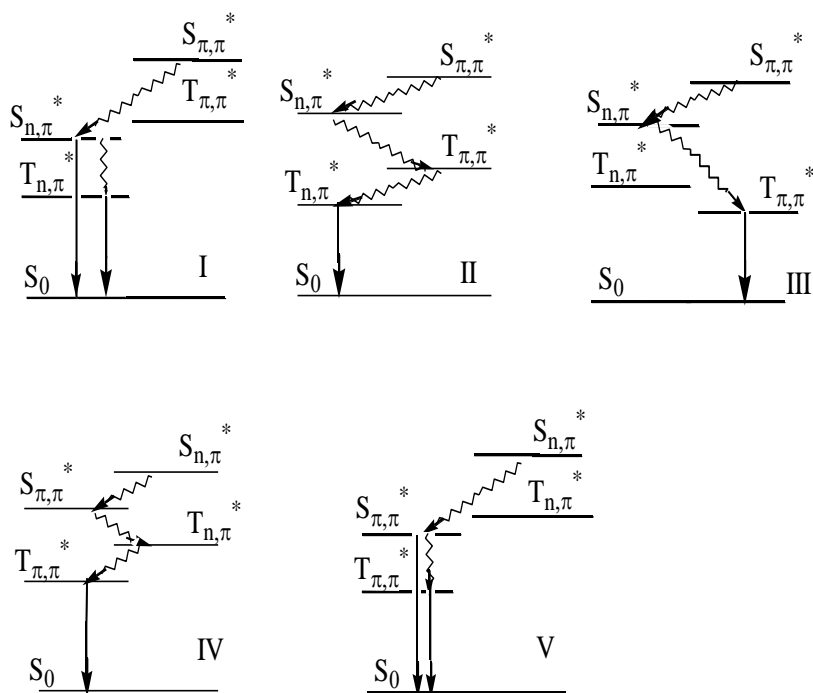


Рис.11. Относительное положение уровней электронно-возбужденных состояний молекул класса *σππ*: волнистые стрелки обозначают безызлучательные переходы, прямые стрелки - излучательные переходы

Электронные состояния, возникающие в результате оптических переходов в видимой и ближней ультрафиолетовой областях, могут интерпретироваться как σ, π^* , π, π^* , n, π^* и т.д. При $\sigma \rightarrow \pi^*$ -переходе образуется σ, π^* -состояние. При этом электрон с невозбужденной связывающей σ -орбитали переходит на возбужденную разрыхляющую π^* -орбиталь ($\sigma_{\text{св}}$ и $\pi_{\text{р}}^*$ -орбитали изображены на рис.7а и рис.7б). При $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходе (и образовании π, π^* -состояния) электрон с π -связывающей орбитали переходит также на разрыхляющую π^* -орбиталь ($\pi_{\text{св}}$ и $\pi_{\text{р}}^*$ -орбитали изображены на рис.7б). При $n \rightarrow \pi^*$ -переходе (с образованием n, π^* -состояния) сначала происходит смещение электронной плотности с несвязывающей n -орбитали гетероатома (например, кислорода) на π -систему молекулы. Карбонильная группа приобретает частичный положительный заряд (рис.12а). Это характерно для синглетного состояния n, π^* -типа. Такие короткоживущие состояния могут быть активны в процессах акцептирования электрона по карбонильным группам, что может являться первичным фотохимическим процессом в фотохимической реакции. Может произойти полный разрыв π -связи в карбонильной группе (рис.12б). При этом электрон неподеленной пары гетероатома с несвязывающей орбитали переходит на разрыхляющую π^* -орбиталь и делокализуется по всей ароматической подсистеме молекулы. Образуется аналог бирадикала, локализованный на карбонильной группе молекулы. Таким образом, можно упрощенно представить триплетное состояние n, π^* -типа. Это состояние активно в реакциях радикального присоединения.

Следует еще отметить, что в ароматических молекулах σ, π^* и n, π^* -возбуждения локализованы на фрагментах (подсистемах) соединения, в то время как π, π^* -возбуждение делокализовано по ароматической подсистеме соединения.

а

б

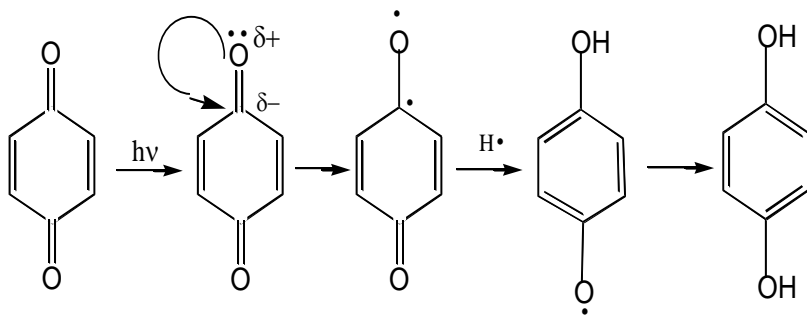


Рис.12. Эволюция n, π^* -состояний (см. объяснение в тексте)

Если происходит смешивание электронных состояний, орбитальная природа результирующих электронных состояний определяется уже вкладом различных конфигураций. Так, состояния $\pi, \nu \pi^*$; $\pi d, \pi^*$; $\pi d, \nu \pi^*$; $\pi, \pi^* \pi_m^*$; $\pi d, \pi^* \pi_n^*$ могут рассматриваться как аналоги $\pi \pi^*$ -состояния, которое по своим свойствам резко отличается от n, π^* -состояний. Смешанный характер всех отмеченных состояний может быть описан на основе принципа суперпозиции как линейная комбинация электронных конфигураций φ_i , возникающих в результате одноэлектронных переходов:

$$\psi = \sum_i c_i \varphi_i ,$$

здесь ψ - волновая функция, c_i - вириальные коэффициенты, т.е. удельные веса соответствующих состояний.

Так, например, можно представить:

$$\begin{aligned}\psi(\pi l, \pi^*) &= c_1 \varphi_1(\pi, \pi^*) + c_2 \varphi_2(l, \pi^*), \\ \psi(\pi, \nu \pi^*) &= c_1 \varphi_1(\pi, \pi^*) + c_2 \varphi_2(\pi, \nu), \\ \psi(\pi l, \nu \pi^*) &= c_1 \varphi_1(\pi, \pi^*) + c_2 \varphi_2(l, \pi^*) + c_3 \varphi_3(\pi, \nu), \\ \psi(\pi, \pi^* \pi_n^*) &= c_1 \varphi_1(\pi, \pi^*) + c_2 \varphi_2(\pi, \pi^* \pi_n^*).\end{aligned}$$

Конфигурации (l, π^*), (π, ν) и (π, π_n^* - переход с π -орбитали углеводородной системы на π_n^* -орбиталь электронно-акцепторной группы $>C=O$ и т.п.) принято называть конфигурациями переноса заряда (ПЗ). Уровни энергии различных состояний определяются экспериментально по спектрам испускания и поглощения, а также могут быть рассчитаны с помощью полуэмпирических квантовомеханических методов.

В простейшем случае, когда рассматривается система двух уровней, квадрат энергии их взаимодействия (возмущения) обратно пропорционален разности энергий этих двух уровней. Это означает, что при прочих равных условиях взаимодействие уровней зависит от их относительного положения. Например, если в системе электронные переходы могут происходить с орбиталей π и l основного состояния на π^* -орбиталь возбужденного состояния ($\pi \rightarrow \pi^*$ и $l \rightarrow \pi^*$ - переходы), то эффективность взаимодействия уровней (π, π^* и l, π^*) будет определяться относительным положением уровней энергии π и l -орбиталей. Например, расчетными методами показано, что вклад l, π^* -конфигурации в волновую функцию нижних возбужденных состояний анилина составляет около 20%. Этот вклад быстро уменьшается с ростом длины цепи π -сопряженных связей молекулы при добавлении ароматических фрагментов. (При этом уменьшается энергия π, π^* -перехода и растет его вклад в низшее возбужденное состояние.)

Рассмотрим спектральные характеристики классов молекул, приведенных в табл.1.

Молекулы класса $\sigma\pi$ характеризуются большой разностью энергий S и T-состояний (величиной S-T-расщепления) - 8000-10000 см^{-1} (обратные сантиметры – единицы измерения энергии, используемые в спектроскопии). Энергия возбужденных состояний этих молекул уменьшается с ростом цепи сопряжения. Большинство из них обладает как флуоресценцией, так и долгоживущей (1-10 с) фосфоресценцией. Колебательная структура спектров определяется в основном колебаниями ароматической системы.

Молекулы $\sigma\pi l$ и $\sigma\pi v$ -классов обладают более длинноволновыми полосами поглощения и люминесценции, чем молекулы предыдущего класса. Величина S - T-расщепления для них несколько понижена (4000-8000 см^{-1}), а выход фосфоресценции повышен по сравнению с молекулами класса $\sigma\pi$. Большинство этих молекул имеет слабозапрещенную колебательную структуру (малоинтенсивные колебательные переходы). Все эти особенности объясняются вкладом $l\pi^*$ - и $v\pi^*$ -конфигураций в возбужденные состояния.

Молекулы класса $\sigma\pi l$ отличаются большим разнообразием свойств, которые обусловлены наличием триплетных n, π^* и π, π^* -состояний и различным их относительным положением. Наиболее отчетливо это видно на примере ароматических карбонильных соединений. Для молекул с энергетической последовательностью состояний $S_0, T_{n,\pi}^*, T_{\pi,\pi}^*, S_{n,\pi}^*, S_{\pi,\pi}^*$ (рис.11, схема II) (например, молекула 9,10-антрахинона) наблюдается только короткоживущая фосфоресценция из триплетного состояния n, π^* -типа. Ее колебательная структура обусловлена колебаниями с характерными частотами колебаний группы $>C=O$ в соответствии с природой низшего триплетного состояния n, π^* -типа. Для молекул с расположением состояний $S_0, T_{\pi,\pi}^*, T_{n,\pi}^*, S_{n,\pi}^*, S_{\pi,\pi}^*$ (рис.11, схема III) (например, молекула 1,4-антрахинона) наблюдается только долгоживущая (0,1 - 1 с) фосфоресценция. В квазилинейчатом спектре (полученном при 77 К в углеводородной матрице) преобладают частоты арома-

тической системы в соответствии с природой низшего триплетного состояния π, π^* -типа. В случае молекул с расположением $S_0, T_{\pi, \pi}^*, T_{n, \pi}^*, S_{\pi, \pi}^*, S_{n, \pi}^*$, (рис.11, схема IV) (например, в случае молекулы мезобензантрона в гексановом растворе) наблюдается также только фосфоресценция из $T_{\pi, \pi}^*$ -состояния. Наконец, для молекул с расположением состояний $S_0, T_{\pi, \pi}^*, S_{\pi, \pi}^*, T_{n, \pi}^*, S_{n, \pi}^*$ (рис.11, схема V) наблюдается как флуоресценция, так и фосфоресценция (пример - бензантрон в этиловом спирте).

Свойства молекул класса $\sigma n \pi$ подобны свойствам молекул класса $\sigma \pi$. Введение в электронную оболочку молекулы l -орбиталей приводит к изменению относительного расположения орбиталей. Например, в ряду ксантон, акридон, ксантион происходит понижение энергии π, π^* -состояний и повышение энергии n, π^* -состояний вплоть до изменения их относительного положения состояний.

1.3.2. Классификация молекул по спектрально-люминесцентным свойствам

Основная закономерность в спектрально-люминесцентных свойствах молекул состоит в следующем: **спектрально-люминесцентные свойства молекул определяются относительным положением низших уровней энергии электронно-возбужденных состояний различной орбитальной природы и мультиплетности**, которое может изменяться под влиянием ряда структурных факторов и межмолекулярного взаимодействия. Из пяти низших электронных состояний $S_0, T_{n\pi}^*, S_{n\pi}^*, T_{\pi\pi}^*, S_{\pi\pi}^*$ можно построить шесть типов их относительного расположения. При построении этих электронных структур необходимо учитывать то, что триплетное состояние расположено ниже соответствующего ему синглетного. Однако экспериментально установлено существование лишь пяти типов относительного расположения n, π^* - и π, π^* -состояний

(рис.11), что связано с зависимостью S-T -расщепления (разностью энергий S и T состояний одной орбитальной природы) от орбитальной природы состояний. Энергия триплетного возбужденного состояния связана с энергией соответствующего синглетного состояния соотношением $E_{T(i-j)} = E_{S(i-j)} - 2A_{ij}$.

Величина синглет-триплетного расщепления ($E_{S(i-j)} - E_{T(i-j)}$) равна удвоенному значению интеграла обменного взаимодействия электронов A_{ij} , находящихся на орбиталях φ_i и φ_j , между которыми происходит электронный переход:

$$A_{ij} = \iint \varphi_i(1)\varphi_j(1) \frac{e^2}{r} \varphi_i(2)\varphi_j(2) d\tau_1 d\tau_2,$$

где φ_i и φ_j - волновые функции орбиталей; r - расстояние между электронами. Интегрирование осуществляется по элементам объема τ , занятого первым (1) и (2) электронами.

Таким образом, величина S-T- расщепления зависит от перекрывания орбиталей φ_i и φ_j . Отсюда следует, что синглет-триплетное расщепление π, π^* -состояний больше, чем n, π^* -состояний, так как n - и π -орбитали в отличие от π и π^* -орбиталей перекрываются незначительно в силу их пространственной ориентации. В среднем S-T-расщепление для n, π^* -состояний колеблется около 2000 - 4000 см^{-1} , а для π, π^* -состояний - 6000-12000 см^{-1} .

Величины S-T-расщепления для состояний $\pi d, \pi^*$; $\pi v, \pi^*$; $\pi d, v\pi^*$ имеют промежуточное значение (по сравнению с n, π^* и π, π^*) и уменьшаются с возрастанием вклада $l\pi^*$ - и πv -конфигураций. Таким образом, величина S-T-расщепления является важной характеристикой орбитальной природы состояний, и по ее значениям можно судить об электронном строении молекул.

Шестой тип (VI) относительного расположения n, π^* - и π, π^* -состояний маловероятен, так как при этом величина S-T-расщепление n, π^* -состояния должна быть несколько больше таковой для π, π^* -состояния.

Молекулы I типа обладают как флуоресценцией, так и короткоживущей фосфоресценцией из n, π^* -состояний; молекулы II типа имеют только короткоживущую фосфоресценцию из триплетного состояния n, π^* -типа; молекулы III и IV типов - только долгоживущую фосфоресценцию из триплетного состояния π, π^* -типа; молекулы V типа обладают как флуоресценцией, так и долгоживущей фосфоресценцией из π, π^* -состояний. Отличие молекул III и IV типов состоит в том, что в молекулах IV типа $S_{n,\pi}^*$ -состояние расположено выше $S_{\pi,\pi}^*$ -состояния и полоса n, π^* -перехода в спектрах поглощения обычно маскируется интенсивной полосой π, π^* -перехода. Некоторые молекулы могут принадлежать к разным спектрально-люминесцентным типам в зависимости от окружения, т.к. межмолекулярные взаимодействия могут изменять энергию уровней в различной степени (в зависимости от их орбитальной природы) и, как следствие этого, изменять относительное положение состояний (инверсия уровней). Так, молекулы IV спектрально-люминесцентного типа при возникновении даже слабой водородной связи могут перейти в V спектрально-люминесцентный тип. Молекулы же III типа могут перейти в V тип (с флуоресценцией) только в случае сильных протонно-донорных растворителей (кислот). Еще следует отметить, что молекулы II, III и IV типов, характеризующихся двумя низшими триплетами, не флуоресцируют.

1.3.3. Особенности синглет-триплетной конверсии между состояниями одинаковой и разной орбитальной природы

Константы скорости излучательных переходов $S \rightarrow S_0$, $T \rightarrow S_0$ связаны с силой осциллятора f соотношением

$$K = cv^2f,$$

где ν - частота соответствующего электронного перехода; $c = 1,5$.

Радиационное время жизни τ_0 связано с константой скорости перехода k выражением $\tau_0 = 1/k$. Величины τ_0 составляет $\sim 10^{-7} - 10^{-8}$ с в случае состояний, формирующихся в результате разрешенных переходов (например, $S_{n,l}^*$ -состояния и соответствующие им синглет-синглетные $\pi \rightarrow \pi^*$ переходы), и возрастают до 10^{-6} с для запрещенных по симметрии переходов. Пример запрещенных по симметрии переходов - синглет-синглетные $n \rightarrow \pi^*$ -переходы. Их сила осциллятора мала и значения радиационных времен жизни $S_{n,l}^*$ -состояний достигают $\sim 10^{-6}$ с.

Электронно-возбужденные состояния являются собственными состояниями не полного гамильтониана ($H = H_0 + \hat{V}$) молекулы, а только гамильтониана адиабатического приближения H_0 , из которого исключен оператор \hat{V} - неадиабатичности и спин-орбитального взаимо-действия. Такие состояния возникают в первый момент после поглощения света или заселения этого состояния каким-либо другим способом. Затем под действием оператора неадиабатичности и спин-орбитального взаимодействия они эволюционируют, чем и определяются основные характеристики спектров люминесценции. Результатом этих взаимодействий являются безызлучательные переходы: между состояниями одинаковой мультиплетности - **внутренняя конверсия** (определяемые оператором неадиабатичности) и разной мультиплетности - **интеркомбинационная конверсия** (определяемые оператором спин-орбитального взаимодействия). Под действием этих операторов происходит также смешивание состояний, что, например, приводит к разрешению запрещенных переходов. Вклад примешиваемых конфигураций обычно очень мал, но эффекты, к которым он приводит, значительны.

Переходы между состояниями различной мультиплетности запрещены (запрет по мультиплетности), но они могут разрешаться вследствие спин-орбитальных взаимодействий, которые представляют собой взаимодействия между спиновым и орбитальным магнитным моментом электрона в электростатическом поле ядра. Благодаря спин-орбитальному взаимодействию возникает сила, стремящаяся изменить направление спинового момента электрона. Вычисление оператора спин-орбитального взаимодействия позволяет оценить взаимодействия между состояниями одинаковой и разной орбитальной природы и объяснить различную природу люминесценции молекул. Интенсивности T-S –переходов определяются величинами сил осцилляторов f "примешивающихся" конфигураций.

Для молекул класса $\sigma\pi$ из нижних $T_{\pi\pi^*}$ -состояний наблюдается длительная фосфоресценция $\tau_0 = 1 - 10$ с при значительной силе осциллятора, определяющей интенсивность фосфоресценции: $f(S_0 \leftarrow S_{\pi,\pi^*}) \approx 0,1 - 1$.

Для молекул класса $\sigma\pi\pi$ радиационные времена жизни τ_0 низших триплетных состояний следующие: для триплетного состояния n, π^* -типа равно $10^{-2} - 10^{-3}$ с, для π, π^* -типа $0,1 - 5$ с. Силы осцилляторов "примешивающихся" синглетных конфигураций $f(S_0 \leftarrow S_{\pi,\pi^*})$, вносящих разрешенность в этот излучательный перенос, равны $0,1 - 0,5$; $f(S_0 \leftarrow S_{n,\pi^*}) = 10^{-2} - 10^{-3}$.

В молекулах классов $\sigma\pi$, $\sigma\pi\pi$, $\sigma\pi\pi l$ и $\sigma\pi\pi\nu$ времена жизни триплетных состояний зависят от порядкового номера элемента, атомы которого участвуют своими l - или ν -орбиталями в формировании электронных состояний. С его возрастанием время жизни триплетного состояния падает. Например, в ряду галоидпроизводных антрахинона при переходе от F к I в качестве заместителя время жизни низшего триплетного состояния π, π^* -типа уменьшается. Кроме того, на величину времени жизни состояния влияет и его орбитальная природа. Так, у некоторых ароматических аминов время жизни фосфоресценции (π, π^* -типа) имеет промежуточное значение между временами

жизни π, π^* - и n, π^* -фосфоресценции углеводов. Таким образом, величина спин-орбитального взаимодействия между состояниями разной орбитальной природы (T_{n,π^*} и S_{π,π^*} или S_{n,π^*} и T_{π,π^*}) более чем на порядок превышает величину спин-орбитального взаимодействия состояний одинаковой орбитальной природы (T_{n,π^*} и S_{n,π^*} или T_{π,π^*} и S_{π,π^*}).

Рассчитанные величины констант S-T (интеркомбинационной) конверсии следующие:

$$K_1 (S_{\pi,\pi^*} \rightarrow T_{\pi,\pi^*} \text{ или } S_{n,\pi^*} \rightarrow T_{n,\pi^*}) \approx 10^6 - 10^8 \text{ с}^{-1},$$

$$K_2 (S_{\pi,\pi^*} \rightarrow T_{n,\pi^*} \text{ или } S_{n,\pi^*} \rightarrow T_{\pi,\pi^*}) \approx 10^{10} - 10^{11} \text{ с}^{-1}.$$

Указанная разница в константах скоростей S-T-конверсии определяется большими различиями величин спин-орбитального взаимодействия соответствующих состояний. Эту разницу можно представить в виде правил отбора для S - T-переходов:

$$\text{разрешенные S - T переходы: } n, \pi^* \longleftrightarrow \pi, \pi^*,$$

$$\text{запрещенные S - T переходы: } n, \pi^* \longleftrightarrow n, \pi^*,$$

$$\pi, \pi^* \longleftrightarrow \pi, \pi^*.$$

То, что S-T-переходы между состояниями разной орбитальной природы разрешены, отмечено первый раз в 1963 г. (эмпирическое правило Эль-Саэда).

Величины констант внутренней конверсии (S - S или T - T - переходы) следующие:

$$K_3 (S_{n,\pi^*} \rightarrow S_{\pi,\pi^*}; S_{\pi,\pi^*} \rightarrow S_{n,\pi^*} \text{ или } T_{n,\pi^*} \rightarrow T_{\pi,\pi^*};$$

$$T_{\pi,\pi^*} \rightarrow T_{n,\pi^*}) \approx 10^{11} \text{ с}^{-1}.$$

Константы скоростей излучательных переходов имеют следующие значения:

$$K_4 (S_{n,\pi^*} \rightarrow S_0) \approx 10^6 \text{ с}^{-1},$$

$$K_5 (S_{\pi,\pi^*} \rightarrow S_0) \approx 10^7 - 10^{10} \text{ с}^{-1},$$

$$K_6 (T_{n,\pi^*} \rightarrow S_0) \approx 10^2 - 10^4 \text{ с}^{-1},$$

$$K_7 (T_{\pi,\pi^*} \rightarrow S_0) \approx 10^{-1} - 10 \text{ с}^{-1}.$$

В соответствии с этими данными на рис.11 и в табл.2 для каждого спектрально-люминесцентного типа молекул указаны волнистой и прямой линиями наиболее вероятные безызлуча-

тельные и излучательные переходы (пути дезактивации возбужденных состояний).

Зная константу скорости K излучательных и безызлучательных переходов, можно посчитать времена жизни τ_0 возбужденных состояний, с которых происходят переходы, зная, что $\tau_0 = 1/K$:

$$\begin{aligned}
 (\tau_0)_1 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^* \text{ или } S_{n,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^*) &\approx 10^{-6} - 10^{-8} \text{ с}, \\
 (\tau_0)_2 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^* \text{ или } S_{n,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^*) &\approx 10^{-10} - 10^{-11} \text{ с}^1, \\
 (\tau_0)_3 (S_{n,\pi}^* \rightarrow S_{\pi,\pi}^*; S_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_{n,\pi}^* \text{ или } T_{n,\pi}^* \rightarrow T_{\pi,\pi}^*; \\
 T_{\pi,\pi}^* \rightarrow T_{n,\pi}^*) &\approx 10^{-11} \text{ с}^1, \\
 (\tau_0)_4 (S_{n,\pi}^* \rightarrow S_0) &\approx 10^{-6} \text{ с}^1, \\
 (\tau_0)_5 (S_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_0) &\approx 10^{-7} - 10^{-10} \text{ с}^1, \\
 (\tau_0)_6 (T_{n,\pi}^* \rightarrow S_0) &\approx 10^{-2} - 10^{-4} \text{ с}^1, \\
 (\tau_0)_7 (T_{\pi,\pi}^* \rightarrow S_0) &\approx 10 - 10^{-1} \text{ с}^1.
 \end{aligned}$$

1.3.4. Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам и ее применение

На основе орбитальной классификации молекул и понятии основных пяти групп молекул (рис.11) профессором Д.Н. Шигориным построена классификация молекул по спектрально-люминесцентным свойствам (табл.2). Классы молекул (горизонтальные ряды) различаются орбитальной природой состояний. Группы молекул (вертикальные столбцы) различаются относительным положением уровней энергии электронных состояний молекул аналогично тому, как мы уже рассматривали на рис.11. Рассмотренный на этом рисунке класс молекул ($\sigma\pi$) приведен в табл.2 как V класс молекул.

Молекулы классов I - $\sigma\pi$, II - $\sigma\pi\nu$; III - $\sigma\pi d$; IV - $\sigma\pi d\nu$ могут принадлежать только V спектрально-люминесцентной группе (пятый столбец в табл.2), т.к. для этих классов не существует возможных вариаций относительного положения уровней. Молекулы классов V - $\sigma\pi\nu$; VI - $\sigma\pi\nu\nu$; VII - $\sigma\pi d\nu$; VIII - $\sigma\pi d\nu\nu$ мо-

гут принадлежать к любой из пяти спектрально-люминесцентных групп (от первого до пятого столбца в табл.2) в соответствии с относительным положением их уровней.

Молекулы, относящиеся к одной спектрально-люминесцентной группе, обладают подобными, но количественно отличающимися свойствами, подобно тому, как изменяются свойства атомов в группах периодической системы Менделеева. Эти различия связаны с отличием свойств π -орбиталей молекулярной системы и l - и ν -орбиталей гетероатомов, вклад которых в возбужденные состояния определяется их положением в периодической таблице Менделеева.

Таким образом, молекулы разных классов, расположенные в одной группе систематики, имеют подобные электронные структуры и сходные спектрально-люминесцентные свойства.

Именно только учет орбитальной природы состояний, связанной прежде всего с изменением природы гетероатома, позволяет объяснить и предсказать количественные изменения спектрально-люминесцентных характеристик (времена жизни, соотношения выходов флуоресценции и флуоресценции, колебательная структура спектров, распределение интенсивностей в полосе поглощения или испускания, поляризация) разных классов молекул. Переход от одного спектрально-люминесцентного класса к другому внутри данного класса молекул (горизонтальные ряды) осуществляется при изменении длины цепи сопряженных связей, последовательности химических связей атомов (групп) и межмолекулярного взаимодействия. Для всех 8 классов молекул возможно существование 24 основных электронных структур, характеризующихся относительным положением нижних уровней энергии электронно-возбужденных состояний различной орбитальной природы и мультиплетности (см. табл.2).

Систематика дает возможность выделить люминесцентные группы молекул, наиболее перспективные для практического применения в качестве люминофоров, красителей, активных

сред. Поскольку такие соединения должны обладать большим выходом флуоресценции, они могут относиться только к V спектрально-люминесцентной группе.

Квантовый выход флуоресценции молекул этой группы максимален для представителей $\sigma\pi$, $\sigma\pi d$, $\sigma\pi dn$ классов и возрастает с ростом длины цепи сопряжения и вклада конфигураций с переносом заряда $l\pi^*$ или $\pi\nu$.

Максимальную возможность управления свойствами можно реализовать в молекулах классов $\sigma\pi dn$ и $\sigma\pi\nu$, обладающих наибольшим выбором орбиталей различной природы. Действительно, важнейшие красители, люминофоры, соединения, используемые в электронике, биологически активные соединения принадлежат к этим классам молекул. Соединения этих классов, принадлежащие V группе, могут являться эмиттерами в биолюминесцентных процессах, которые характеризуются высокими выходами люминесценции при обычных температурах.

Таким образом, классификационным признаком молекул являются квантовомеханические характеристики атомных и молекулярных орбиталей, формирующих внешнюю электронную оболочку молекулы: симметрия; пространственная ориентация; связывающий, несвязывающий или разрыхляющий характер; относительное положение; делокализация или относительная локализация. Свойства этой оболочки полностью определяют все специфические характеристики молекул аналогично тому, как электронная оболочка атома определяет свойства химических элементов. При таком выборе классификационного признака устанавливается непосредственная связь между периодической системой Менделеева и систематикой молекул.

Таблица 2

Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам. Органические молекулы

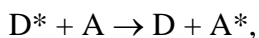
Основные классы		Г р у п п ы				
		I	II	III	IV	V
1	$\sigma\pi$					$S_{\pi,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ S_0
2	$\sigma\pi\nu$					$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ S_0
3	$\sigma\pi l$					$S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ S_0
4	$\sigma\pi l\nu$					$S_{\pi l,\nu\pi}^*$ $T_{\pi l,\nu\pi}^*$ S_0
5	$\sigma\pi n$	$S_{\pi,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ S_0	$S_{\pi,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ S_0	$S_{\pi,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ S_0	$S_{n,\pi}^*$ $S_{\pi,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ S_0	$S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_{\pi,\pi}^*$ $T_{\pi,\pi}^*$ S_0
6	$\sigma\pi n\nu$	$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ S_0	$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ S_0	$S_{\pi,\nu\pi}^*$ $S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ S_0	$S_{n,\nu\pi}^*$ $S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ S_0	$S_{n,\nu\pi}^*$ $T_{n,\nu\pi}^*$ $S_{\pi,\nu\pi}^*$ $T_{\pi,\nu\pi}^*$ S_0
7	$\sigma\pi n l$	$S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ S_0	$S_{\pi l,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ S_0	$S_{\pi l,\pi}^*$ $S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ S_0	$S_{n,\pi}^*$ $S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ S_0	$S_{n,\pi}^*$ $T_{n,\pi}^*$ $S_{\pi l,\pi}^*$ $T_{\pi l,\pi}^*$ S_0

8	σπινν	$S_{\pi l, \nu \pi}^*$ $T_{\pi l, \nu \pi}^*$ $S_{n, \nu \pi}^*$ $T_{n, \nu \pi}^*$ S_0	$S_{\pi l, \nu \pi}^*$ $S_{n, \nu \pi}^*$ $T_{\pi l, \nu \pi}^*$ $T_{n, \nu \pi}^*$ S_0	$S_{\pi l, \nu \pi}^*$ $S_{n, \nu \pi}^*$ $T_{n, \nu \pi}^*$ $T_{\pi l, \nu \pi}^*$ S_0	$S_{n, \nu \pi}^*$ $S_{\pi l, \nu \pi}^*$ $T_{n, \nu \pi}^*$ $T_{\pi l, \nu \pi}^*$ S_0	$S_{n, \nu \pi}^*$ $T_{n, \nu \pi}^*$ $S_{\pi l, \nu \pi}^*$ $T_{\pi l, \nu \pi}^*$ S_0
---	-------	---	---	---	---	---

1.4. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КОНЦЕНТРАЦИОННОГО ТУШЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РАСТВОРАХ

Известно, что с ростом концентрации люминесцирующих веществ или каких-либо примесей в растворах наблюдается уменьшение выхода люминесценции. Это явление называется концентрационным тушением.

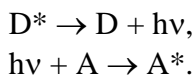
Современная трактовка процессов тушения люминесценции в растворах люминесцентных веществ выделяет в основном три механизма: тривиальная абсорбция, перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму и перенос энергии по обменно-резонансному механизму. Простейшая схема, объединяющая все три механизма, может быть представлена следующим образом:



где D – флуоресцентная молекула, выступающая в данном случае в качестве донора энергии для молекулы акцептора A .

Кратко охарактеризуем каждый из указанных механизмов.

Тривиальная абсорбция (trivial absorption) включает испускание кванта света одной молекулой и поглощение этого кванта другой молекулой. Вторая молекула не влияет на характеристики излучения первой молекулы (например, не изменяет время жизни ее флуоресцентного состояния молекулы донора). Схематически процесс тривиальной абсорбции можно представить как двухстадийный процесс:



Скорость переноса энергии в данном случае зависит от квантового выхода флуоресценции Φ молекулы донора D , концентрации молекул акцептора A , способности абсорбировать свет молекулой A , т.е. от ее коэффициента экстинкции,

перекрывания спектра испускания донора D со спектром поглощения акцептора A. Математически перекрывание спектров характеризуют интегралом перекрывания спектров J:

$$J = \int_0^{\infty} I_D \varepsilon_A d\nu,$$

где I_D - интенсивность испускания донора; ε_A - коэффициент молярной экстинкции акцептора. Обе величины являются функцией энергии, выраженной в обратных сантиметрах (ν , см^{-1}), и нормированы таким образом, что полное перекрытие соответствовало бы $J=1$.

Чем больше величина указанных четырех характеристик, тем эффективнее тривиальная абсорбция.

Индуктивно-резонансный перенос энергии (другие названия – дипольные взаимодействия, Coulombic interaction) представляет собой «действие на расстоянии». Взаимодействие происходит через электромагнитное поле и не требует физического контакта взаимодействующих частиц. Процесс включает индуцирование дипольных осцилляций в молекуле A молекулой D*. Экспериментально этот механизм можно отличить от тривиальной абсорбции по уменьшению времени жизни флуоресценции молекулы донора D в присутствии молекулы акцептора A.

Теория концентрационного тушения в результате индуктивно-резонансного переноса энергии в России была разработана С.И. Вавиловым. Теорию Вавилова развил Левшин. Он показал, что в большинстве случаев концентрационное тушение обусловлено переносом энергии от возбужденных молекул к нелюминесцирующим (или люминесцирующим в другой области спектра) димерам. Позднее было установлено, что тушение люминесценции поглощающими веществами связано с перекрытиями спектров испускания донора и поглощения ак-

цептора. Было установлено, что при наличии процессов тушения уменьшается время жизни возбужденного состояния.

В теории концентрационного тушения Вавилова уравнение, связывающее тушение люминесценции с различными физико-химическими факторами, имеет вид

$$\frac{I_0}{I} = e^{wN_A C} (1 + 4\pi\sigma W\tau_0 DN_A C)\delta.$$

Здесь I_0 - выход люминесценции в отсутствии тушителя; I - в присутствии тушителя; $\frac{I_0}{I}$ - относительный выход люминесценции; w - объем сферы действия возбужденной молекулы за вычетом ее кинетического объема; N_A - число Авогадро; W - вероятность тушения при столкновении частиц тушителя и люминофора; τ_0 - длительность возбужденного состояния при отсутствии тушителя; D - коэффициент диффузии, σ - радиус действия возбужденной молекулы; C - концентрация тушителя; δ - поправочный множитель.

Удовлетворительная теория переноса энергии в конденсированной среде была развита Ферстером. В ней предполагалось, что перенос энергии происходит благодаря слабому диполь-дипольному взаимодействию между молекулами донора и акцептора, не изменяющему первоначальные оптические спектры молекул. Предполагалось также, что время жизни возбуждения в акцепторе меньше, чем время обратного переноса. В результате переноса энергии может наблюдаться либо сенсбилизация (увеличение выхода), либо тушение люминесценции.

Для пояснения эффекта диполь-дипольного переноса энергии обычно пользуются моделью колебаний двух гармонических осцилляторов (например, связанных маятников) с одинаковыми собственными частотами. Если в начальный момент времени колеблется только один осциллятор, то в даль-

нейшем происходит перекачка энергии в другой осциллятор, и осцилляторы обмениваются энергией, пока колебания не затухнут. Экспериментальные значения расстояния индуктивно-резонансного переноса достигают 5 нм.

В теории Ферстера-Галанина относительный выход флуоресценции ($\frac{I}{I_0}$) описывается формулой

$$\frac{I}{I_0} = 1 - \sqrt{\pi} b \exp(b^2) \left(1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^b \exp(-x^2) dx\right),$$

где $b = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{C_A}{C_0}$; $C_0 = \frac{4}{3\pi} R_0$; C_A – концентрация флуоресцентных молекул; C_0 – критическая концентрация переноса, характерная для данной пары донора и акцептора, при которой вероятность флуоресценции равна вероятности переноса; R_0 – ферстеровский радиус.

Обычно концентрации, при которых потушена половина молекул, при различных условиях составляют 10^{-2} - 10^{-3} моль/л, что связано с характеристическими радиусами $R_0 = 2-6$ нм.

Константа скорости переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму $k_{(инд-рез)}$ определяется следующим выражением:

$$k_{(инд-рез)} = k \frac{\kappa^2 k_D^o}{R_{DA}^6} J(\epsilon_A).$$

Константа k в данном выражении определяется условиями эксперимента, такими как коэффициент преломления среды и концентрация. Величина κ^2 учитывает тот факт, что взаимодействие между двумя диполями зависит от их ориентации в пространстве. Для случайного распределения взаимодействующих диполей κ^2 является константой, равной $2/3$. Член $J(\epsilon_A)$ бли-

зок интегралу перекрытия спектров J с тем лишь отличием, что включает коэффициент экстинкции акцептора ϵ_A .

В ряде случаев перенос энергии определяется не диполь-дипольным, а **обменно-резонансным механизмом** (Collision mechanism, т.е. осуществляющийся в результате столкновений). Например, перенос с участием триплетных состояний происходит по обменному механизму.

В случае обменных взаимодействий предполагается, что электронные облака донора и акцептора энергии значительно перекрываются в пространстве. В области перекрытия может происходить обмен электронами. Эффективность переноса определяется перекрытием волновых функций и экспоненциально зависит от расстояния между молекулами, т.к. электронная плотность обычно уменьшается экспоненциально с ростом расстояния от ядра атома. Теория переноса энергии в результате обменно-резонансного взаимодействия была разработана Д.Л. Декстером, который предложил выражение для константы скорости переноса энергии:

$$k_{(\text{обмена})} = KJ \exp(-2R_{DA} / L),$$

где константа K определяется спецификой орбитальных взаимодействий, т.е. зависит от природы взаимодействующих частиц; J – интеграл спектрального перекрытия, нормированный на коэффициент экстинкции акцептора ϵ_A ; R_{DA} – расстояние между донором и акцептором, которое нормируется на их Ван-дер-Ваальсовские радиусы L . Важно отметить, что величина J , нормированная на экстинкцию ϵ_A , не зависит от величины этой экстинкции, т.е. $k_{(\text{обмена})}$ не должна зависеть от поглощения акцептора. Этот факт отличает константу скорости переноса энергии по обменному механизму от аналогичной константы для индуктивно-резонансного (дипольного) переноса ($k_{(\text{инд-рез})}$).

Отличие выражений для констант скорости индуктивно-резонансного и обменного переноса энергии ($k_{(\text{обмена})}$ и $k_{(\text{инд-рез})}$) определяет следующие дополнительные различия указанных механизмов переноса.

1. Скорость индуктивно-резонансного переноса энергии уменьшается в зависимости от R^{-6} , в то время как скорость обменного переноса уменьшается по экспоненте в зависимости от $\exp(-2R/L)$. Это означает, что $k_{(\text{обмена})}$ делается пренебрежимо малым с ростом R до величин, более чем на порядок превышающих один или два диаметра молекул ($5-10 \text{ \AA}$).

2. Скорость индуктивно-резонансного переноса энергии зависит от силы осциллятора излучательных переходов $D^* \rightarrow D$ и $A \rightarrow A^*$. Скорость обменно-резонансного переноса энергии не зависит от силы осциллятора этих переходов.

3. Эффективность переноса энергии для индуктивно-резонансного механизма ($k_{(\text{инд-рез})}/k_D$), где k_D – константа скорости излучательного перехода донора) зависит от силы осциллятора перехода $A \rightarrow A^*$ и от квантового выхода флуоресценции донора Φ_D . Эффективность переноса энергии для обменно-резонансного механизма ($k_{(\text{обмена})}/k_D$) не связана непосредственно с экспериментально измеряемыми характеристиками.

Основные закономерности, определяющие внутримолекулярный безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения по уровням электронно-возбужденных состояний, являются справедливыми также и для межмолекулярного безызлучательного переноса электронного возбуждения, совершаемого по обменно-резонансному механизму. В этом случае молекулы донора (Д) и акцептора (А) следует рассматривать как единую систему, состоящую из двух подсистем, связанных между собой более слабой связью, чем отдельные их фрагменты. В системе Д + А существуют два конкурирующих канала

переноса энергии электронного возбуждения - внутри- и межмолекулярный.

Такой подход является более общим и позволяет установить связь между внутри- и межмолекулярным безызлучательными процессами переноса энергии электронного возбуждения, которые необходимо рассматривать с единой точки зрения, а именно на основе принципа относительного расположения уровней энергии электронно-возбужденных состояний разной орбитальной природы и мультиплетности.

Еще сложнее обстоит дело с тушением хемилюминесценции и биолюминесценции. Отсутствуют теоретические модели, пригодные для обработки результатов. Применение теории, разработанной для фотолюминесценции, осложняется наличием химического возбуждения.

Ингибирование хемилюминесценции и биолюминесценции может осуществляться на стадиях, предшествующих образованию электронно-возбужденных состояний. Для биолюминесценции это может быть процесс связывания посторонних соединений с активными группами фермента или взаимодействие с субстратами реакции.

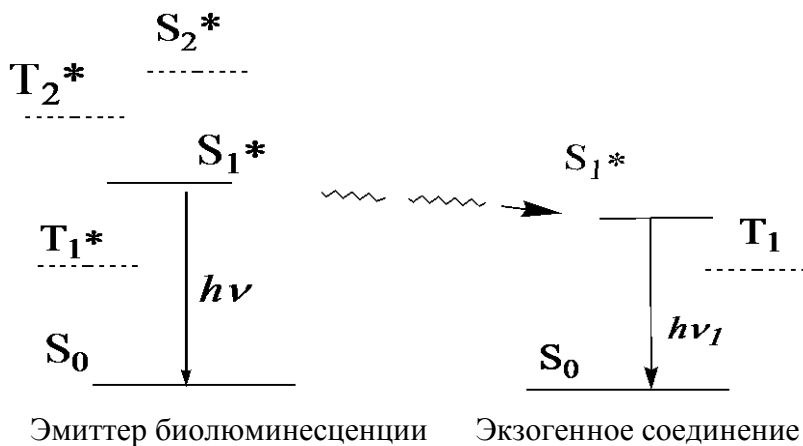


Рис.13. Перенос энергии с электронно-возбужденных состояний билюминесценции

Вместе с тем для хеми- и билюминесценции в присутствии экзогенных соединений, как и для фотолуминесценции, характерны как тривиальная абсорбция, так и тушение в результате межмолекулярного переноса энергии. На рис.13 схематически изображены электронно-возбужденные состояния эмиттера билюминесценции и соединений в реакционной смеси (этими соединениями могут являться как посторонние молекулы, так и подходящие для этого субстраты реакции) и перенос энергии между этими структурами.

Если в билюминесцентном процессе заселяются и высшие электронно-возбужденные состояния эмиттера (на рис.13 изображены второе синглетное и триплетное состояния), они также могут являться донорами энергии возбуждения. В этом случае в результате межмолекулярного переноса энергии могут заселяться возбужденные состояния соединений большей энергии.

С ростом концентрации молекул все большую роль в уменьшении выхода люминесценции начинает играть образование ассоциатов. Это в первую очередь нелюминесцентные ассоциаты с участием эмиттера билюминесценции. Образование ассоциатов можно рассматривать как образование нестойких соединений. При этом происходит перераспределение электронной плотности между двумя исходными соединениями и связанное с этим расщепление уровней взаимодействующих состояний, нижний из которых чаще всего нелюминесцентный.

1.5. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Хемилюминесценция - свечение, возникающее за счет энергии химических реакций. Хемилюминесценция испускает-

ся продуктами реакций либо другими компонентами, акцептирующими энергию от продуктов.

В газах хемилюминесценция чаще всего наблюдается в экзотермических реакциях с участием свободных радикалов, например:



Примеры хемилюминесценции в растворах - перегруппировки изомеров производных бензола, разложения пероксидов. При этом должна заселяться разрыхляющая (возбужденная) π^* -орбиталь.

Интенсивность хемилюминесценции пропорциональна квантовому выходу хемилюминесценции и скорости химической реакции. **Квантовый выход хемилюминесценции** - число испущенных квантов на один акт реакции. Скорость химической реакции v при малых концентрациях исходных веществ (как и в случае обычной, нелюминесцентной реакции) определяется законом действия масс, т.е. пропорциональна концентрациям реагирующих веществ (C) в степенях их стехиометрических коэффициентов:

$$v = k C^a C^b$$

для реакции между веществами А и В, записанной в общем виде: $aA + bB \rightarrow \text{продукты}$. Здесь k - константа скорости реакции, зависящая от условий проведения процесса (температура, катализатор и т.д.).

На рис.14 изображена схема движения системы по координате реакции в хемилюминесцентном процессе для экзотермической ($\Delta H < 0$) и эндотермической ($\Delta H > 0$) реакции.

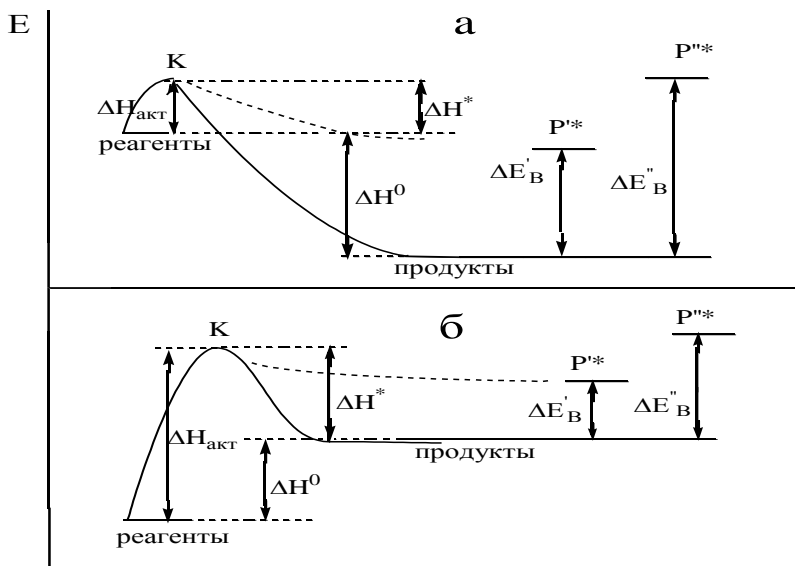


Рис.14. Энергетический профиль экзотермической (а) и эндотермической (б) хемилюминесцентной реакции

В реакции образуется возбужденное состояние продукта P' , но не P''

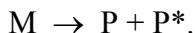
Образование возбужденных продуктов, не противоречащее закону сохранения энергии, возможно при выполнении условия энергетической достаточности $\Delta H_{\text{акт}} - \Delta H \geq E_B$, где $\Delta H_{\text{акт}}$ - энтальпия активации; ΔH - энтальпия реакции; E_B - энергия возбужденного состояния продукта реакции. Для осуществления эндотермической хемилюми-несцентной реакции ($\Delta H > 0$) необходим подвод энергии извне.

Выделяют три главных этапа хемилюминесцентной реакции:

Подготовительный этап - химическое превращение исходных реагентов, ведущее к ключевой стадии: образование ключевого интермедиата реакции M - непосредственного предшественника возбужденного продукта:



Ключевая стадия - элементарный акт возбуждения. На этом этапе М превращается в следующий продукт реакции - Р, часть которого образуется в возбужденном состоянии:



Испускание кванта света



и различные процессы безызлучательной дезактивации эмиттера хемилюминесценции Р. Этот этап включает процессы, хорошо изученные в фотолюминесценции, и может быть назван "физическим этапом". Он характеризуется такими величинами, как время жизни эмиттера τ_0 и квантовый выход люминесценции эмиттера Φ (отношение числа испущенных квантов к числу возбужденных молекул продукта реакции).

Образовавшаяся на 2-й стадии возбужденная молекула эмиттера не всегда дезактивируется испусканием кванта света. Квантовый выход люминесценции Φ многих возбужденных продуктов бывает низким. Например, для фосфоресценции из триплетного n, π^* -состояния большинства карбонильных соединений Φ не превышает 10^{-4} - 10^{-5} . Поэтому для усиления интенсивности хемилюминесценции часто используют метод сенсбилизации свечения. Сущность этого метода заключается в использовании явления безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения, хорошо изученного в фотолюминесценции. Энергия возбужденной в реакции частицы P^* (донора) передается введенному в раствор акцептору энергии А (активатору, вторичному эмиттеру). В качестве акцепторов выбираются хорошо люминесцирующие соединения, принадлежащие V спектрально-люминесцентной группе (табл.2).

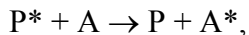
В зависимости от того, присутствуют или нет в реакционной смеси активаторы свечения, хемилюминесценция называется активированной или неактивированной. В иностранной литературе используются, соответственно, термины "непрямая" и "прямая" хемилюминесценция. Основное требование к активатору хемилюминесценции заключается в том, чтобы кинети-

ка реакции была одинаковой в присутствии и отсутствии активатора, т. е. чтобы активатор принимал участие только в третьей стадии (физической) хемилюминесцентной реакции.

Неактивированная (прямая) хемилюминесценция:



Активированная (непрямая) хемилюминесценция:



Наибольший интерес представляет вторая стадия хемилюминесценции. Выявлены некоторые общие критерии для органических реакций, которые должны благоприятствовать возбуждению. *Первый из них* - критерий энергетической достаточности, являющийся условием, необходимым, но недостаточным для возбуждения. Это условие указывает на большую вероятность образования возбужденных продуктов именно в экзотермических реакциях, для которых характерны высокие отрицательные значения энтальпии активации (ΔH). Реагентами в таких реакциях служат вещества с высокой энтальпией образования, а продуктами, напротив, с низкой энтальпией, преимущественно устойчивые молекулы (разность этих энтальпий и равна ΔH).

Однако многие экзотермические реакции при выполнении первого критерия не являются хемилюминесцентными. *Второй критерий*, благоприятствующий возбуждению, - требование сближения поверхности потенциальной энергии реагентов реакции с поверхностью потенциальной энергии возбужденного состояния одного из продуктов реакции при движении по координате реакции. При этом возможен переход системы с поверхности основного состояния на возбужденную. Для простейшего случая столкновения двух атомов, при котором координата реакции представляет собой расстояние между атомами, а поверхность потенциальной энергии сводится к кривой потенциальной энергии, данный переход изображен на рис.14.

Третий критерий - структурное подобие или близость строения активированного комплекса (промежуточная структура в химической реакции, соответствующая точке К на рис.14) и возбужденного состояния продукта реакции. Данный критерий хорошо выполняется для хемилюминесцентных реакций с переносом электрона, например, между катион- и анион-радикалами ароматических люминофоров. В этих реакциях вообще не разрываются и не образуются новые химические связи, т.е. перестройка ядерных конфигураций исключена.

К настоящему времени для большинства хемилюминесцентных реакций окисления установлено, что ключевой стадией является распад промежуточных пероксидных соединений. Наиболее изученной реакцией является жидкофазное окисление углеводородов кислородом, механизм которой изучен в работах Васильева.

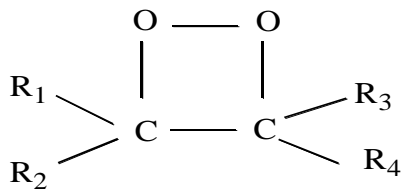
Окисление предельных углеводородов (алканов) RH идет по механизму цепной реакции и приводит к образованию гидропероксидных радикалов ROO·, рекомбинация которых ведет к образованию промежуточного продукта - тетраоксида ROOOOR. Тетраоксид, распадаясь, приводит к образованию возбужденных карбонильных соединений (в ряде случаев нельзя исключать вероятность образования синглетного кислорода). На примере распада ряда тетраоксидов показано, что выход возбужденных триплетов на порядки превышает выходы возбужденных синглетов.

Таким образом, распад нециклических пероксидов обычно связывают с тетраоксидной хемилюминесценцией и гомолитическим разрывом связей.

Образование электронно-возбужденных состояний в ряде случаев может осуществляться в результате переноса электрона между анион- и катион-радикалами. Перенос электрона происходит только при условии изоэнергетичности уровней электрона в анион-радикале и образующейся нейтральной возбужденной молекуле. При этом сольватная (или гидратная) "шуба" электрона понижает его энергию. Если нет изоэнерге-

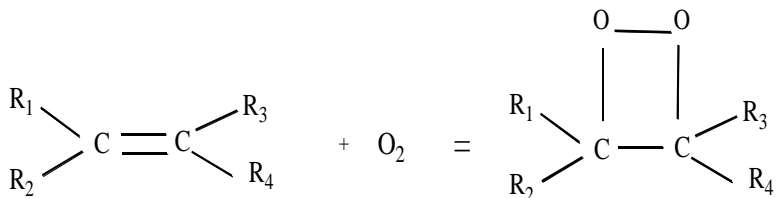
тичности, то избыток энергии должен перейти в энергию колебаний ядер (период колебаний 10^{-13} - 10^{-12} с), "раскачать" которые за время переноса электрона (10^{-16} с) невозможно, поэтому переноса не произойдет. Вследствие изоэнергетичности электронных переходов может происходить акцептирование электрона как с возбужденного π^* , так и с невозбужденного π уровней. Соответственно электрон передается на свободную возбужденную π^* или невозбужденную π орбиталь образующейся нейтральной молекулы. Поэтому в реакции возможно образование возбужденных молекул как донора электрона, так и акцептора электрона.

Самое изученное химическое превращение, в котором возникают возбужденные молекулы, - разложение диоксетанов. К диоксетанам относятся пероксидные соединения, содержащие четырехчленный гетероцикл:



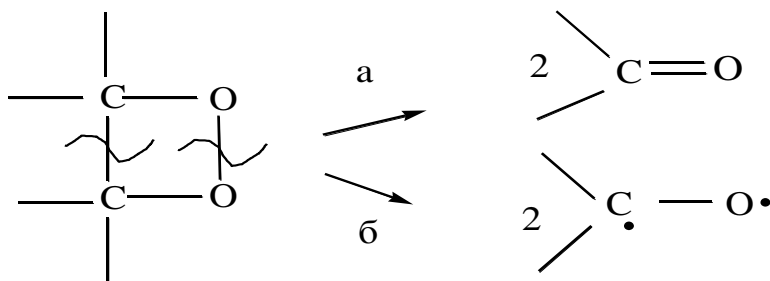
Диоксетаны могут образовываться в результате окисления непредельных органических соединений кислородом воздуха:

Схема 1:



Распад диоксетанов приводит к образованию двух молекул кетона. Причем существует вероятность образования как невозбужденной (путь а, схема 2), так и возбужденной (путь б) молекулы кетона с локализацией возбуждения на карбонильной группе (n, π^* -возбуждение).

Схема 2:



В случае (а) при гомолитическом разрыве O - O и C - C связей замыкается π -связь между углеродом и кислородом. Электрон занимает связывающую π -орбиталь молекулы и участвует в π -делокализации по ароматическим фрагментам, если для этой молекулы возможно такое сопряжение. В случае (б) при разрыве этих же связей один из электронов занимает несвязывающую n -орбиталь, а другой делокализуется по возбужденной (разрыхляющей) π^* -орбитали ароматического фрагмента молекулы. Образующаяся структура аналогична триплетной форме n, π^* -состояния, приведенной на рис.12б. По данным профессора Васильева, в ряде экспериментов по разложению диоксетанов выход триплетных состояний в 3 раза превышал выход синглетных состояний.

Возбуждению должна способствовать жесткость образующейся возбужденной молекулы, которая способствует перекрыванию орбиталей.

Будем считать, что при разложении диоксетана образуется ароматический кетон, принадлежащий классу $\sigma\pi$ (табл.2). Если относительное положение уровней кетона соответствует I или II спектрально-люминесцентной группе (табл.2), характеризующейся низшим n, π^* -состоянием, то можно наблюдать либо слабую n, π^* -флуоресценцию, либо при низких температурах n, π^* -фосфоресценцию дополнительно. Если относительное положение уровней кетона соответствует III, IV или V спектрально-люми-несцентной группе (табл.2), характеризующейся низшим n, π^* -состоянием, то за образованием n, π^* -состояния (триплетного или синглетного) следует сначала безызлучательная конверсия возбуждения в низшее триплетное состояние π, π^* -типа.

В ряде случаев активации хемилюминесценции молекулы активаторов не являются простыми акцепторами энергии возбуждения. Они образуют комплекс с переносом заряда с интермедиатом хемилюминесцентной реакции.

Мак-Капра предложил схему с образованием анион-катионной пары, аннигиляция которой приводит к образованию возбужденной молекулы активатора. На схеме 3 этот процесс рассмотрен на примере дифеноилпероксида (ДП), как он был подробно исследован Шустером и Ку.

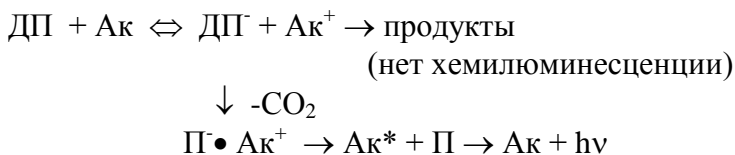
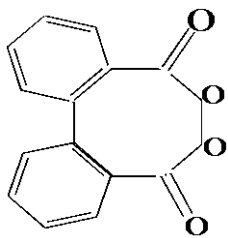
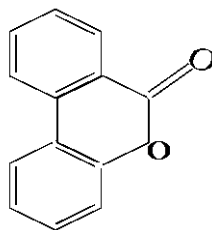


Схема 3:



Дифеноилпероксид (ДП)



Пероксид (П)

При встрече пероксида с активатором - донором электрона образуется ион-радикальная пара (схема 3). Электрон, который перешел от активатора на ближайшую по энергии вакантную разрыхляющую $\sigma_{0.0}$ -орбиталь пероксида, ведет к образованию неустойчивого состояния анион-радикала, который легко распадается на CO_2 и органический анион-радикал. Последний, являясь сильным донором электрона, возвращает электрон катион-радикалу активатора, не успевшему покинуть клетку растворителя. В этом сильно экзотермическом процессе обратного переноса электрона с большой вероятностью образуется возбужденное состояние.

Подобный тип возбуждения, когда ион-радикалы получают в растворе химическим путем, назвали "химически иницированной электронно-обменной люминесценцией" (ХИЭОЛ).

Жизнедеятельность организмов всегда сопровождается слабой и сверхслабой хемилюминесценцией. Это объясняется тем, что процессы окисления органических соединений, которые являются химической основой дыхания живых систем, связаны с образованием электронно-возбужденных состояний (например, согласно схеме 2, путь б). И в подавляющем большинстве случаев за образованием возбужденных состояний следует безызлучательная конверсия возбуждения по колебательным степеням свободы. Лишь в редких случаях - при биолюминесценции - выход свечения достаточно высок. Например, для светляков он приближается к 1.

Биолюминесценция - частный случай хемилюминесценции, катализируемой биологическими катализаторами - ферментами, представляет собой свечение некоторых живых организмов (морские бактерии, светляки, специализированные органы глубоководных рыб). В последнее время часто используют выделенные биолюминесцентные системы *in vitro* ("в пробирке", лат.). Обычно это одна люминесцентная реакция или система реакций, катализируемых ферментами. Ферменты

биоломинесцентных реакций называются люциферазами ("люцифер" в переводе с латинского означает неживой свет). Люциферазы катализируют реакцию (обычно это реакция окисления), завершающуюся образованием электронно-возбужденных состояний и испусканием кванта света.

Эмиттер биоломинесценции (молекула продукта, ответственная за люминесценцию) характеризуется эффективной люминесценцией в водной среде при комнатной температуре. Эта люминесценция наверняка не является фосфоресценцией, т.к. при комнатных температурах в жидких растворах долгоживущие низшие триплетные состояния тушатся в результате колебательных взаимодействий с молекулами растворителя. В этих условиях возможно лишь короткоживущая люминесценция. Согласно приведенным в предыдущей главе данным, малые величины времени жизни излучательных состояний τ_0 относятся к переходам $S_{\pi,\pi^*} - S_0$ ($\tau_0 \approx 10^{-7} - 10^{-10}$ с). Следовательно, биоломинесценция - это π, π^* (либо $\pi d, \pi^*$) – флуоресценция; а молекула эмиттера должна принадлежать V спектрально-люминесцентной группе (см.табл.2).

Так как молекула эмиттера биоломинесценции обычно включает карбонильные группы (а если биоломинесцентная реакция – реакция окисления, то эмиттер должен включать карбонильные группы) и какие-либо гетероатомы (например, азот), то она должна принадлежать к *amI* (7) –классу, V группе (см.табл.2). Это тип молекулы, характеризующийся низшими состояниями n, π^* -типа (триплетными и синглетными), низшими состояниями $\pi d, \pi^*$ -типа и эффективной $\pi d, \pi^*$ -флуоресценцией.

Примеры молекул эмиттеров приведены на рис.15.

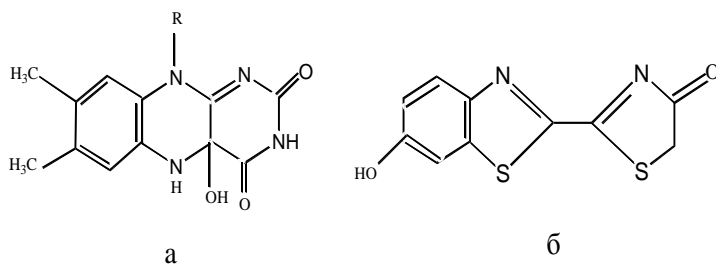


Рис 15. Эмиттер бактериальной (а) и светляковой (б) биолюминесценции

Возможно, что при биолюминесценции, как и в случае рассмотренной выше хемилюминесценции диоксетанов, при окислении органических непредельных соединений образуются карбонильные группы с локализованным на них n, π^* -возбуждением. Но поскольку для данного типа молекул n, π^* -состояния не являются низшими, за его формированием следует деградация возбуждения в низшие возбужденные состояния. Для этого типа молекул миграция возбуждения $T_{n\pi^*} \rightarrow S_{\pi, \pi^*}$ является разрешенным процессом (правило Эль-Саеда). Константы этого перехода велики ($10^{10} - 10^{11} \text{c}^{-1}$). В данном случае мы предполагаем, что n, π^* -состояния — это аналоги π, π^* -состояний.

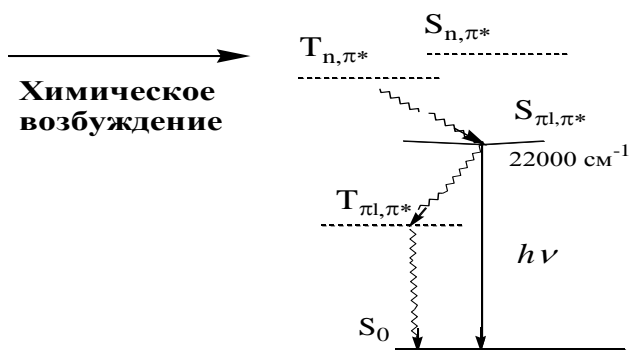


Рис.16. Электронно-возбужденные состояния эмиттера бактериальной биолюминесценции

Далее при обычных температурах наблюдается π, π^* - флуоресценция. (По некоторым данным, выход фосфоресценции при фотовозбуждении при 77 К молекул флавинов, один из которых предполагается эмиттером бактериальной биолуминесценции, составляет доли процента).

Схема описанного процесса на примере бактериальной биолуминесценции представлена на рис.16.

Посторонние соединения, которые присутствуют в биолуминесцентной системе, могут воздействовать на интенсивность биолуминесценции в результате резонансных процессов переноса с участием электронно-возбужденных состояний биолуминесцентного эмиттера в качестве донора и электронно-возбужденных состояний этих соединений в качестве акцептора энергии. Причем донором энергии могут служить не только низшие, но и высшие электронно-возбужденные состояния эмиттера. При этом у высших возбужденных состояний молекулы эмиттера существуют два конкурирующих канала сброса энергии - внутримолекулярный с последующей люминесценцией и межмолекулярный на посторонние соединения. Если эти соединения характеризуются энергией возбужденного синглетного состояния меньшей, чем энергия S_{π, π^*} -состояния эмиттера биолуминесценции, и к тому же способны флуоресцировать (например, красители, принадлежащие V спектрально-люминесцентной группе, табл. 2), то можно наблюдать сенсбилизированную (в результате межмолекулярного переноса энергии) флуоресценцию этих красителей. Если эти соединения не флуоресцируют (II-IV спектрально-люминесцентные группы), то межмолекулярный перенос энергии ведет только к уменьшению выхода биолуминесценции.

ГЛАВА 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВ В БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СИСТЕМАХ КАК ОСНОВА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

2.1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ В БИОТЕСТИРОВАНИИ

В окружающем нас мире находится огромное количество веществ, токсичных для живого. Современный человек сталкивается с токсичными веществами в среде своего обитания (почва, воздух, природные водоемы), в условиях производства (газовые выбросы и сточные воды предприятий), при питании (пищевые продукты и питьевая вода). Даже его внутренняя среда становится для него токсичной при заболеваниях. Поэтому крайне важным является поиск аналитических систем для экспрессной оценки токсичности, а значит, и контроля состояния биологической системы разного уровня сложности (от экосистемы до отдельного организма).

В настоящее время для решения проблем анализа токсичности сред сложного состава привлекаются в основном два подхода, каждый из которых имеет свои особенности, область использования, достоинства и недостатки.

Первый подход - оценка токсичности по данным химического анализа компонентов среды. Основным критерием токсичности является превышение содержания токсикантов по сравнению с их ПДК. Эти методы отличаются исключительной избирательностью и точностью, т. к. выполняются с использованием химических реагентов. Однако они не предназначены для экспрессной оценки качества среды и определения токсичности ее для живых организмов по следующим причинам. В настоящее время в хозяйстве используют более 2 млн токсичных веществ. Химический анализ этих веществ длителен, и реально лучшие из санитарно-эпидемиологических служб проводят анализ только по 20-50 веществам. При этом анали-

зируются смеси с постоянно меняющимся составом и количеством компонентов и практически не учитывается комбинированное действие веществ в смеси. Для оценки состояния среды по большому числу анализируемых параметров требуется привлечение ЭВМ, что значительно усложняет и удлинняет анализ. И даже в этом случае часто трудно определить, будет ли токсичной эта среда для живого организма.

Другой подход, называемый биотестированием, состоит в определении токсичности среды непосредственно при действии ее на живой организм. В биотестах контролируется влияние токсичности среды на различные параметры жизнедеятельности (летальный исход, скорость роста, интенсивность дыхания или другие метаболические процессы) таких организмов, как кролики, мыши, крысы, морские свинки, простейшие животные и растения - парameции, одноклеточные водоросли, бактерии и др. При этом сразу определяется интегральное влияние среды на живой организм.

Однако и тут существуют проблемы. Достижение экспрессности метода связано с уменьшением точности измерений, так как измеряемые параметры жизнедеятельности зависят от индивидуальных характеристик организма. Другая проблема связана с интерпретацией результатов биотестов, указывающих лишь на токсичность данной среды для тест-объекта. Совершенно ясно, что «норма» для того или иного организма при определенных обстоятельствах может оказаться неприемлемой для нормативов, необходимых человеку. Кроме того, несмотря на большое число имеющихся в настоящее время биотестов, для оценки качества природных вод разные исследователи применяют один тест, редко два. Понятно, что создание экспертной системы биотестов позволило бы увеличить достоверность оценок в определении влияния изучаемой среды на человека. Опыт работы с биолюминесцентными методами позволяет предположить возможность создания такой системы ферментативных тестов в рамках биолюминесцентного анализа.

Билюминесценция используется в экологии в основном в рамках биотестирования. Исторически первыми в экологическом мониторинге были использованы светящиеся бактерии. Появилась возможность создания реактива для биотеста на основе лиофильно высушенных светящихся бактерий, оживление которых происходит непосредственно перед измерениями. Модификации этого биотеста разработаны фирмой "Beckman" (США) и Институтом биофизики СО РАН. В 1989 г. был предложен новый подход к разработке биотестов, сочетающий в себе получение интегральных характеристик среды и высокую точность и чувствительность. Этот подход состоял в использовании вместо живых организмов ферментативных систем, ответственных за какой-либо параметр жизнедеятельности организма. В данном случае возможно создание реагента для анализа, обеспечивающего его точность и валидность.

В основе использования билюминесценции в экологии лежат взаимодействия ксенобиотиков-поллютантов с компонентами билюминесцентных систем. Для того чтобы иметь возможность интерпретировать и предсказывать результаты билюминесцентного анализа, необходимы исследования с использованием модельных поллютантов для установления связи "Структура вещества - физико-химические свойства – механизмы влияния на биологические системы – биологический эффект – биотестирование".

Сравнение действия большого числа разнообразных веществ-загрязнителей на билюминесценцию *in vivo* и *in vitro* показало существование зависимости между степенью токсичности измеряемых систем и изменением параметров свечения обеих систем. При этом чувствительность систем *in vitro* по некоторым группам токсикантов выше в 100-1000 раз, возможно вследствие отсутствия помех от клеточной мембраны бактерий.

Благодаря своей высокой чувствительности и экспрессности билюминесцентные биотесты чрезвычайно перспективны для тестирования "острой токсичности" и для оценки токсич-

ности сред сложного состава, целых организмов и биоценозов по одному параметру - биолюминесценции.

Значение биотестов увеличивается при использовании их в комплексе с химическими методами. С помощью биологических тестов проводят скрининг токсичности среды и дают рекомендации о необходимости химического анализа для определения основных загрязнителей и необходимости принятия мер очистки от них среды.

Создание направления биолюминесцентного биотестирования стало возможным, прежде всего, благодаря исключительной чувствительности биолюминесценции к действию веществ различной структуры, имеющих различные физико-химические свойства и химическую активность. Поэтому получение полного представления о биолюминесцентных биотестах невозможно без рассмотрения влияния различных соединений на биолюминесценцию, т. к. именно знание механизмов стимулирования и ингибирования биолюминесценции бактерий лежит в основе ее использования в биотестах, представляя собой теоретическую основу биолюминесцентного анализа.

2.2. ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ

Первым и самым важным условием использования люциферазных реакций для интегрального биотестирования было условие изменения параметров свечения *in vitro* под влиянием токсичных веществ и отсутствие такого влияния для веществ инертных и нетоксичных. Далее необходимо было показать применимость интегрального подхода для широкого круга токсичных веществ, различающихся структурой, физико-химическими свойствами и механизмами влияния на биолюминесценцию. Важно было найти условия, в которых разнообразные вещества влияли бы одинаковым образом.

Понятно, что ответ на эти два вопроса возможен после определения влияния набора токсикантов на параметры биолю-

минесцентных реакций и определения основных механизмов ингибирования биолюминесцентных реакций этими токсикантами. Кроме того, знание физико-химических механизмов влияния токсикантов разной структуры на моно- и биферментные биолюминесцентные реакции необходимо для выбора условий максимальной чувствительности в люциферазных биотестах.

Обратимся к результатам некоторых исследований влияния соединений на ферментативные биолюминесцентные тест-системы. Прежде всего это биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза. Эта система сопряженных реакций является простейшей из ферментативных биолюминесцентных систем, в которой присутствуют процессы переноса энергии электрона и водорода. Проследим для этой системы влияние родственных соединений на ее спектральные и кинетические характеристики и классифицируем это влияние с точки зрения элементарных физико-химических процессов.

2.2.1. Влияние молекул на процессы переноса энергии в биолюминесцентной системе

Влияние на процессы миграции энергии возбуждения в биолюминесцентной системе осуществляется на последней стадии биолюминесцентного процесса – на стадии, когда сформировались электронно-возбужденные состояния молекулы эмиттера биолюминесценции. Это влияние можно условно разделить на 2 вида: 1) акцептирование энергии с электронно-возбужденных состояний биолюминесцентного эмиттера в результате межмолекулярного резонансного переноса энергии; 2) изменение заселенности электронно-возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции без межмолекулярного резонансного переноса энергии. Примером последнего может являться внешний эффект тяжелого атома.

Межмолекулярная миграция энергии

электронного возбуждения в биолюминесцентной системе

Миграция энергии возбуждения в биолюминесцентной системе – явление, широко распространенное в природе. Для многих видов светящихся бактерий характерно участие в процессе излучения света вторичных белков – эмиттеров, которые акцептируют энергию возбуждения с флавин-люциферазного комплекса, внося, таким образом, изменения в спектральные характеристики *in vitro* биолюминесценции. Наиболее известным примером вторичного эмиттера биолюминесценции является люмазиновый белок, выделенный из бактерий *Photobacterium phosphoreum* и названный так потому, что содержит производное люмазина в качестве обратимо связанного лиганда. В его присутствии наблюдается сдвиг максимума спектра излучения люциферазной реакции приблизительно на 15 нм в коротковолновую область. Другой пример – «желтый» сдвиг спектра биолюминесценции бактерий *Vibrio fischeri* штамма Y-1, вызванный присутствием т.н. желтого флуоресцентного белка (YFP) с молекулой FMN в качестве флуорофора. Согласно последним данным и YFP, и люмазиновый белок образуют комплекс с интермедиатами люциферазной реакции, что значительно повышает эффективность переноса энергии электронного возбуждения

Закономерности резонансной миграции энергии возбуждения известны из исследований спектров люминесценции растворов флуоресцентных красителей при фотовозбуждении. Условием эффективного переноса энергии между двумя молекулами является перекрывание спектра флуоресценции молекулы донора энергии со спектром поглощения молекулы акцептора энергии. Уровень энергии возбужденного состояния донора должен быть выше, чем уровень энергии акцептора (для примера, S_1^* на рис.17а и S_1^* на рис.17б, соответственно).

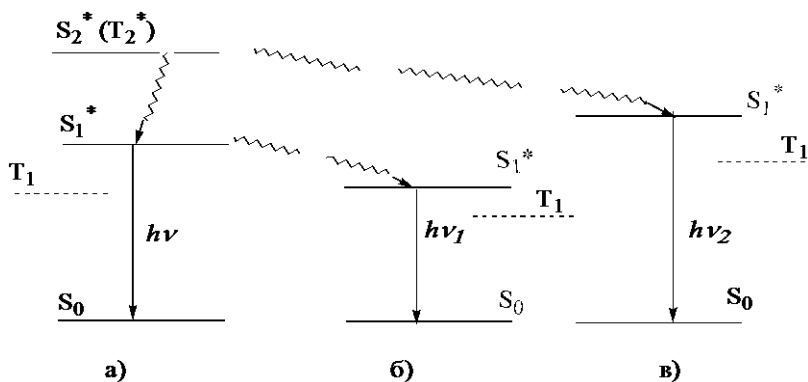


Рис.17. Относительное положение уровней энергии электронных состояний (диаграммы Яблонского) эмиттера биолюминесценции (а), родамина 6Ж (б), 1,4-бис (5-фенил-2-оксазолил) бензола (РОРОП) (в)

При этом можно наблюдать сенсibilизированную (т.е. при заселении электронно-возбужденного состояния в результате межмолекулярного переноса энергии) флуоресценцию молекулы акцептора в длинноволновой (по сравнению со спектром флуоресценции донора) области спектра, характерной для этой молекулы. Квантовый выход сенсibilизированной люминесценции имеет сложную зависимость от концентрации акцептора: при низких концентрациях он растет сначала линейно, а затем проявляет почти квадратичную зависимость; в области высоких концентраций квантовый выход, перейдя через максимум, может начать уменьшаться, приближаясь к стационарному значению.

Аналогичным образом при перекрытии спектра биолюминесценции и поглощения вводимых соединений можно получить сенсibilизированную флуоресценцию этих соединений в биолюминесцентной системе при отсутствии фотовозбуждения. (На рис.17 межмолекулярный перенос энергии обозначается прерывистыми, а внутримолекулярный - сплошными волнистыми стрелками.)

На рис.18 в качестве примера представлена сенсibilизированная флуоресценция молекулы красителя родамина 6Ж в биолюминесцентной системе. Спектр поглощения родамина ($\lambda_{\max} = 540$ нм, на рисунке не показан) перекрывается со спектром биолюминесценции (кривая 1). Максимум пика сенсibilизированной флуоресценции родамина в биолюминесцентной системе (кривая 2) при $\lambda_{\max} = 578$ нм совпадает с максимумом флуоресценции родамина 6Ж при фотовозбуждении (кривая 3). В аналогичных условиях наблюдали сенсibilизированную флуоресценцию незамещенного родамина и уранина. Таким образом, в условиях перекрывания спектра биолюминесценции и спектра поглощения молекулы ксенобиотика часть энергии неизбежно расходуется на межмолекулярный резонансный перенос, эффективность которого пропорциональна концентрации ксенобиотика. Если ксенобиотик (акцептор) – флуоресцентная молекула, то можно наблюдать его сенсibilизированную флуоресценцию в биолюминесцентной системе. Если ксенобиотик (акцептор) – нефлуоресцентная молекула, то полученная ею энергия растрачивается безызлучательно в результате колебательной релаксации, превращаясь в тепло.

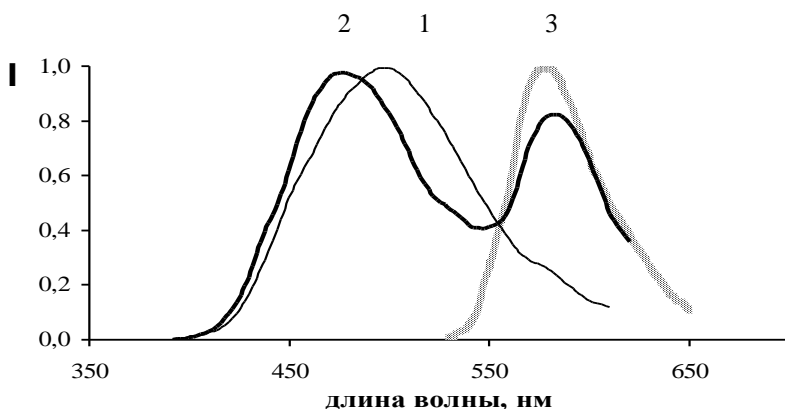
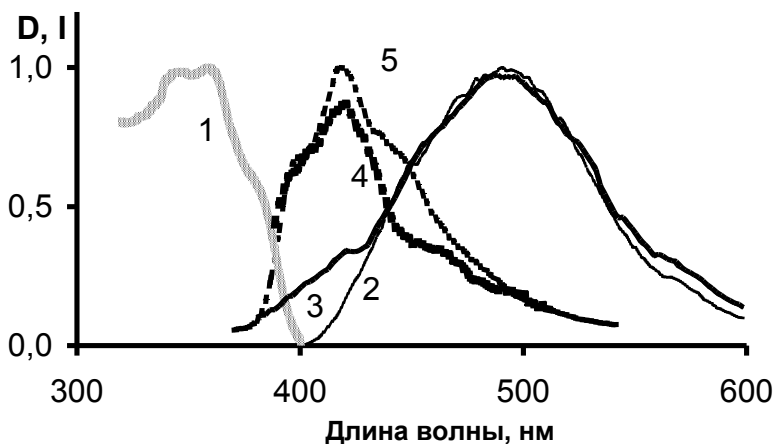


Рис. 18. Нормированные спектры люминесценции:
1 – биолюминесценции;

- 2 – биолюминесценция в присутствии родамина 6Ж ($C = 1.2 \cdot 10^{-6}$ М);
3 - флуоресценция родамина 6Ж

Кроме того, исследовались спектры биолюминесценции в присутствии соединений, которые также способны флуоресцировать, но не имеют перекрытия спектров поглощения и биолюминесценции. К таким соединениям относятся, например, антрацен, 1,4-бис (5-фенил-2-оксазо-лил) бензол (РОРОР). Спектральные данные для РОРОР приведены на рис. 19, а относительное положение электронных уровней энергии биолюминесцентного эмиттера и РОРОР – на рис.17а и рис.17в. Как видно из рис.19, спектры поглощения РОРОР и биолюминесценции не перекрываются. При этом РОРОР дает слабоинтенсивную сенсibilизированную флуоресценцию в биолюминесцентной системе (кривая 4), совпадающую по положению ($\lambda_{\max} = 418$ нм) и по форме с пиком флуоресценции РОРОР при фотовозбуждении (спектр 5).

Аналогичное явление наблюдали и в присутствии антрацена. Результаты этих экспериментов указывают на возможность образования в биолюминесцентной реакции первично-возбужденного энергетического предшественника флуоресцентного состояния эмиттера биолюминесценции. На рис.17а это состояние (S_1^*) представлено в качестве донора энергии в межмолекулярном переносе энергии для молекулы РОРОР (рис.17в).



Ри

с.19. Нормированные спектры:

- 1 – поглощения РОРОР ($C=10^{-6}M$, этанол); 2 – билюминесценции;
- 3 – билюминесценции в присутствии РОРОР ($C = 1.4 \cdot 10^{-7} M$);
- 4 - сенсibilизированная флуоресценция РОРОР, т.е. разностный спектр РОРОР в билюминесцентной системе;
- 5 – флуоресценция РОРОР

Механизм формирования электронно-возбужденных состояний с учетом образования энергетического предшественника эмиттера обсуждался в ряде работ. Вместе с тем перенос энергии с билюминесцентного эмиттера на молекулы при отсутствии перекрытия спектров имеет больше теоретический интерес из-за его малой эффективности, и им, вероятно, можно пренебречь при оценке максимально эффективных механизмов воздействия ксенобиотиков на билюминесцентные системы.

Внешний эффект тяжелого атома

Внешний эффект тяжелого атома в билюминесцентной системе удобно изучать с использованием галогенидов металлов, т.к. данные соединения содержат анионы с широким интервалом атомных весов при относительно близких

химических свойствах. В молекулах, содержащих тяжелые атомы, спин-орбитальная связь значительна. В этих условиях сохраняется полный угловой момент, и правило отбора ($\Delta S=0$) по спину S электронной оболочки теряет свою силу. При этом внутримолекулярный синглет-триплетный переход $S^*_1 \rightarrow T_1$ (рис.17 а, б, в) перестает быть запрещенным, что сказывается на параметрах люминесценции. Подобные эффекты можно индуцировать в молекулах, используя растворители, содержащие тяжелые атомы. Такой эффект получил название внешнего (межмолекулярного) эффекта тяжелого атома. Перечисляя явления, сопряженные с эффектом тяжелого атома, можно назвать: увеличение поглощения на переходах $T_1 \leftarrow S_0$; уменьшение времени жизни фосфоресценции; уменьшение квантового выхода флуоресценции; возможность увеличения квантового выхода фосфоресценции.

Эффекты тяжелого атома были исследованы несколько десятилетий назад для случая фотовозбуждения в растворах флуоресцентных красителей. Логично предположить, что эти эффекты будут наблюдаться и в системах с химическим возбуждением в присутствии белка (биоломинесцентные системы). Сложность изучения подобных явлений в биологических системах связана с тем, что помимо чисто физических эффектов, вызванных присутствием тяжелого атома, биоломинесцентная система характеризуется рядом других свойств, определяемых течением химической реакции, активностью фермента. Было исследовано воздействие на биоломинесцентную систему ряда галогенидов калия. Из табл.3 видно, что максимальная интенсивность биоломинесценции $(I/I_0)_{\max}$, константы ингибирования K_i и активации K_a , рассчитанные по квантовому выходу Q и интенсивности I биоломинесценции, изменяются с ростом массы аниона: в ряду KCl, KBr, KI увеличивается ингибирующая способность и уменьшается активирующая способность соединений.

Таким образом, присутствие в биолюминесцентной системе отрицательно заряженных тяжелых атомов уменьшает эффективность биолюминесценции, что сказывается на изменении кинетических параметров биолюминесцентных биотестов.

Таблица 3

Параметры действия галогенидов калия на биолюминесцентную биферментную систему NADH: FMN- оксидоредуктаза- люцифераза

Соль	KCl	KBr	KI
Молек. вес, а. е.м.	77,55	119	166
Исследуемые концентрации, М	$10^{-5} \div 10^{-1}$	$10^{-6} \div 10^{-1}$	$10^{-8} \div 10^{-4}$
$(I/I_0)_{\max}$	3,7	2,9	1,1
$K_{и}^Q, M^{-1}$	-	$(2,1 \pm 0,4) \cdot 10^1$	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^5$
$K_{а}^Q, M^{-1}$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^2$	$(9,2 \pm 1,2) \cdot 10^1$	0
$K_{и}^I, M^{-1}$	$(7,2 \pm 1,1) \cdot 10^0$	$(4,5 \pm 0,8) \cdot 10^1$	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^5$
$K_{а}^I, M^{-1}$	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^2$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^2$	0

2.2.2. Влияние молекул на процессы переноса электрона в биолюминесцентной системе

Перенос электрона (или заряда) является необходимой стадией всех химических и биохимических процессов, в том числе и биолюминесцентных.

Ксенобиотики, способные воздействовать на перенос электрона (заряда), изменяют интенсивность биолюминесцентного сигнала в биолюминесцентной системе. Это может происходить на большинстве стадий биолюминесцентного процесса: при взаимодействии ксенобиотиков с субстратами, на стадиях

химического взаимодействия субстратов и эволюции электронно-возбужденных состояний в биолюминесцентной системе. Заряженные соединения (катионы, анионы), диполи, радикалы – наиболее активные ингибиторы (активаторы) переноса электрона. Эффекты солей металлов могут быть рассмотрены с точки зрения электронно-акцепторных (донорных) свойств катионов (анионов). Так, при исследовании ингибирования солей с анионами Cl^- , NO_3^- , и SO_4^{2-} было показано, что ингибирующая способность солей зависит только от природы катиона.

На рис. 20б представлены результаты действия солей металлов на биолюминесценцию биферментной системы. Эффективность воздействия характеризуется константой ингибирования K , которая рассчитывалась согласно формуле

$$\frac{I}{I_0} = e^{-KC} \left(1 + \left(\frac{C}{C^*}\right)^\alpha\right), \quad (1)$$

где I – интенсивность биолюминесцентного сигнала в присутствии соли концентрации C (М); I_0 – интенсивность биолюминесцентного сигнала в отсутствии соли; C^* – эффективная концентрация соли, при которой экспоненциальная зависимость переходит в степенную. Положительные значения K соответствуют ингибированию (уменьшению интенсивности), а отрицательные – активации (увеличению интенсивности) биолюминесценции в присутствии соли.

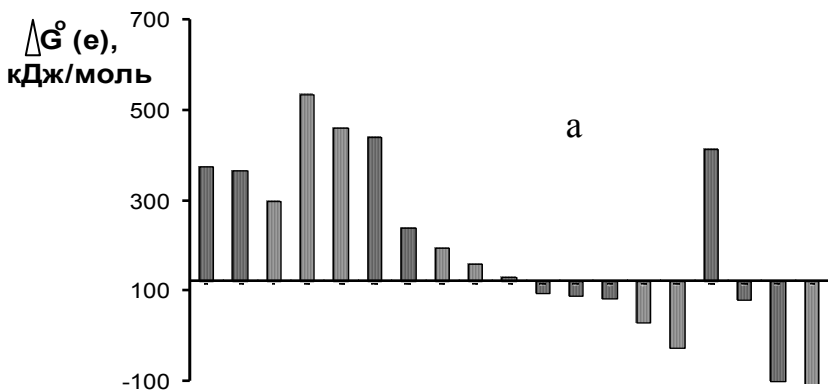


Рис. 20. Диаграмма:
а - сродство к электрону катионов в водном растворе $\Delta G^{\circ}(e)$;
б- константы ингибирования биолюминесценции К солями металлов

Исследования показали, что эффект (ингибирование или активация биолюминесценции) зависит от положения катиона металла в таблице Менделеева. Так, оказалось, что соли щелочных (Li^+ , Na^+ , K^+) и щелочноземельных (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) металлов активируют биолюминесценцию ($K < 0$), а соли *p*-металлов (Al^{3+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Bi^{2+}) ингибируют ее ($K > 0$). Более сложным является действие солей *d*-металлов: катионы с зарядом 2+ и вакантными *d*-орбиталями (Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+}) активируют биолюминесценцию (FeSO_4 - исключение из этой закономерности), а катионы без вакантных *d*-орбиталей (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+}) ингибируют ее. Катионы с зарядом (3+) (Cr^{3+} и Al^{3+}) также ингибируют биолюминесценцию.

Значения α положительны для активации и отрицательны для ингибирования биолюминесценции. В обоих случаях этот параметр характеризует отклонение от экспоненциальной зависимости при больших концентрациях солей, отклонения при этом происходят в сторону уменьшения эффекта солей.

Необходимо определить характеристики катионов, которые связаны с типом их эффекта – ингибированием или активацией. Чтобы характеризовать влияние катионов на распределение электронной плотности в биолюминесцентной системе, необходимо обсудить эффекты солей металлов с точки зрения их электронно-акцепторных свойств, которые можно характеризовать стандартным электродным потенциалом или стандартной энергией сродства к электрону в водной среде (ΔG_e^0).

Значения ΔG_e^0 катионов с зарядом (1+) и (2+), рассчитанные с использованием термодинамических данных, представлены на рис.20а. Как видно из сопоставления рис.20а и 20б, катионы, для которых $\Delta G_e^0 > 100$ кДж/моль, активируют биолюминесценцию ($K < 0$), а катионы, для которых $\Delta G_e^0 < 100$ кДж/моль, ингибируют ее. Из этой зависимости выпадают катионы с зарядом 3+, и на диаграмме видно нарушение законо-

мерности для алюминия. Возможно, что причина этого состоит в эффективной гидратации трехзарядных катионов в водных растворах. Влияние Fe^{2+} также выпадает из указанных закономерностей ($K > 0$), т.к. в водных растворах он легко окисляется до Fe^{3+} .

Полученные закономерности указывают на связь интенсивности биолюминесценции с влиянием катионов на процессы миграции электронной плотности в биолюминесцентной системе. Катионы могут участвовать в перераспределении электронной плотности в темновом химическом процессе и на стадии образования и дезактивации электронно-возбужденных состояний. Кроме того, важным механизмом воздействия катионов на ферментативные процессы являются их взаимодействия с электронно-донорными фрагментами белков: S-атомов SH-групп, N-атомов боковых групп аминокислотных остатков и т.д.

Активация биолюминесценции катионами может быть объяснена влиянием катионов на стадии образования и эволюции электронно-возбужденных состояний. При этом может образовываться более эффективный дополнительный канал для переноса энергии электронного возбуждения через электронно-возбужденные состояния молекул-акцепторов. Подобный механизм активации предлагался ранее для некоторых хемилюминесцентных реакций (так называемая химически инициированная электронно-обменная хемилюминесценция) и фотохимических реакций. Кроме того, известный эффект – увеличение скорости ферментативных реакций в результате активации ферментативных групп катионами переходных и щелочноземельных металлов. Пример – Са-зависимая биолюминесценция. Таким образом, можно подытожить, что активация катионами биолюминесцентного процесса, вероятно, связана их влиянием на миграцию электронной плотности в результате обратимого присоединения электрона.

Ингибирование биолюминесценции катионами металлов может быть результатом необратимого присоединения элект-

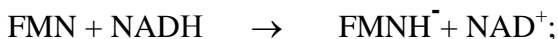
трона. Такие взаимодействия характеризуются отрицательными величинами изменения энергии Гибса ($\Delta G_e < 0$). При этом при прочих равных условиях чем меньше величина изменения стандартной энергии Гиббса ΔG_e^0 , тем более эффективно взаимодействие. Ингибирование ферментативных процессов, включая биолюминесцентные, хорошо известно для тяжелых металлов, меди и т.д.

Таким образом, воздействие солей металлов на ферментативную биолюминесцентную систему показывает, что ингибирование и активация биолюминесценции - результат воздействия катионов на процессы миграции электронной плотности. Поскольку миграция электронной плотности является основой всех элементарных физических и химических процессов, следовательно, физико-химические характеристики способности акцептирования электронной плотности ксенобиотиками (средство к электрону, редокс-потенциал) интегрируют все эффекты ксенобиотиков на сложные биологические системы.

2.2.3. Влияние молекул на процессы переноса водорода ($e^- + H^+$) в биолюминесцентной системе

Биолюминесцентная биферментная система включает две ферментативные реакции:

NADH:FMN-оксидоредуктаза



Люцифераза



В результате 1-й реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой, происходит восстановление FMN с помо-

щью восстанавливающего реагента NADH. Формально процесс выглядит как присоединение водорода. Однако в таком полярном растворителе, как вода, перенос водорода складывается из переноса протона и электрона: $H = e^- + H^+$. При этом NADH переходит в NAD^+ , передавая молекуле FMN протон и два электрона с образованием FMNH⁻ (депротонированная форма восстановленного флавина). В водных растворах при нейтральных pH восстановленный флавин на 90% состоит из депротонированной формы и только 10% из FMNH₂, который образуется в результате отрыва протона от подходящего донора, например, воды.

Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин и алифатический альдегид окисляются кислородом воздуха. В результате реакции образуется окисленная форма флавина, жирная кислота, а также испускается квант света.

Присутствие в системе ксенобиотиков, способных конкурировать с FMN в процессах присоединения водорода в первой реакции, уменьшает количество восстановленного флавина, следствием чего становится ингибирование биолюминесценции. Пример таких соединений-ксенобиотиков – хиноны. Известно, что хиноны способны специфическим образом менять кинетику биолюминесценции биферментной системы: в присутствии некоторых из них не только уменьшается интенсивность биолюминесценции (I), но и появляется период задержки свечения (индукционный период T) и увеличивается время выхода на максимум биолюминесценции (t) (рис.21).

t

2

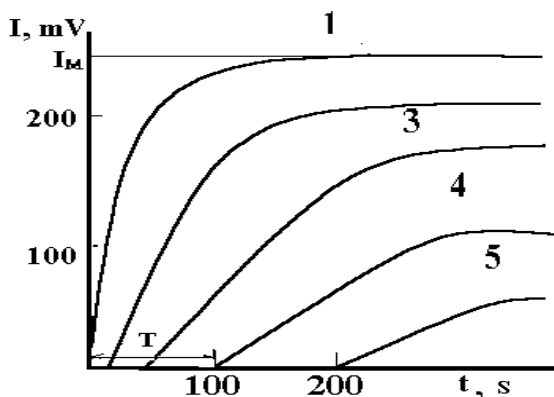


Рис.21. Кинетика биолюминесценции биферментной системы при различных концентрациях толухинона:
1 – 0; 2 – $2 \cdot 10^{-8}$ М; 3 – $4 \cdot 10^{-8}$ М; 4 – 10^{-7} М; 5 – $2 \cdot 10^{-7}$ М

На рис. 22 представлены характерные зависимости величины T и t от концентрации хинона в биферментной системе на примере тимохинона. Данные зависимости практически линейны. Коэффициенты корреляции 0,98 и 0,99 соответственно.

Введем параметр k , связанный с индукционным периодом T , следующим образом: $k = \Delta T / \Delta C$. Показано, что существует прямая зависимость k от величины стандартного окислительно-восстановительного потенциала хинона E^0 (рис.23). Коэффициент корреляции 0,89. Бензохинон (рис.23, 5), характеризующийся максимальной величиной $E^0=706$ мВ, дает наибольшее значение k . Молекулы 9,10-антрахинона (рис.23, 1) имеют стандартный окислительно-восстановительный потенциал меньше, чем у FMN ($E^0=157$ и 206 мВ соответственно), поэтому они не конкурируют с FMN в процессе восстановления и не дают задержки свечения. Тимохинон, нафтохинон и 1,4-антрахинон имеют промежуточные значения k стандартного окислительно-восстановительного потенциала.

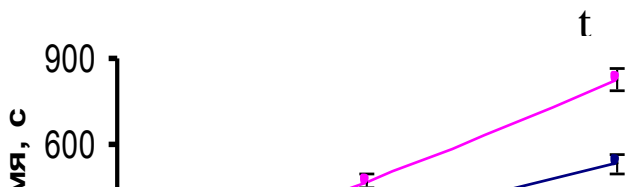


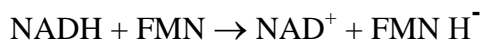
Рис. 22. Зависимость времени выхода на максимум t и индукционного периода T биолюминесценции от концентрации тимохинона C

Количественно эффективность конкуренции определяется превышением потенциала реакции (E_1) реакции:



$$(E_1 = E_{\text{хинон/гидрохинон}^-} - E_{\text{NAD}^+/\text{NADH}})$$

над потенциалом реакции (E_2):



$$(E_2 = E_{\text{FMN}/\text{FMN H}^-} - E_{\text{NAD}^+/\text{NADH}}),$$

где $E_{\text{хинон/гидрохинон}^-}$, $E_{\text{NAD}^+/\text{NADH}}$, $E_{\text{FMN}/\text{FMN H}^-}$ - окислительно-восстановительные потенциалы соответствующих полуреакций.

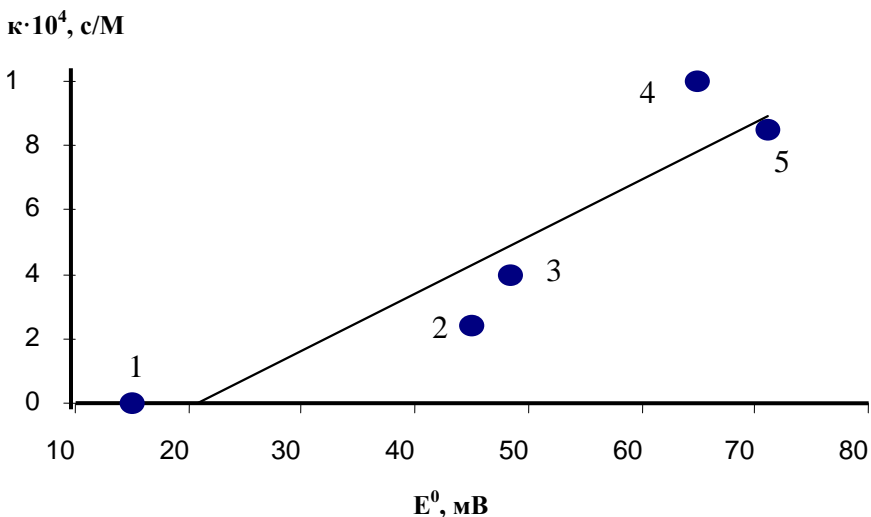


Рис.23. Зависимость величины k от стандартного окислительно-восстановительного потенциала E^0 хинонов:

1 – 9,10-антрахинон; 2 – 1,4-антрахинон; 3 – 1,4-нафтохинон;
4 – тимохинон; 5 – 1,4-бензохинон

Следует обратить внимание, что такие зависимости выполняются только при небольших концентрациях хинонов. Известно, что окислительно-восстановительный потенциал любой реакции E зависит не только от стандартного окислительно-восстановительного потенциала E^0 , но и от соотношения активностей (или концентраций) окислителя и восстановителя a_{Ox} и a_{Red} в соответствии с уравнением Нернста, которое здесь записано для 20^0 C:

$$E = E^0 + \frac{0.058}{n} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} .$$

Здесь n – количество электронов, которые переходят от восстановителя к окислителю.

Таким образом, в NADH-зависимой биферментной биолюминесцентной системе хиноны способны конкурировать с FMN в процессах восстановления (присоединения водорода). Эффективность этой конкуренции определяется стандартным окислительно-восстановительным потенциалом хинона и его концентрацией в биолюминесцентной системе. В кинетике биолюминесценции присутствие активных хинонов проявляется специфическим образом: не только уменьшается интенсивность биолюминесценции, но и растет время выхода на максимум и появляется индукционный период биолюминесценции.

Существует возможность варьирования чувствительности биолюминесцентных ферментативных NADH-зависимых систем путем увеличения цепи NADH-сопряжения при добавлении в систему других NADH-зависимых ферментов. Так, для изменения чувствительности биолюминесцентной тест-системы проводили сопряжение биферментной системы с третьим NADH-зависимым ферментом – алкогольдегидрогеназой.

Таким образом, рассмотрение биофизических механизмов переноса энергии, электрона, протонов в биолюминесцентных реакциях является основой для разработки ферментативных биотестов. При этом достигается интегральность в действии разных веществ. Установленные корреляции между структурой и свойствами токсикантов с одной стороны и их воздействием на рассмотренные кинетические параметры биолюминесценции с другой позволяют предсказывать чувствительность биотестов с использованием биолюминесцентных моно-, би- и триферментных реакций.

3.1. СВЕТЯЩИЕСЯ БАКТЕРИИ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

Рассмотрим существующие в настоящее время биотесты с использованием светящихся бактерий. Биотесты с использованием живых бактерий отличаются от современных биотестов, использующих инфузории, дафнии, водоросли, рыб, лишь тем, что в качестве параметра жизнедеятельности измеряется биолюминесценция.

Биотесты на светящихся бактериях дают количественную меру токсичности и часто превосходят известные биотесты по быстрдействию, точности, чувствительности и простоте, позволяют контролировать одновременно значительное число токсикантов.

В табл. 4 представлены все известные к настоящему времени биотесты на светящихся бактериях. Разработка биолюминесцентных биотестов обычно идет в три этапа: подготовка тестовой культуры бактерий; собственно измерение свечения бактерий в присутствии или при отсутствии анализируемых веществ; установление связи между параметрами свечения и количественными характеристиками токсичности среды.

Каждый из этапов имеет свои особенности, связанные с тем, какая культура бактерий используется для анализа. Поэтому все известные к настоящему времени биотесты удобно классифицировать по способу приготовления тестовой культуры (периодической или непериодической) или реагентов на основе бактерий.

Периодическая культура может быть выращена на твердой либо в жидкой среде в виде суспензии. На примере аминазина [2,3] было показано, как выполняют измерения в биотестах с использованием суспензии бактерий. Из тестовой культуры отбирают пробы и в кювете люминометра регистрируют свечение

бактерий при отсутствии анализируемого вещества - I_0 . Далее строят кривую разведения для анализа, добавляя в кювету 0,2 мл раствора аминазина разных концентраций, и регистрируют тушение люминесценции бактерий (I). Ингибирующий эффект определяется по величине (I/I_0) ,%. С увеличением концентрации аминазина величина этого параметра растет. По кривой разведения можно найти концентрацию аминазина, угнетающую свечение на 50%.

Таблица 4

Бактериальные биолюминесцентные биотесты

Биотест	Действующие вещества
Загрязнение пищевых продуктов микотоксинами (7,53-31,79 мкг/мл)	Рубратоксин В, зеараленон, пенициллин, патулин, цитринин, охратоксин А, РР-токсин, афлатоксин В1
Присутствие в среде антибиотиков (0,2 мкг/мл)	Тетрациклин, хлорамфеникол, стрептомицин, неомицин, гентамицин, канамицин
Токсичность сточных вод и водной среды	Ароматические углеводороды, дыхательные яды, фенольные соединения и продукты их деструкции, сульфатный лигнин, окрашенные фракции стоков, фенолоксидазы, детергенты, пестициды, тяжелые металлы, кобальт, отходы производства стабилизаторов
Токсичность в воздушной среде (компоненты ракетного топлива)	Диметилгидразин, альдегиды, спирты, ацетон, HCN, SO ₂ , H ₂ S, Cl ₂ , продукты облучения смеси N ₂ O и цис-2-бутена
Загрязнение среды гербицидами	Монурон, диурон, нефурон, атразин
Определение бактерицидной активности в сыворотке человека	Иммуноглобулины, комплементы
Модельное изучение влияния химических и физических факторов	Температура, давление, лекарственные препараты, анестетики (галотан), глицерин, сахара
Тест на мутагенность	

Продукты окисления керогена сланцев	Высокомолекулярные кислоты
Токсичность для рыб	Органические вещества

Чувствительность светящихся бактерий к различным веществам зависит от многих факторов, и, прежде всего, от штамма и условий культивирования бактерий (состава питательной среды, pH среды, фазы роста бактерий и т.д.). Было показано, что наибольшая чувствительность к аминазину (0,25 мМ) достигается при использовании для анализа *P.phosphoreum* в конце экспоненциальной фазы роста и *P.fisherii* в начале экспоненциальной и в стационарной фазах роста на полусинтетической среде с пептоном, глицерином и концентрацией NaCl – 50 г/л, pH 8,0.

Описанные в литературе методы тестирования ксенобиотиков отличаются лишь небольшими модификациями. Например, в значительных пределах может меняться количество клеток, взятых для анализа, или объем анализируемой пробы. Однако в силу относительности измерений такие модификации не влияют существенно на последовательность проводимых операций.

Рассмотрим примеры известных биотестов (см. табл.4). Клеточная суспензия используется в биотестах для оценки токсичности сточных вод целлюлозной промышленности в результате загрязнения их фенольными соединениями и продуктами их распада, сульфатным лигнитом и окрашенным веществом, остающимся в сточных водах после биологической очистки.

Использование твердых сред в подобных методах позволяет многократно использовать одну и ту же культуру клеток в высокочувствительных детекторах для непрерывного контроля загрязненности воздуха в шахтах, горных выработках и штольнях. При этом компоненты среды тушат свечение бактерий, после чего через 10-15 с свечение восстанавливается до исходного уровня, и можно производить новые измерения.

Анализ загрязнения воздуха газообразными отходами производства, получающимися при облучении окислов азота и цис-2-бутена, проводят сравнением свечения бактерий, растущих на агаре, при пропускании над ними анализируемой газовой смеси и чистого воздуха.

Попытка осуществить избирательный анализ газообразных веществ предпринята в приборе, созданном в США. Для этой цели в конструкции прибора предусмотрена логическая схема, сопоставляющая ответы от нескольких фоторегистрирующих ячеек, каждая из которых должна быть чувствительна к ограниченному кругу веществ. Сигнал генерируется только в случае, если суммарный ответ указывает на анализируемое вещество. Однако достижению предполагаемой избирательности прибора препятствует невозможность выбора штамма светящихся бактерий, чувствительных к ограниченному кругу веществ, а значит, и создание избирательных фоторегистрирующих ячеек.

В целом все тесты с использованием периодической культуры сходны между собой - сравнивается свечение бактерий в контроле и в присутствии анализируемых веществ или их смесей. Относительность измерений важна при работе с ингибиторами, нерастворимыми или мало растворимыми в воде. В этом случае используются их растворы в этаноле или других органических растворителях (хлороформ, диметилсульфоксид и т.д.), а контролем служит интенсивность свечения в присутствии растворителя.

Остановимся на некоторых недостатках такого биотестирования. Прежде всего в периодической культуре в результате роста бактерий меняются их характеристики, например удельное свечение, что сказывается на чувствительности и на точности измерений. Использование безразмерной величины - $(I/I_0) \cdot 100\%$ не решает этой проблемы. К тому же важно поддержание тестовой культуры бактерий, способной сохранять постоянной интенсивность свечения в течение хотя бы двух-

трех часов. Удельная интенсивность свечения культуры бактерий сильно варьирует в зависимости от штамма, условий культивирования бактерий, количества бактерий, взятых для анализа.

Трудности возникают не только при получении культуры с длительным (сутки и более) постоянным свечением, но и в поддержании постоянства характеристик бактерий в музейной культуре. По-видимому, в основе таких затруднений лежит недостаточное знание нами физиологии светящихся организмов, назначения биолюминесценции и роли ее в природных экосистемах и для самих бактерий. В связи с этим меры по поддержанию постоянных характеристик бактерий носят случайный характер, и нередко штаммы светящихся бактерий теряют способность светиться в коллекциях спустя 3-4 года после выделения их из природной экосистемы и ряда пассажей.

Проблема стандартизации культуры бактерий решается в настоящее время двумя путями: использованием непрерывной культуры светящихся бактерий и получением реагента на основе лиофильно высушенных бактерий.

При непрерывном культивировании в люминостане возможно поддержание культуры бактерий в определенном физиологическом состоянии с постоянной в течение некоторого времени интенсивностью свечения посредством управления протоком питательной среды. Добавление в культиватор среды происходит, когда люминесценция бактерий превышает определенный, заранее выбранный уровень возможного свечения бактерий. Подача питательной среды прекращается при уменьшении свечения бактерий до заданной интенсивности, люминесценция бактерий при этом продолжает падать за счет снижения удельного свечения, но уравнивается за счет увеличения числа клеток бактерий и, соответственно, возрастания интенсивности свечения. Однако постоянный уровень люминесценции *P.leiognathi* и *P.phosphoreum* удается поддерживать в люминостане только около суток. Для аналитических измерений отбирают из люминостата 2 мл суспензии светя-

щихся бактерий, и далее процедура определения количества токсиканта не отличается от представленной выше. Чувствительность анализа в этих условиях для фенола - 50 мкМ, для 2,4-динитрофенола - 0,1 мкМ. Использование люминоста существенно повышает точность измерений, но чувствительность анализа ниже почти в 10 раз по сравнению с периодической культурой. Кроме того, к недостаткам непрерывного культивирования следует также отнести техническую сложность и большой расход питательной среды.

Значительными преимуществами обладают лиофилизированные светящиеся бактерии, которые используются при анализе некоторых антибиотиков, ингибирующих свечение или микотоксинов. Леофильно высушенные бактерии в устройстве "Микротокс" применяют для тестирования микроколичеств ароматических углеводов, дыхательных ядов и других веществ, загрязняющих воду. Чувствительность бактерий к микотоксинам сохраняется в течение 5 ч и для некоторых токсинов выше, чем в свежей суспензии клеток. Эти тесты на токсичность отличаются чувствительностью и точностью (ошибка $\pm 10\%$), простотой использования, дешевизной, экспрессностью (30 мин) и другими несомненными преимуществами по сравнению с известными биотестами на водорослях, рыбах, дафниях и т.п.

Препараты лиофилизированных бактерий выпускают в Институте биофизики СО РАН и некоторых зарубежных фирмах. Beckman Instruments продает леофильно высушенные светящиеся бактерии в комплекте с биолюминометром. Восстановленные в растворе NaCl бактерии имеют постоянный уровень свечения в течение 5 ч.

При использовании теста на светящихся бактериях для увеличения воспроизводимости результатов необходимо контролировать состояние используемых в биотесте бактерий, условий их выращивания и применения. Так, на фотобактерии могут влиять параметры анализируемой среды - температура,

pH, жесткость воды и растворенный кислород. Контроль только одного параметра - свечения - в этих биотестах может приводить к неверным результатам, так как имеются вещества, вредные для живых организмов, но не влияющие или даже увеличивающие свечение бактерий. Поэтому для каждой группы веществ необходимо показать правильность выбора люминесценции в качестве измерительного параметра по отношению к другим параметрам. Так было сделано в работе, посвященной биотесту на содержание фенольных соединений и продуктов их деструкции в сточных водах предприятий целлюлозно-бумажной промышленности. В работе проведено сопоставление токсичности фенольных соединений для светящихся бактерий по трем показателям: гашению люминесценции, подавлению дегидрогеназной активности и способности к размножению. Из исследованных показателей гашение свечения обладает значительно более высокой чувствительностью при наименьшей инерционности. Было показано, что эти вещества влияют на мембранные структуры клетки, вызывая нарушение их целостности.

При создании тест-системы на основе светящихся бактерий часто возникает задача повышения чувствительности бактериальных клеток к низким концентрациям тестируемых соединений. Этого можно достичь изменением условий культивирования, способа обработки токсикантом, использования специфических чувствительных мутантных штаммов. Все эти подходы были использованы при создании тест-системы на различные фенолы и их производные, сульфопроизводные янтарной кислоты и гексахлоранциклогексана (ГХЦГ). Для выяснения механизма их действия на люминесцентную систему необходимо иметь представление и о влиянии этих веществ на жизнеспособность клеток и сохранность их структур. В ряде экспериментов изучали действие на ультраструктуру и выживаемость *P.leiognathi* и *V.harveyi* после обработки клеток гидрехиноном, п-бензохиноном, резорцином, пирокатехином, хлоридами кадмия и ртути, взятыми в концентрациях, которые

вызывают 50%-ное тушение люминесценции. Более специфическое действие на люминесцентную систему оказывают п-бензохинон и гидрохинон, не вызывая грубых структурных повреждений. Резорцин и хлорид кадмия являются структурно-неспецифическими агентами, поэтому обработка этими соединениями вызывает структурные повреждения, затрагивающие все компартменты клетки и многие важные функции, в том числе и люминесценцию, что указывает на возможность создания избирательных тестов.

Для создания тест-системы на ГХЦГ использовали специфически чувствительные мутантные штаммы *P.leiognathi* 541 и 542, которые отличались от исходного постоянным уровнем люминесценции в процессе роста. На среде с глицерином чувствительность к ГХЦГ была выше более чем в 3 раза по сравнению с клетками, выросшими на среде с глюкозой, а штамм 541 был в 4-5 раз чувствительнее к 0,15 мг/мл ГХЦГ, чем штамм 542. Выявлено, что повышенная чувствительность штамма 541 к ГХЦГ может быть объяснена повреждением мембранных структур клетки.

Еще одна тест-система была опробована для изучения влияния сульфопроизводных янтарной кислоты на люминесценцию бактерий при сравнении полученных данных с липофильными свойствами испытуемых веществ. Изучено действие на ультраструктуру клеток сукцинимидов, ингибирующих, стимулирующих и оказывающих нейтральное действие на люминесцентную систему бактерий. Оказалось, что после обработки культуры этими имидами не обнаруживалось заметных структурных повреждений. Отсутствие повреждающего действия рассматриваемых сукцинимидов на клетки может служить косвенным показанием для их фармацевтического использования.

Несмотря на очевидные преимущества биолюминесцентного тестирования, такие тесты до сих пор не паспортизованы и не доказана правомерность их использования в качестве индикатора загрязнения окружающей среды. Для этого прежде всего

необходимо провести сопоставление результатов биолюминесцентного тестирования и других современных биотестов.

Сделано несколько биотестов с использованием мутантов по свечению у фотобактерий. Например, тест на мутагенность основан на способности мутагенов увеличивать скорость обратных мутаций у темновых штаммов светящихся бактерий. Чувствительность метода (нанограммы) в 100 раз превышает чувствительность общепринятых методов анализа мутагенов. Однако сопоставление скоростей реверсий, происходящих спонтанно и под влиянием анализируемых мутагенов, а также то, что за время анализа (2 ч) невозможно обнаружение ревертировавших бактерий в силу их небольшого числа, ставит под сомнение генетическую основу этого эффекта и достоверность самого теста.

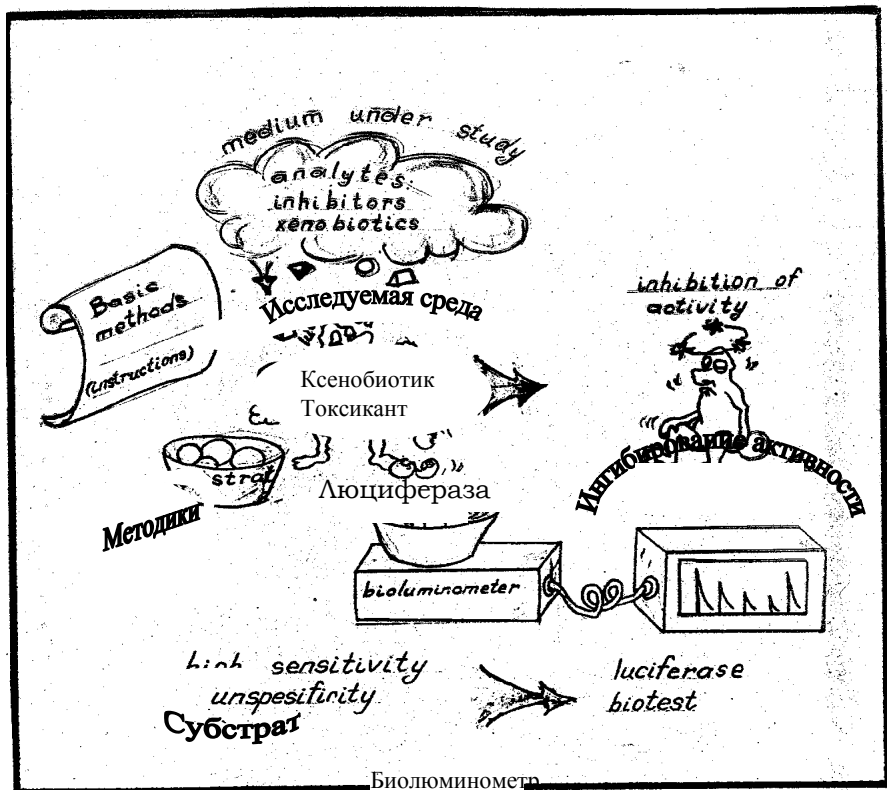
Скрининг мутагенов проводят также инкубируя индикаторные темновые штаммы *P.leiognathi* в течение 30 мин в испытуемом растворе, затем отмытые от мутагена клетки засевают в свежую среду. Свечение обработанных клеток измеряют с интервалами 4 - 6 ч. В зависимости от мутагена, его токсичности и концентрации через 10 - 40 ч культивирования наблюдается увеличение свечения по сравнению с контролем, связанное с накоплением в пробирках ярко светящихся ревертантов. Чувствительность метода для нитрозогуанидина - 1 мкг/мл, нитрозометилмочевины - 0,25 мг/мл, этилметилсульфата - 0,1 мкг/мл, фурагина - 0,25 мкг/мл.

Считается, что среди большого разнообразия мутантов можно выбрать штаммы, избирательно чувствительные к определенным веществам. Однако успешных работ в этом направлении пока мало. Зато появились работы, сделанные с использованием рекомбинантных светящихся бактерий, где успешно эксплуатируется идея о том, что излучающие ферменты – люциферазы и их гены в последние годы стали самыми привлекательными и употребительными маркерами в генетике, эмбриологии, молекулярной биологии, в мониторинге окружающей среды и для биохимической диагностики в меди-

цине. Поэтому помимо использования в люминесцентном анализе природных светящихся бактерий ведется разработка новых направлений биотестирования, и одним из них является использование в качестве тест-объекта люминесцентных рекомбинантных штаммов различных бактерий (*E.coli*, *Pseudomonas*, *Rysobium* и др.) К настоящему времени описано клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы светящихся бактерий *Vibrio harveyi*, *V.fischeri* и *Photobacterium leiognati* в плазмидном векторе клеток различных микроорганизмов [20]. Введение *lux*-гена позволяет создавать высокочувствительные биосенсоры, обладающие высокой специфичностью. Например, сконструированы бактерии, в которых под действием токсикантов увеличивается свечение. С помощью такого биолюминесцентного биосенсора, созданного на основе *E.coli*, можно установить наличие в среде (и в смесях тяжелых металлов) ртути. Принцип действия этого биосенсора заключается в увеличении экспрессии *lux*-генов при наличии в среде ионов ртути. Чувствительность метода выше, чем в атомной абсорбционной спектроскопии. Подобный биосенсор на основе бактерий *Pseudomonas putida* сконструирован и для определения в среде нафталина, толуола, ксилола. Бактерии рода *Rysobium* использованы для конструирования люминесцентного биосенсора загрязнения почвы. Некоторые штаммы бактерий рода *Salmonella* использованы для конструирования люминесцентного биотеста, позволяющего определять распределение бактерий на поверхности различных пищевых продуктов. Было предложено встраивать *lux*-гены в бактериофаги, которые, внедряясь в клетку-хозяина, через 30-50 мин вызывают экспрессию *lux*-генов. С использованием этого приема был разработан метод определения бактериальных клеток непосредственно в молоке, который позволяет “уловить” до 10 клеток в образце.

3.2. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ

Традиционно из биолюминесцентных систем в экологическом мониторинге использовался долгое время только интегральный тест на светящихся бактериях. Вместе с тем в литературе имелось достаточно большое количество данных, убедительно демонстрирующих высокую чувствительность люциферазных реакций к действию токсических веществ. При этом сравнение их влияния на биолюминесценцию *in vivo* и *in vitro* показывало существование зависимости между степенью токсичности в анализируемом образце и изменением параметров свечения обеих биолюминесцентных систем, но чувствительность систем *in vitro* была часто выше в 100-1000 раз. Таким образом, имелись все предпосылки для использования в интегральных биотестах токсичности среды не только светящихся бактерий, но и выделенных из них люцифераз. Более того, переход от систем *in vivo* к системам *in vitro* при измерении параметра жизнедеятельности бактерий



Принцип люциферазных биотестов - обнаружение токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции. В основе биолюминесцентных биотестов чаще всего лежит ингибирование люциферазы компонентами анализируемых смесей (см.рис.24). Новое направление биолюминесцентного биотестирования отличается тем, что в качестве тест-объектов вместо светящихся бактерий используются реакции, катализируемые люциферазой, биферментной системой: NADH:FMN-оксидоредуктаза - люцифераза. В настоящее время на примере алкогольдегидрогеназы и трипсина обсуждается возможность использования трехферментных биолюминесцентных систем для экологического мониторинга. Основными тест-функциями являются параметры названных биолюминесцентных реакций.

Основными условиями для применения люциферазного биотеста считаются наличие прибора-биолюминометра и реактивов (препаратов ферментов и субстратов) для проведения измерений, базовые биолюминесцентные методы, а также чувствительность биолюминесцентных реакций к компонентам анализируемой среды и установление соответствия между токсичностью среды и степенью изменения параметров биолюминесцентных реакций.

Базовый метод, основанный на люциферазной реакции, методически прост: в измерительной кювете смешивают люциферазу и ее субстраты и регистрируют на биолюминометре контрольную вспышку свечения. Далее процедура повторяется в присутствии анализируемой пробы. Токсичность смеси определяют по изменению величины интенсивности биолюминесценции в присутствии пробы по сравнению с контролем.

Базовые методы с использованием биферментной системы осуществляются смешиванием люциферазы, NADH:FMN-оксидоредуктазы и их субстратов. Модификации этих методов отличаются моментом ввода анализируемых веществ: до ини-

цирования реакции добавлением NADH или после достижения постоянного уровня свечения.

3.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО МЕТОДА ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ПИТЬЕВЫХ ВОД

В настоящее время среди исследователей не существует единого признанного объекта для оценки качества вод методом биотестирования. Довольно широко в качестве тест-объектов применяют микроорганизмы, и чаще всего метод оценки основывается на размножении бактерий в питательной среде. Вместе с тем эти методы имеют ряд серьезных недостатков, связанных, в первую очередь, с нестабильностью измеряемых контрольных характеристик живых организмов. Решением этой проблемы может быть создание системы биотестов, основанных на контроле за функциями живых организмов путем измерения биохимических параметров, например активности ключевых ферментов метаболизма. Такую систему биотестов можно создать на основе методов биолюминесцентного анализа, когда возможно измерение активности более чем 1000 различных ферментов. Преимуществами биолюминесцентных датчиков являются быстрое действие (время анализа - 3-5 мин), высокая чувствительность, малая погрешность измерения. Метод дает интегральную оценку качества воды, на основании которой делаются рекомендации о необходимости химического анализа. Биолюминесцентный метод может быть рекомендован для непрерывного экспресс-контроля состояния окружающей среды промышленных районов и природно-хозяйственных комплексов, для контроля залповых вредных выбросов предприятий, для оценки эффективности детоксикации сточных вод и работы очистных сооружений, а также для оценки экологической опасности предприятий и отдельных районов.

Рассмотрим перспективы использования люминесцентных биотестов *in vivo* и *in vitro* для экологического мониторинга. Для оценки действия на люминесценцию бактерий вод из рек,

озер и водозаборов использовали бактериальный индекс (БИ) или люциферазный индекс (ЛИ), измеряемые по величине I/I_0 , где I - интенсивность свечения после добавления анализируемого образца воды, I_0 - интенсивность люминесценции в контроле. Предварительно биолюминесцентные биотесты были откалиброваны по дистиллированной воде и образцам питьевой воды, соответствующим норме. При этом свечение бактерий и биферментной реакции изменялось в интервале 80 – 120 % по отношению к контролю, поэтому за "норму" этих параметров БИ и ЛИ был принят разброс 0,80-1,20.

Процент отклонения взятых образцов от "нормы"- РБИ или РЛИ определяли как отношение количества проб, не попадающих в заданный интервал 0,80-1,20, к общему количеству проб данного населенного пункта. Степень выраженности отклонений (СБИ или СЛИ) рассчитывали как отношение суммы отклонений БИ или ЛИ к общему числу отклонений. При оценке качества речной и питьевой воды одновременно с биолюминесцентными методами использовали для сравнения гостированный интегральный тест для определения качества поверхностных вод по окислительно-восстановительным характеристикам.

В экологических исследованиях биолюминесцентные тесты *in vivo* и *in vitro* взаимодополняют друг друга. Совместное использование биотестов позволяет расширить круг анализируемых токсикантов. В люциферазных биотестах действие токсических веществ происходит непосредственно на люциферазу - ключевой фермент метаболизма светящихся бактерий. В случае светящихся бактерий прямое влияние токсикантов на люциферазу невозможно из-за клеточных стенок и мембраны бактерий, препятствующих проникновению посторонних веществ в клетки, однако происходит влияние на другие важные процессы жизнедеятельности клетки (например, дыхание), так или иначе связанные с биолюминесценцией. При сравнении результатов биотестов *in vivo* и *in vitro* можно судить о механизмах воздействия токсических веществ. Использование не-

98

скольких биотестов одновременно гарантирует полное обследование водоемов и водозаборов на токсичность независимо от структуры и физико-химических свойств токсикантов, токсичных как для целого организма, так и для клеток и ферментов. При этом в присутствии токсических веществ свечение может как уменьшаться, так и увеличиваться. Показателем наличия в среде токсичности служит изменение интенсивности в сравнении со свечением в контроле.

Была изучена реакция биотестов при анализе воды реки Енисей, а также питьевых и поверхностных вод семи районов Алтайского края, пострадавших от взрывов в Семипалатинске. Результаты измерений определения общей токсичности вод с использованием светящихся бактерий и люциферазной реакции представлены на рис. 25 и 26 и в табл.5. Показано неблагоприятное состояние поверхностных и питьевых вод всех обследованных районов Алтайского края. Результаты биолюминесцентного биотестирования подтверждены данными химического и спектрального анализа (табл.5).

Аналогичные обследования проводили в г.Бийске Алтайского края (табл.6). Практически все пробы питьевой воды сильно влияли на интенсивность свечения биферментной системы, величины РЛИ очень высокие и лежат в интервале 98,1 – 100%.

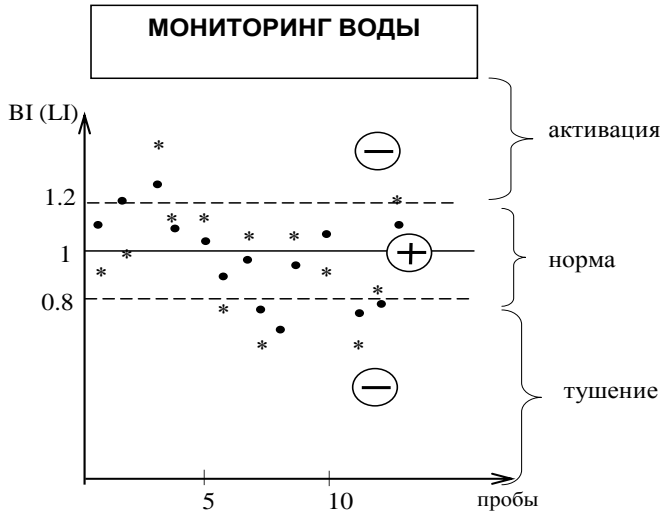


Рис.25. Принцип определения нормы токсичности водных объектов с помощью бактериального индекса и люциферазного индекса (БИ и ЛИ)

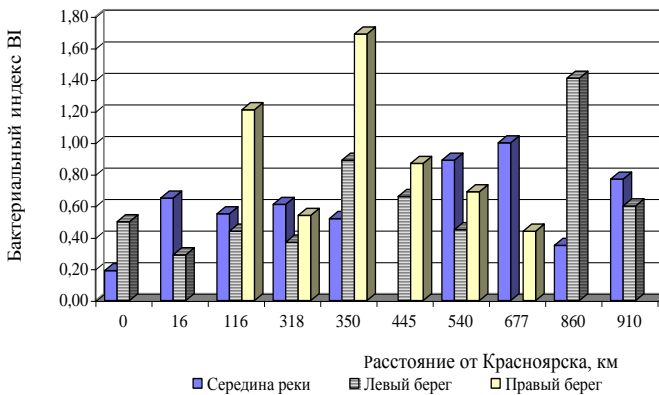


Рис.26. Биотестирование воды реки Енисей

Степень выраженности отклонения СЛИ также высокая и равняется 0,62 - 0,94, что значительно превышает СЛИ, рассчитанное для других районов Алтайского края. Примером может служить сравнение аналогичных показателей для проб питьевой воды села Угловское - РЛИ (10%) и СЛИ (0,45). В остальных районах СЛИ для питьевой воды не превышает +0,077, что почти в 10 раз ниже по сравнению с г.Бийском. Воды рек Катунь и Бии являются чистыми по результатам обоих методов. Анализ сточных вод промышленных предприятий показывает разную степень их токсичности.

Данные анализа качества воды разных промышленных районов говорят о том, что результаты биотестов *in vivo* и *in vitro* не коррелируют и зависят от состава и количества загрязняющих воду веществ, как, например, в районе г.Бийска, где наблюдалось увеличение свечения биферментной системы и практически не изменялась интенсивность свечения бактерий. В отличие от этих результатов, в других районах Алтайского края наблюдали либо ингибирование системы *in vitro* и *in vivo*, либо стимулирование *in vivo*. Очевидно, в условиях, когда неизвестны количество и качество загрязняющих веществ, целесообразно совместное использование биOLUMиНесцентных биотестов *in vivo* и *in vitro*.

БиOLUMиНесцентное биотестирование проводили в экспедициях на Енисее в 1993 и 1994 гг. Результаты анализа воды Енисея и прилегающих почв в районе сброса радиоактивных отходов Горно-химическим комбинатом показывают небольшие отклонения от нормы. Из взятых для анализа 19 проб питьевой воды значительные отклонения от нормы были в 13 пробах, из 56 проб воды р.Енисея и его притоков - в 16.

Таблица 5

Анализ результатов биотестирования
питьевых и поверхностных вод Алтайского края

СТАНЦИЯ	РЛИ, %	СЛИ	РБИ, %	СБИ	ПДК
с. Угловское	10	+0,45	75	-0,32;+0,32	1,5Fe
оз.Безымянное	40	-0,05	90	-0,24	8 фенол
оз.Лапуниха	0	0	10	+0,65	10фенол
оз.Ивановское	0	0	50	-0,06	40фенол
г.Рубцовск	20	+0,06;	50	+0,24;-0,23	2Al
пос.Веселоярск	60	+0,06	60	+0,76;-0,2	20фенол
р.Алей	25	+0,034	55	-0,5;+0,5	5 Mn
оз.Новенькое	80	0,056	100	+0,81	87фенол
пос.Поспелиха	35	+0,037	65	+0,25	4,5Fe
Пос.Шишуново	0	0	85	+0,31;-0,12	2.5Fe
с.Мамонтово	70	+0,077	90	+0,95;-0,49	5.2 B
оз.Большое	27	+0,067	100	-0,23	4Fe,5Al
оз.Горькое	100	+0,11	100	-0,37	20фенол
пос.Тальменька	60	+0,066	55	+0,22;-0,35	5Fe,7Mn
Пос.Магистраль- ный	90	+0,047	60	+0,46	5Fe, 2Mn

Примечание: РЛИ – процент отклонений от нормы; РБИ – процент отклонений от нормы РБИ; СЛИ – степень выраженности отклонений; СБИ – степень выраженности отклонений БИ

Таблица 6

Анализ результатов биотестирования
питьевых и поверхностных вод района г. Бийска

Станция	РЛИ,%	СЛИ	РБИ,%	СБИ
Основные водозаборы без хлорирования	100	+ 0,94	8	+ 0,04
Вода водопроводная	100	+ 0,62	91	- 0,21
Частные водозаборы	98	+ 0,76	9	+ 0,04
Воды разные	73	+ 0,53	21	- 0,03
Воды сточные	67	+ 0,33	88	+ 0,46
		- 0,09		- 0,16
Озеро Ковалевка	100	+ 0,14	100	+ 0,27
				- 0,47
				- 0,24

При сравнении результатов биолюминесцентных и окислительно-восстановительного тестов в определении качества питьевой воды из колодцев в населенных пунктах, расположенных по берегам р.Енисей, оказалось, что в 7 из 14 населенных пунктов все три теста дали близкую оценку качества воды. В пос.Кононово вода была чистая, а в поселках Балчуге, Нижнешадрино, Зотино, Ярцево и особенно в г.Лесосибирске и пос.Бор питьевая вода имела по всем тестам наибольшее отклонение от нормы. В остальных пунктах качество воды по окислительно-восстановительному тесту подтверждалось реакцией на бактериях. При оценке качества енисейской воды возле населенных пунктов наибольшее соответствие (совпадение в 11 пробах воды из 15) было получено между окислительно-восстановительным и бактериальными тестами. И хотя в большинстве случаев вода р.Енисей была охарактеризована как "чистая", отклонения от нормы чистоты по обоим тестам наблюдались возле острова Отдыха г.Красноярска, за Лесосибирском и пос.Ярцево и Бор. Люциферазный тест во всех 15 пробах не дал отклонения от нормы.

В экспедиции 1994 г. забор воды делали из поперечных разрезов русла и в качестве отдельных проб на определенных участках течения реки. В люциферазном биотесте отличия от "нормы" ЛИ были в 8 пробах вод, взятых ниже г.Красноярска по течению реки в местах загрязнения промышленными стоками предприятий. Исследование качества воды с помощью бактериального и окислительно-восстановительного биотеста показало, что пробы, взятые в черте г.Красноярска и ниже по течению до 370 км, а также возле городов Лесосибирска, Новоенисейска и Енисейска, имеют существенные отклонения от нормы. Полученные результаты показывают, что в отличие от теста на бактериях люциферазный биотест практически не чувствует загрязнения Енисей. Этот пример наглядно демонстрирует необходимость совместного использования нескольких биотестов для получения корректной оценки токсичности воды.

3.4. БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОТЕСТЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ПРИРОДНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Отличительной особенностью нового направления экологического мониторинга - ферментативных биотестов по сравнению с биотестами, выполненными на живых организмах, является возможность варьировать их чувствительность, изменяя условия проведения анализа, а именно состав реакционной смеси (количество ферментов и субстратов, объем добавляемой токсической смеси) и последовательность добавления компонентов реакции (использование прямой или обратной АДГ-реакции и т.д.). Все это относится и к уже разработанным биотестам на моно-, би- и трехферментных системах, и к новым ферментативным биотестам, которые могут быть созданы в соответствии с концепцией люциферазного биотестирования. Разработку новых методов проводили на модельных веществах, изучая механизмы влияния модельных ксенобиотиков на биолюминесцентные реакции (см. гл. 2).

При переходе к реальным водным экосистемам необходимо было откорректировать условия проведения биотестирования для обеспечения такой чувствительности ферментативных биотестов, при которой биотесты не реагировали бы на естественную сезонную изменчивость характеристик воды природного водоема, но при этом сохранялась бы реакция биотестов на острую токсичность в результате загрязнения водоема поллютантами и «цветения» сине-зелеными водорослями.

Исследование состояло из нескольких этапов:

1. Изучение влияния сезонных изменений характеристик воды природного водоема на реакцию биотеста. Изменение параметров ферментативных биотестов под действием воды из эпилимниона и гипolimниона данной водной экосистемы считается за фоновое.

2. Исследование реакции ферментативных биотестов и коррекция их чувствительности в ответ на загрязнение воды ксенобиотиками в модельных микроэкосистемах.

3. Исследование реакции ферментативных биотестов при «цветении» водоема сине-зелеными водорослями.

Все исследования проводили с использованием четырех биолюминесцентных биотестов: биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза, триферментных реакций с алкогольдегидрогеназой (АДГ) и трипсином и биотеста на светящихся бактериях.

3.4.1. Изучение влияния сезонных характеристик воды природного водоема на реакцию биолюминесцентных биотестов

Для изучения влияния сезонных изменений характеристик воды на реакцию биотестов в норме была выбрана водная экосистема лесного пруда, в котором по данным химического анализа в течение всего летнего сезона 1995 г. не наблюдалось загрязнения ксенобиотиками. На рис. 27 показана динамика сезонных изменений таких характеристик экосистемы, как температура, растворенный кислород, биомасса фитопланктона. Температура воды в пруду имела обычные летние колебания (рис.27,а). Термоклин в июне и июле располагался на глубине 4 м. Температура гипolimниона (уровень ниже термоклина) была на 4-10°C ниже, чем эпилимниона (уровень выше термоклина). В августе из-за испарения воды глубина водоема уменьшилась, что привело к снижению разницы между температурой эпилимниона и гипolimниона. Содержание растворенного кислорода было значительно выше для эпилимниона (рис.27,б). Видовой и количественный состав фитопланктона в течение сезона менялся. Доминирующими были зеленые водоросли *Volvox aureus* Ehr. и диатомовые *Cyclotella comta* (Ehr.) Kutz. “Цветение” *V. aureus* было отмечено в середине июля и в середине августа (рис.27,в). *C. comta* доминировали в середине июня, когда температура воды была сравнительно низкой. В

конце июля и начале августа температура воды незначительно уменьшилась (рис.27,а) и *S. Comta* на этот период были доминирующими. Образцы воды из гиполимниона только дважды в июне и июле обрабатывались на фитопланктон. В отличие от эпилимниона, доминирующими зелеными и диатомовыми видами в гиполимнионе были *Stephano-discus hantzschii* Grun. и *Closterium peracerozum*. Эти данные свидетельствуют о реально существующих различиях качества воды и гиробиологических характеристик в эпилимнионе и гиполимнионе лесного пруда, что указывало на необходимость изучения реакции биOLUMИ-несцентных биотестов на воду в этих двух частях экосистемы пруда.

Реакция биотеста на светящихся бактериях (рис.28) менялась в течение сезона: в начале сезона наблюдалось стимулирование свечения бактерий и отсутствие различий между эпилимнионом и гиполимнионом, начиная с 1 июля, вода из гиполимниона сильнее ингибирует свечение бактерий. В конце сезона для воды из гиполимниона остаточное свечение составляет всего 30 %. Скомпенсировать каким-либо образом влияние сезонных изменений характеристик воды на светящиеся бактерии не удалось.

В отличие от теста *in vivo* во всех трех ферментативных биотестах путем изменения концентраций компонентов реакционной смеси удастся подобрать такую чувствительность, когда реакция биотеста на сезонные изменения характеристик воды практически не наблюдается (рис.28).

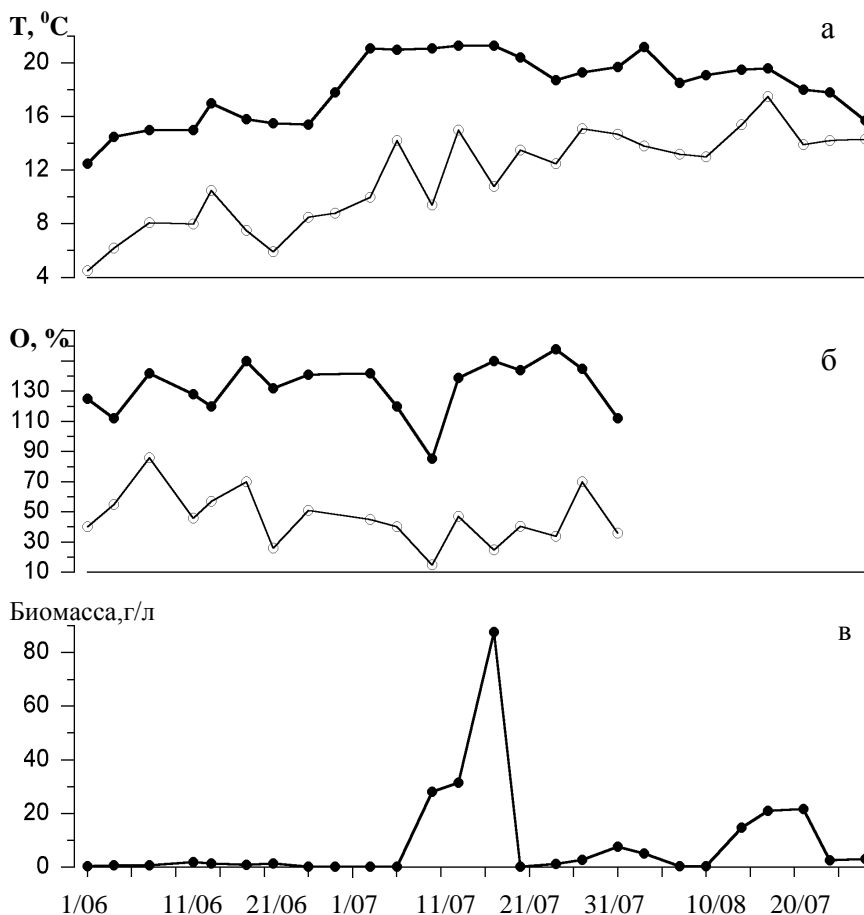


Рис. 27. Динамика компонентов, характеризующих экосистему пруда:

● - эпилимнион; ○ - гипolimнион

Важно было также подобрать условия проведения биотестов таким образом, чтобы не было различий между эпилимнионом и гипolimнионом. В таком подборе использовали парный Т-критерий Вилкоксона. Только тест на светящихся бактериях оказался настолько чувствительным, что показал достоверные различия для воды из эпилимниона и гипolim-

ниона $p < 0.05$ (табл.7). Реакция ферментативных тестов на воду из эпилимниона и гипolimниона достоверно не различалась: $p > 0.05$. Таким образом, в данной работе было показано, что основное различие биolumинесцентных тестов *in vivo* и *in vitro* состоит в возможности изменения чувствительности ферментативных тестов в зависимости от решаемой задачи, тогда как для изменения чувствительности бактерий нужно проводить специальные исследования. В нашем случае биотест на светящихся бактериях реагировал даже на незначительные колебания качества воды.

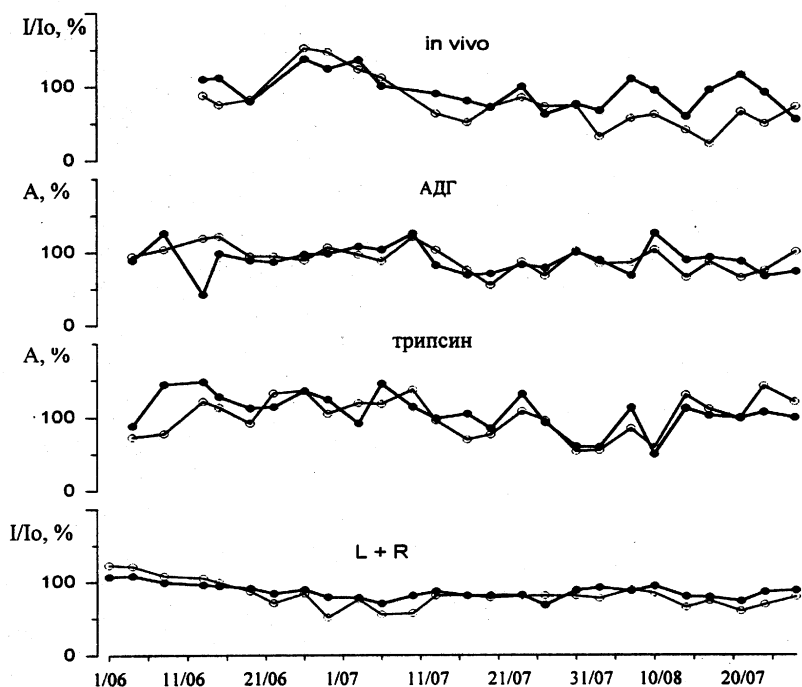


Рис. 28. Параметры биolumинесцентных биотестов при изучении воды из пруда:

● - эпилимнион; ○ - гипolimнион

Чувствительность ферментативных биотестов была установлена так, чтобы не происходило изменения параметров ферментативных тестов даже в периоды “цветения” зеленых водорослей *V. aureus*, метаболиты которых не токсичны. По-видимому, изменениями рН, растворенного кислорода, NO₂, NO₃, NH₄ и т.д. можно объяснить небольшие изменения параметров ферментативных биотестов, причем корреляция между параметрами биотестов и изменением какого-либо отдельного компонента, характеризующего экосистему, отсутствует. Скорее всего, именно совокупность этих компонентов определяет полученные небольшие колебания в параметрах ферментативных биотестов.

Таблица 7

Параметры парного Т-критерия Вилкоксона для показаний биотестов, полученных для воды из эпилимниона и гиполимниона природного водоема

БИОТЕСТ	р	M ₁	M ₂	Σ	T
Бактерии	< 0.05	105.7	83.3	253	40.5
L+R	> 0.05	86.5	81.79	300	86.5
L+R+АДГ	> 0.05	90.41	91.92	300	140.5
L+R+трипсин	> 0.05	106.2	99.8	300	105

Примечание. M₁ – среднее значение для эпилимниона; M₂ – среднее значение для гиполимниона; Σ - сумма рангов

Таким образом, было показано, что для разработанных на модельных веществах ферментативных биотестов может быть установлена такая чувствительность биотестов, чтобы не наблюдать сезонные изменения характеристик воды экосистемы пруда.

Следующий этап работы – определение чувствительности ферментативных биотестов к изменению характеристик экосистемы пруда при загрязнении его ксено-биотиками и при «цветении».

3.4.2. Изучение реакции биотестов на загрязнение водоема ксенобиотиками

Для изучения реакции четырех биолюминесцентных биотестов на загрязнение водоема ксенобиотиками был проведен эксперимент на модельных экосистемах (МЭС). В работе исследовали три МЭС, различающиеся по видовому и количественному составу фитопланктона. В течение всего эксперимента в МЭС 2 и МЭС 3 доминировали зеленые нитчатые водоросли *Ulotrix tenerrima* Kütz., *Ulotrix variabilis* Kütz., *Spirogyra varyans* (Hass.) Kütz. and *Spirogyra tenuissima* (Hass.) Kütz. В МЭС 1 в течение первых 17 дней доминирующим видом была нитчатая диатомовая водоросль *Fragillaria virescens* Ralfs., затем доминировать стала зеленая нитчатая водоросль *U.variabilis*. В целом для всех МЭС была характерной замена планктонного сообщества диатомовых и зеленых микроводорослей на более простое по составу сообщество нитчатых водорослей, являющихся обрастателями. Изменения концентрации биомассы водорослей в МЭС показаны на рис.29, где представлены динамики реакции биолюминесцентных биотестов в этом эксперименте. Образцы воды, взятые из МЭС, большую часть времени стимулировали свечение бактерий в биотесте *in vivo*. Так, для МЭС 2 и 3 активация свечения в конце эксперимента составляла 250 %. Однако корреляции между биолюминесценцией бактерий и общей биомассой фитопланктона в МЭС не обнаружено. Факт изменения реакции биотеста на бактериях требует специального более детального исследования.

Образцы воды, взятые из МЭС, лишь незначительно изменяли относительную активность трипсина и практически не меняли остаточное свечение I/Lo биферментной системы в течение всего эксперимента (рис.29,30). Реакция биотеста с АДГ была более сложной: наблюдали периоды незначительного стимулирования и ингибирования активности АДГ (рис.29). Однако, в отличие от биотеста *in vivo*, все колебания параметров ферментативных биотестов оставались в пределах уста-

110

новленной для данного водоема нормы. Кроме того, реакция ферментативных биотестов на образцы воды, взятые из разных МЭС, была практически одинаковой. В этих экспериментах, моделирующих происходящие в лесном пруду процессы, была проверена правильность подобранных для биотестов *in vitro* условий, обеспечивающих измерение контрольного уровня качества воды водных экосистем.

В последнюю неделю эксперимента в МЭС 1 был добавлен бензохинон (10 мг/л), показания биотестов для МЭС 2 и МЭС 3 являлись контрольными. Для образцов воды, взятых из МЭС 1, резко изменились параметры всех биотестов, в то время как для МЭС 2 и МЭС 3 изменения параметров ферментативных биотестов оставались незначительными (рис.30, 31).

Для МЭС 1 биотест, основанный на биферментной системе, показал уменьшение интенсивности свечения, увеличение времени выхода свечения на максимум t и появление индукционного периода T в первый день интоксикации (рис.31).

Биотест, основанный на светящихся бактериях, показал полное ингибирование свечения ($I=0$) для образцов воды, взятых из МЭС 1 (рис.30). Возможно, это связано с тем, что бензохинон действует на целый ряд параметров жизнедеятельности бактерий: угнетение дыхания и других окислительно-восстановительных процессов в клетке, разрушение мембранных структур клетки и т.д. Поскольку в биотесте используется единственный параметр жизнедеятельности клеток – люминесценция, то более определенно говорить о механизмах действия ксенобиотика на бактерии нельзя.

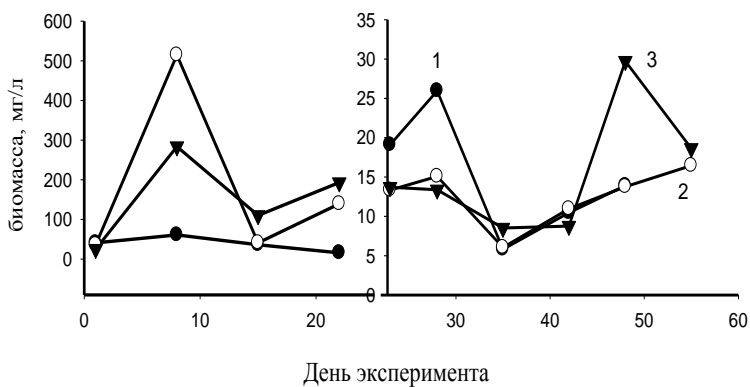


Рис.29. Динамика биомассы водорослей в экспериментальных микроэкосистемах: 1, 2, 3 – МЭС 1, 2, 3 соответственно

Биотесты с АДГ и трипсином продемонстрировали уменьшение относительной активности этих ферментов при добавлении в реакционную смесь воды из МЭС 1 (рис.30).

Итак, эксперименты на модельных экосистемах показали, что при загрязнении МЭС ксенобиотиками параметры всех четырех биOLUMиНесцентных тестов резко меняются. Таким образом, ферментативные биотесты, настроенные на максимальную чувствительность к действию модельных ксенобиотиков, оказались чувствительными к загрязнению ксенобиотиками реальных водных экосистем. Причем механизмы ингибирующего действия поллютантов на биOLUMиНесцентные ферментативные реакции, по-видимому, одинаковы для модельных растворов веществ и для реальных водных экосистем.

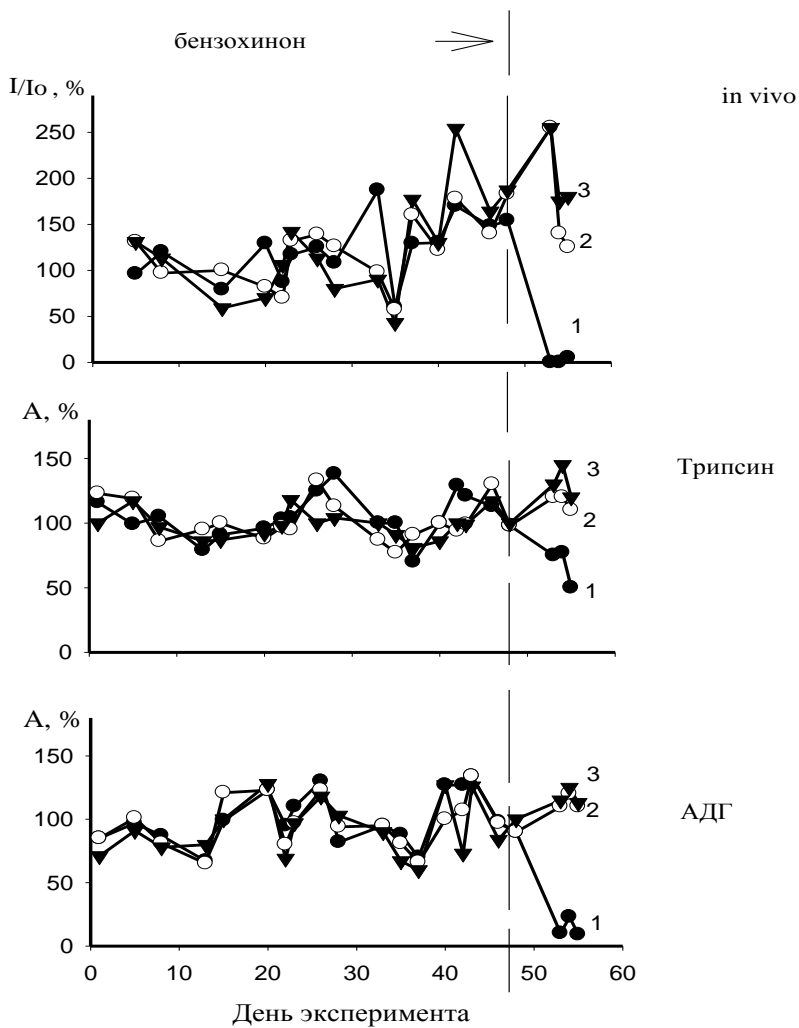


Рис.30. Динамика параметров биотестов на светящихся бактериях, трипсине и АДГ для экспериментальных микроэкосистем.
Стрелкой показан момент внесения в МЭС 1 бензохинона

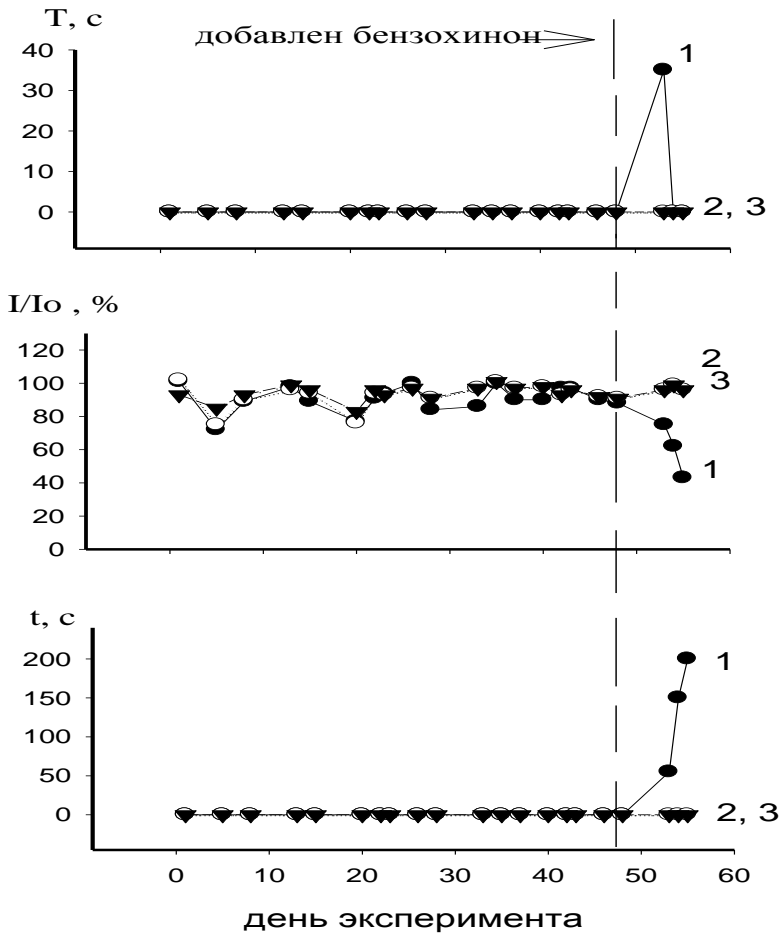


Рис.31. Динамика параметров биотеста на биферментной системе для экспериментальных микроэкосистем.

Стрелкой показан момент внесения в МЭС 1 бензохинона

Однако существует еще одна проблема водоемов, которая также может изменить реакцию биотестов – “цветение”.

4.4.3. Изучение реакции биотестов на «цветение» водоема сине-зелеными водорослями

По мнению многих авторов, именно «цветение» сине-зеленых водорослей характеризует состояние экосистемы. Так, на примере фенола было показано, что «цветение» сине-зеленых водорослей определяет скорость и кинетику биodeградации ксенобиотиков. Кроме того, известно, что метаболиты сине-зеленых водорослей являются токсичными, поэтому в систему ферментативных тестов необходимо включить биотесты, чувствительные к данным веществам.

Поскольку в исследуемом водоеме «цветения» сине-зеленых не наблюдалось, для моделирования реакции биотестов на «цветение» сине-зеленых использовали лабораторную культуру сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*.

Динамика показаний биотестов и роста микроводорослей *Spirulina platensis* представлена на рис.32. Видно, что в течение всего периода роста водорослей реакция биотеста, основанного на биферментной реакции, менялась незначительно. Из данных, полученных для триферментных систем, видно, что в течение первых дней роста микроводоросли выделяют метаболиты, ингибирующие активность АДГ и стимулирующие активность трипсина. После четырех дней роста активность трипсина в присутствии культуральной среды микроводорослей не меняется. Реакция биотестов на культуральную среду микроводорослей была одинаковой для всех трех повторностей, что говорит о хорошей повторяемости ферментативных биотестов. Наиболее чувствительным оказался биотест, основанный на АДГ: на 8-й и 9-й дни роста водорослей ингибирование триферментной реакции с АДГ достигало 95%.

Два компонента культуральной среды микроводорослей могут менять реакцию биотестов. Это минеральные соли, входящие в состав питательной среды водорослей, и метаболиты, выделяемые водорослями в процессе жизнедеятельности.

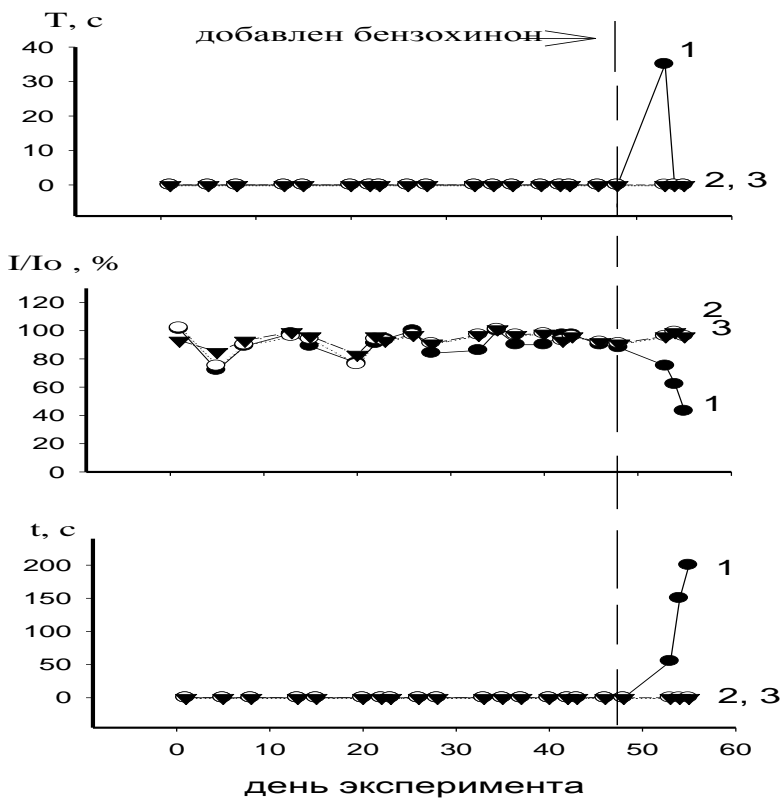


Рис 32. Рост биомассы водорослей *Spirulina platensis* и реакция ферментативных биолюминесцентных биотестов на культуральную среду данной микроводоросли: ▽ - действие питательной среды в начале эксперимента; ○, □, Δ – три повторности

Минеральные соли потребляются водорослями в процессе роста, таким образом, их вклад в ингибирование ферментативной активности уменьшается. Следовательно, падение относительной активности АДГ можно объяснить именно накоплением метаболитов, являющихся ингибиторами АДГ, в конце экспоненциальной фазы роста водорослей.

Результаты биотеста с трипсином объясняются, по-видимому, накоплением в культуральной среде ингибиторов протеаз в первые 4 дня роста водорослей.

Таким образом, показано, что исследуемые ферментативные тесты различаются по чувствительности к компонентам культуральной среды микроводорослей *Spirulina platensis*. Наиболее перспективными для изучения «цветущих» водоемов надо признать триферментные системы, но при этом биотест с трипсином лучше использовать на начальном этапе «цветения» сине-зеленых водорослей, а биотест с АДГ можно использовать в течение всего периода роста сине-зеленых водорослей.

Итак, подобрана оптимальная чувствительность биотестов, при которой они не реагируют на изменения качества воды, связанные с сезонной динамикой гидробиологических характеристик водной экосистемы, но отзываются на загрязнение водоема ксенобиотиками или «цветение» водоема сине-зелеными водорослями. Рекомендуется использовать данные биотесты в качестве сигнальной системы для определения острой токсичности водоемов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Вопросы к главе 1

1. Что такое волновая функция?
2. Какой пространственный вид имеют орбитали атомов?
3. Что такое квантовые числа? Дать определения.
4. Каков механизм образования молекулярных орбиталей из атомных? Связывающие и разрыхляющие орбитали.
5. В чем заключается периодичность свойств атомов?
6. Что такое люминесценция, флуоресценция, фосфоресценция, фотолюминесценция, хемилюминесценция, биолюминесценция?
7. Что такое электронная структура молекул?
8. Какие виды молекулярных орбиталей существуют? Какие электронные переходы и возбужденные состояния они могут формировать?
9. На какие классы можно разбить молекулы по орбитальному признаку?
10. Что такое мультиплетность?
11. Какие электронные переходы молекул являются разрешенными? Запрещенными? Проиллюстрировать на примере молекул класса *σππ*.
12. Каков основной принцип классификации молекул по спектрально-люминесцентным свойствам?
13. Что такое синглет-триплетное расщепление? Внутренняя конверсия? Интеркомбинационная конверсия?
14. Каковы времена жизни и константы переходов разрешенных переходов? Запрещенных переходов? Эмпирическое правило ЭльСаэда.
15. Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам и ее применение.
16. Какие физические механизмы тушения люминесценции в растворах Вы знаете? Что такое абсорбция света?
17. Хемилюминесценция и биолюминесценция.

Вопросы ко главе 2

1. Что такое биотесты? Каковы перспективы их использования?
2. Какие элементарные физические процессы Вы можете перечислить?
3. Что такое сенсibiliзирoванная флуоресценция? Как ее можно получить в биолюминесцентной реакции?
4. Как проявляется «эффект тяжелого атома» в биолюминесцентной реакции?
5. Каков механизм влияния катионов металлов на интенсивность биолюминесценции ферментативной реакции?
6. Каков механизм изменения кинетики биолюминесцентной реакции органическими окислителями?

Вопросы к главе 3

1. Что такое биотестирование? Каковы преимущества биотестов по сравнению с химическим анализом?
2. Какие светящиеся организмы используются в биотестировании?
3. Какие основные параметры свечения используются для определения биологической опасности различных сред?
4. Какая существует связь между показаниями биотестов и вредным воздействием токсикантов на организм человека?
5. Какие существуют способы увеличения чувствительности биотестов?
6. Какие модификации ферментативных биолюминесцентных биотестов Вы знаете?
7. Почему при проведении биотестирования следует использовать систему биотестов?

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N1 (2 ЧАСА). КИНЕТИКА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗой

Схема химической реакции, катализируемая ферментом «бактериальная люцифераза», представлена на рис.32.

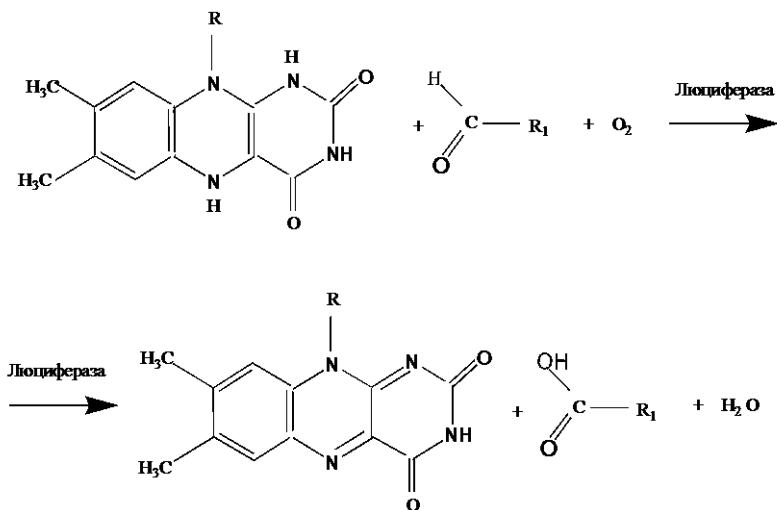


Рис.32. Биолюминесцентная реакция и ее компоненты

В данной реакции происходит окисление восстановленного флавинмононуклеотида (FMNН₂) и длинноцепочечного алифатического альдегида кислородом воздуха до окисленного флавинмононуклеотида (FMN) и жирной кислоты. Катализатор – бактериальная люцифераза. В предыдущих исследованиях показано, что спектр биолюминесценции, соответствующий данной реакции, совпадает со спектром фотолюминесценции молекулы гидроксифлавина, которая обнаружена в качестве промежуточного продукта этой реакции. В связи с этим пред-

120

полагается, что именно это соединение является эмиттером биоломинесценции. Структурная формула гидроксифлавина приведена на рис.15а. Спектр биоломинесценции показан на рис.18-19.

$FMNH_2$ получают фотовосстановлением FMN в присутствии ЭДТА видимым светом в змеевике (рис.33) с водяным охлаждением. В качестве источника света используется обычная настольная лампа. Затем через дозатор $FMNH_2$ поступает в кювету с реакционной смесью, предварительно помещенную в биоломинометр, и запускает биоломинесцентную реакцию. Световой сигнал регистрируется по индикаторному табло биоломинометра или с помощью самописца.

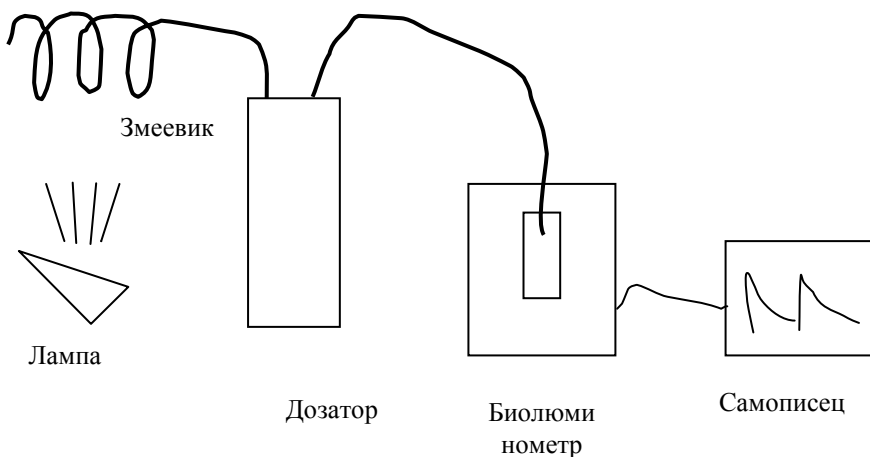


Рис.33. Установка для регистрации биоломинесценции (моноферментная система)

Биолюминометр сконструирован в СКТБ "Наука" (Красноярск). Основа биолюминометра - фотоэлектронный умножитель (ФЭУ), который преобразует световой сигнал в электрический и усиливает его. Используемый в данном биолюминометре ФЭУ имеет максимум чувствительности при 410 нм и рабочий диапазон 300-600 нм. Биолюминометр регистрирует суммарный световой поток со всего рабочего диапазона.

Цель работы состоит в регистрации люминесценции биолюминесцентной реакции

Используемые реактивы и растворы:

- тетрадеканаль, спиртовой раствор 0.25 об.%;
- деканаль, спиртовой раствор 0.25 об.%;
- флаavinмоноклеотид (FMN), (54 мкМ раствор в 0.01 М ЭДТА);
- препарат фермента;
- фосфатный буфер 0.02М, рН 7.0.

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. 5 мкл препарата люциферазы;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, рН 7.0;
4. 300 мкл FMNH₂.

Ход работы

Перед началом работы готовят нужные концентрации реактивов.

1. 50 мкл 0.25%-ного спиртового раствора тетрадеканала разводят в 100 раз фосфатным буфером (добавляется 5 мл буфера).

2. К стандартной упаковке препарата люциферазы добавляется 0.5 мл буфера. Измерение свечения должно производиться

не раньше чем через 10 мин после разведения фермента буфером.

В стеклянную кювету с помощью микропипеток со сменными наконечниками помещают в указанном для реакционной смеси порядке (1-2-3) указанные объемы растворов реактивов. Кювета помещается в кюветное отделение биOLUMинометра и устанавливается напротив ФЭУ с помощью пружинной крышки биOLUMинометра. Реакция запускается после нажатия кнопки дозатора порцией FMNH₂. Одновременно с кнопкой дозатора надо запустить самописец. Наблюдать отклонение пера самописца. Повторить несколько раз до получения сопоставимых отклонений. Измерить интенсивность I₀ биOLUMинесцентного сигнала в милливольтгах, а также ширину кинетической кривой при интенсивности, равной половине максимальной τ_{1/2}, в секундах.

Использовать вместо тетрадеканалья деканаль. Повторить эксперименты. Регистрировать изменение I₀ и τ_{1/2}.

*ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N2 (2 ЧАСА).
КИНЕТИКА БИОЛУМИНЕСЦЕНТНОЙ
БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ
ЛЮЦИФЕРАЗА - NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА*

Данная биOLUMинесцентная система отличается от рассмотренной в лабораторной работе N1 тем, что восстановление FMN до FMNH₂ здесь осуществляется не фотохимическим путем, а в результате реакции, катализируемой ферментом NADH:FMN-оксидоредуктаза:



С помощью этой реакции в системе на протяжении довольно большого интервала времени происходит постоянная

наработка FMNН₂, в результате чего поддерживается постоянное (стационарное) свечение.

Цель работы состоит в регистрации кинетики биолюминесценции биферментной системы.

Используемые реактивы и растворы:

- тетрадеканаль, спиртовой раствор 0.25 об.%;
- ферменты - комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ). В состав КРАБа входят препарат бактериальной люциферазы и NADH:FMN-оксидоредук-тазы;
- фосфатный буфер 0.02M, pH 7.0;
- никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH).

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. 5мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 M фосфатного буфера, pH 7.0;
4. 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ M раствора NADH;
5. 50 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ M раствора FMN.

Ход работы

Перед началом работы готовят нужные концентрации реактивов.

1. Для получения 0.0025% раствора тетрадеканалья 50 мкл 0.25%-ного спиртового раствора тетрадеканалья разводят в 100 раз фосфотным буфером (добавляется 5 мл буфера).

2. К стандартной упаковке препарата КРАБа добавляется 0.5 мл буфера. Измерение свечение должно производиться не раньше чем через 10 мин после разведения ферментов буфером.

3. Приготовить раствор NADH концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ M. (Молекулярная масса NADH (соль Na) равна 709.) Для этого сначала на аналитических весах взвесим m граммов NADH

($0,001\text{г} < m < 0,002\text{г}$). Затем рассчитаем количество миллилитров воды (x мл), которые надо добавить к m граммам навески, пользуясь пропорцией:

$4 \cdot 10^{-4} \cdot 709$ граммов NADH должно содержаться в 1000 мл раствора
 m ----- x

$$x = \frac{1000m}{4 \cdot 10^{-4} \cdot 709} = \frac{10^7 m}{2836}.$$

Если $0,001\text{г} < m < 0,002\text{г}$, то x должно находиться в интервале приблизительно от 3 до 6 мл.

В стеклянную кювету с помощью микропипеток со сменными наконечниками помещают в указанном для реакционной смеси порядке (1-5) указанные объемы растворов реактивов. Кювета помещается в кюветное отделение биолюминометра. Включается самописец. Регистрируется свечение, которое постепенно выходит на максимальный стационарный уровень. Измеряются интенсивность стационарного свечения I_0 и время выхода на максимум t . Повторить несколько раз. Получить 6-8 сопоставимых результатов. Рассчитать средние величины этих параметров и среднеквадратичное отклонение.

*ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N3 (4 ЧАСА).
ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИЙ
СУБСТРАТОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ*

Как указывалось выше, скорость любой химической реакции, в том числе и биолюминесцентной, при небольших концентрациях реагирующих веществ определяется законом действия масс, т. е. растет с ростом концентраций реагентов. Для биолюминесцентных реакций существуют оптимальные концентрации реагентов, выше которых наблюдается уменьшение выхода биолюминесценции, образующееся в химическом процессе. Молекулы FMN, например, как многие красители, могут образовывать нелюминесцентные ассоциаты как между собой, так и со свои-ми производными, связанными с ферментом; избыточные количества алифатического альдегида способны блокировать гидрофобные и гидрофильные участки фермента, препятствуя проведению химической реакции, и т.д.

Цель работы состоит в изучении зависимости интенсивности биолюминесценции биферментной системы от концентраций реагирующих веществ - FMN, альдегида, NADH, фермента.

Используемые реактивы и растворы:

- тетрадеканаль, спиртовой раствор 0.25 об.%;
- ферменты - комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ). В состав КРАБа входят препарат бактериальной люциферазы и NADH:FMN-оксидоредук-тазы;
- фосфатный буфер 0.02M, pH 7.0;
- никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH);
- флавиномононуклеотид (FMN), водный раствор ($5,4 \cdot 10^{-4}$ M).

Ход работы

Как и в лабораторной работе N2, предварительно готовят нужные концентрации реактивов:

1. 0.025%-ный водный раствор альдегида;
2. раствор КРАБа в 0.5 мл буфера;
3. $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора NADH.

а) Зависимость интенсивности биолюминесценции биферментной системы от концентрации FMN.

Варьируем концентрацию FMN, изменяя объем добавляемого раствора FMN от 2 до 200 мкл (8-10 точек).

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. 5 мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, pH 7.0;
4. 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора NADH;
5. 2-200 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора FMN.

Строим зависимость интенсивности биолюминесценции (I) от концентрации FMN (C) в молях на литр (молярность, M).

б) Зависимость интенсивности биолюминесценции биферментной системы от концентрации тетрадеканала.

Варьируем концентрацию тетрадеканала, изменяя объем добавляемого раствора альдегида от 2 до 200 мкл (8-10 точек).

Состав реакционной смеси:

1. (2-200) мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида(тетрадеканаля);
2. 5 мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, рН 7.0;
4. 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора NADH;
5. 50 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора FMN.

Строим зависимость интенсивности биолюминесценции (I) от концентрации альдегида (С, М).

в) Зависимость интенсивности биолюминесценции биферментной системы от концентрации NADH.

Варьируем концентрацию NADH, изменяя объем добавляемого раствора альдегида от 5 до 200 мкл (3-5 точек).

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. 5 мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, рН 7.0,
4. 5-200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора NADH;
5. 50 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора FMN.

Приготовить другую концентрацию NADH $4 \cdot 10^{-3}$ М (1 мл). Провести измерения, добавляя в реакционную смесь 50, 100 и 200 мкл раствора этой концентрации NADH. Построить зависимость интенсивности биолюминесценции (I) от концентрации NADH (С, М).

г) Зависимость интенсивности биолюминесценции биферментной системы от концентрации фермента.

Варьируем концентрацию фермента, изменяя объем добавляемого раствора фермента от 2 до 50 мкл (6-8 точек).

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. (2-50) мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, рН 7.0;

4. 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора NADH;

5. 50 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора FMN.

Строим зависимость интенсивности биолюминесценции (I) от количества КРАБа (мл).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N4 (4 ЧАСА).

ДЕЙСТВИЕ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ МОЛЕКУЛ КРАСИТЕЛЕЙ

Молекулы красителей принадлежат к V спектрально-люминесцентной группе (см. табл. 2) и характеризуются короткоживущей ($\tau_0 \approx 10^{-7} - 10^{-10}$ с) эффективной флуоресценцией π, π^* - (или n, π^*)-типа. Типичный представитель красителей - родамин 6Ж. Квантовый выход его флуоресценции в водных и спиртовых растворах достигает 1. Спектр поглощения и флуоресценции родамина 6Ж приведены на рис.34. Здесь же показан спектр биолюминесценции.

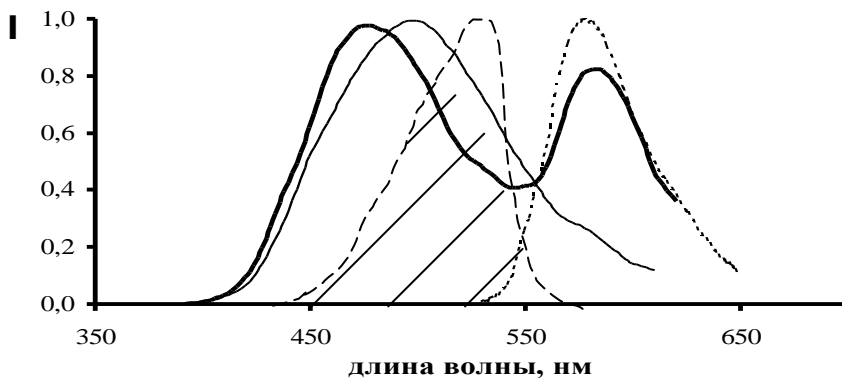


Рис.34. Спектр биолюминесценции (—————)

Спектр поглощения родамина 6Ж в воде (-----)

Спектр флуоресценции родамина 6Ж в воде (.....)

Спектр биолюминесценции в присутствии родамина 6Ж (—————)

Заштрихованная площадь на рис.34 - перекрытие спектров поглощения родамина 6Ж и биолюминесценции, определяющее эффективность межмолекулярного переноса энергии ($S_{\text{БЛ}}^* \rightarrow S_{\text{родамина}}^*$, где $S_{\text{БЛ}}^*$ - нижнее синглетное возбужденное состояние эмиттера биолюминесценции, $S_{\text{родамина}}^*$ - нижнее синглетное возбужденное состояние молекулы родамина), а также эффективность абсорбции биолюминесценции молекулами родамина. На этом же рис.34 показан спектр биолюминесценции в присутствии родамина 6Ж. Коротковолновый пик в этом спектре - биолюминесценция, а длинноволновый - сенсibilизированная люминесценция родамина.

Цель работы состоит в регистрации сенсibilизированной люминесценции родамина 6Ж в биолюминесцентной биферментной системе.

Ход работы

Используемые растворы те же, что и в работе N2.

Приготовить 10^{-5}M раствор родамина 6Ж.

Провести 2-3 контрольных замера биолюминесцентного сигнала без родамина. Затем добавлять различные объемы этого раствора (5 – 50 мкл) в биолюминесцентную систему перед FMN (6-8 точек).

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025% -ного водного раствора альдегида;
2. 5 мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, рН 7.0;
4. 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}\text{M}$ раствора NADH;
5. 0-50 мкл р-ра родамина 6Ж ($C=10^{-5}\text{M}$). Нулевая концентрация родамина соответствует контрольному замеру;
6. 50 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}\text{M}$ раствора FMN.

Построить зависимость интенсивности биолюминесценции в относительных единицах (I/I_0 , где I_0 - интенсивность биолю-

минесценции в контрольном опыте: I - интенсивность биолюминесценции при различных концентрациях родамина) от концентрации родамина 6Ж (С,М).

Повторить эксперимент, используя светофильтр ОС-13, отсекающий всю область длин волн короче 550 нм. Сравнить полученные результаты.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N5 (6 ЧАСОВ).

ДЕЙСТВИЕ НЕЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Нелюминесцирующие при комнатной температуре (нефлуоресцентные) соединения принадлежат к II-IV спектрально-люминесцентным группам (см.табл.2). Соединения I спектрально-люминесцентной группы характеризуются малыми выходами флуоресценции. Соединения этих групп не влияют на положение и форму спектра биолюминесценции, однако изменяют общий выход свечения.

Нелюминесцентные соединения могут влиять на биолюминесценцию как в результате воздействия на химической стадии процесса, так и на стадии дезактивации образовавшихся электронно-возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции в результате абсорбции света или переноса энергии.

Рассмотрим подробнее процессы тушения электронно-возбужденных состояний биолюминесценции в результате переноса энергии. Эти молекулы могут акцептировать, а могут и не акцептировать энергию флуоресцентного состояния эмиттера биолюминесценции. На рис.35 представлены 2 типа молекул с различным положением возбужденных состояний относительно S_{π, π^*} -уровня эмиттера биолюминесценции. Межмолекулярный S-S перенос не может осуществляться для молекулы антрахинона.

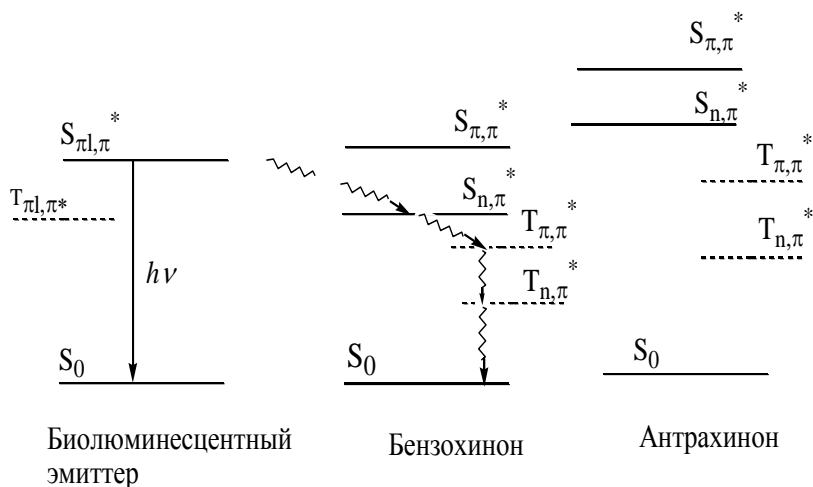


Рис.35. Относительное расположение уровней энергии эмиттера биолюминесценции, бензохинона и антрахинона и межмолекулярный перенос энергии

При больших концентрациях тушителей возможно сближение и взаимодействие электронных оболочек соединений и молекул эмиттера. Этот процесс можно рассматривать как образование короткоживущих нелюми-несцентных ассоциатов.

Цель работы - получить зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации нелюминесцентных соединений.

Используем моноферментную биолюминесцентную реакцию, освоенную нами в лабораторной работе N1.

Ход работы

Перед началом работы проверяют готовность установки, готовят нужные концентрации растворов тетрадеканала, люциферазы.

Приготовить раствор 10^{-4} М раствор бензохинона в воде и $0.5 \cdot 10^{-3}$ М раствор антрахинона в этаноле. При необходимости раствор антрахинона подогреть. Затем развести раствор антрахинона в 10 раз водой, получив водно-спиртовой раствор антрахинона.

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. 5 мкл препарата люциферазы;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, рН 7.0;
4. 0-50 мкл раствора бензохинона или антрахинона (0 мкл - контрольное измерение);
5. 300 мкл FMNH₂.

В начале и в конце исследования провести контрольные замеры биолюминесцентного сигнала без хинонов (5-6 сходных результатов). Добавлять различные объемы раствора бензохинона (2-50мкл) в биолюминесцентную систему перед FMNH₂ (6-8 объемов по 5-6 замеров) и регистрировать интенсивность сигнала (I). Для контрольных замеров и замеров с каждым объемом посчитать среднее и среднеквадратичное отклонение. Представить зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации бензохинона в координатах $I/I_0 = f(C, M)$ и $\ln(I/I_0) = f(C, M)$

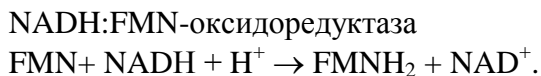
По начальному прямолинейному участку полученной кривой посчитать константу ингибирования бензохинона K по формуле

$$\ln(I/I_0) = -KC.$$

Повторить эксперимент и расчеты, используя вместо раствора бензохинона раствор антрахинона. Сравнить полученные величины K. Объяснить различия.

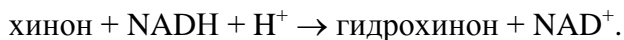
*ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6 (6 ЧАСОВ).
ДЕЙСТВИЕ ХИНОНОВ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ
БИФЕРМЕНТНУЮ СИСТЕМУ*

Биферментная система отличается от моноферментной присутствием фермента NADH:FMN-оксидоредуктазы (R), катализирующего реакцию восстановления FMN до FMNH₂:



Для биферментной системы характерно длительное (стационарное) свечение. В этой системе будут присутствовать все эффекты, характерные для моноферментной люциферазной системы, рассмотренные в предыдущей работе. Эти эффекты будут уменьшать интенсивность биолюминесцентного сигнала в присутствии хинона по сравнению с контролем без хинона. Одновременно будут присутствовать эффекты, связанные с воздействием хинонов на реакцию, катализируемую NADH:FMN-оксидоредуктазой.

Хиноны в присутствии NADH способны восстанавливаться (так же, как и FMN) с образованием гидрохинонов:



В этой реакции NADH отдает 2 электрона (и протон), являясь восстановителем, а хинон принимает 2 электрона (и 2 протона), являясь окислителем.

Реакция (2) конкурирует с реакцией (1), если окислительно-восстановительный потенциал этой реакции больше, чем реакции (1). В этом случае величина стандартного окислительно-восстановительного потенциала полуреакции ($E^0_{1/2}$) соответствующего хинона должна быть больше, чем $E^0_{1/2}$ FMN.

В табл. 8 приведены $E^0_{1/2}$ некоторых хинонов и FMN.

Стандартные окислительно-восстановительные
Потенциалы ($E^0_{1/2}$) хинонов и FMN

Соединение	$E^0_{1/2}$, В
Бензохинон	0.712
Толухинон	0.656
Тимохинон	0.650
Нафтохинон	0.484
Бензантрахинон	0.230
FMN	0.206
Антрахинон- β - моносульфоокислота	0.156
Антрахинон	0.150

Из этой таблицы видно, что в условиях, приближенных к стандартным, только два хинона не конкурируют с FMN в процессе восстановления - антрахинон- β -моно-сульфоокислота и антрахинон.

Поэтому в реакционной смеси в присутствии хинонов с большей величиной $E^0_{1/2}$, чем у FMN, должно в первую очередь происходить восстановление хинона. После того, как концентрация хинона в реакционной смеси будет уменьшена до критической, должно начаться восстановление FMN. Эти процессы приводят к наличию индукционного периода биолюминесценции T - отсутствия свечения в начальный период времени - и увеличению времени выхода на максимум биолюминесценции t (см.рис.21). Причем величины T и t зависят от концентрации хинона.

Таким образом, биферментная система специфична к группе хинонов с высоким окислительно-восстановительным потенциалом.

Цель работы - получить зависимость T и t от концентрации хинона.

Ход работы

Используется биферментная система, работа с которой освоена студентами в лабораторных работах N2,3,4.

Приготовить водный 10^{-4} М раствор и водно-спиртовой $0.5 \cdot 10^{-4}$ М раствор антрахинона по методике, описанной в работе 5.

Используемые растворы биолюминесцентной системы те же, что и в работе N2.

Раствор хинона вводить в реакцию смесь перед FMN.

Состав реакционной смеси :

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. 5 мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, рН 7.0;
4. 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора NADH;
5. 0-50 мкл р-ра хинона (бензохинона или антрахинона). Нулевая концентрация хинона соответствует контрольному замеру;
6. 50 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора FMN.

Перед получением концентрационной зависимости и после него делать контрольные измерения интенсивности свечения I_0 (2-3 сходных результата).

Добавлять различные объемы раствора бензохинона (2 – 50 мкл) в биолюминесцентную систему (4-6 объемов по 2-3 замера) и регистрировать интенсивность сигнала (I), индукционный период T и задержку выхода на максимум свечения t . Для контрольных измерений и измерений с каждым объемом посчитать среднее и среднеквадратичное отклонение. Представить зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации бензохинона в координатах $I/I_0 = f(C)$ и $\ln(I/I_0) = f(C)$ и зависимости $T = f(C)$ и $t = f(C)$.

По начальному прямолинейному участку полученной кривой посчитать константу ингибирования бензохинона (K) по формуле $\ln(I/I_0) = -KC$.

Повторить эксперимент и расчеты, используя вместо раствора бензохинона раствор антрахинона. Сравнить полученные величины K . Объяснить различия. Объяснить отсутствие T и t для антрахинона.

*ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N7 (4 ЧАСА).
ДЕЙСТВИЕ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ НА
БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ*

Соли металлов в водной среде в большинстве своем полностью диссоциированы на ионы. Поскольку все химические и физические процессы связаны с изменением электронной оболочки молекул, положительно заряженные катионы металлов могут определенным образом изменять течение этих процессов. Важнейшие характеристики катионов, определяющие их эффекты, - заряд, радиус, степень гидратации и т.д. Способность влиять на процессы миграции электрона связана с такой характеристикой катионов, как энергия сродства к электрону ΔG_e . Для биохимических процессов эта величина, помимо прочих процессов, определяет взаимодействие катионов металлов с электронно-донорными фрагментами белковой молекулы - атомами серы SH-групп, азота боковых групп аминокислотных остатков и др.: чем меньше величина ΔG_e , тем эффективнее взаимодействие, ведущее к ингибированию белковой функции. (Известно, что самопроизвольно и необратимо идут реакции с отрицательной величиной изменения энергии Гиббса.) Такие процессы известны для катионов тяжелых металлов, включая медь. Известны многочисленные случаи положительного катализа (увеличения скорости реакций) ионами металлов в химических и биохимических процессах. Это обычно ионы переходных или щелочноземельных металлов с небольшими положительными величинами ΔG_e . Их активирующая способность связана, вероятно, с возможностью их функционирова-

ния в качестве переносчика электронной плотности в результате обратимого присоединения электрона.

Цель данной работы состоит в сравнении действия солей металлов на биолюминесцентные процессы.

Ход работы

Используется биферментная биолюминесцентная система, работа с которой освоена студентами в лабораторных работах N2,3,4,6.

Приготовить водные 10^{-1} М растворы солей Mn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} .

Используемые растворы биолюминесцентной системы те же, что и в работе N2.

Раствор соли вводить в реакционную смесь перед FMN.

Состав реакционной смеси:

1. 50 мкл 0.0025%-ного водного раствора альдегида;
2. 5 мкл КРАБа;
3. 200 мкл 0.25 М фосфатного буфера, pH 7.0;
4. 200 мкл $4 \cdot 10^{-4}$ М раствора NADH;
5. 0-50 мкл р-ра соли (Mn^{2+} , Cu^{2+} или Pb^{2+}). Нулевая концентрация соли соответствует контрольному замеру;
6. 50 мкл $5,4 \cdot 10^{-4}$ М раствора FMN.

Перед и после получения концентрационной зависимости соли делать контрольные измерения интенсивности свечения I_0 (2-3 сходных результата).

Добавлять различные объемы раствора соли Mn^{2+} (2 - 50 мкл) в биолюминесцентную систему (4-6 объемов по 2-3 измерения) и регистрировать интенсивность сигнала I. Для контрольных измерений и измерений с каждым объемом посчитать среднее и среднеквадратичное отклонение. Представить зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации раствора соли в координатах $I/I_0 = f(C)$ и $\ln(I/I_0) = f(C)$.

По начальному прямолинейному участку полученной кривой посчитать константу ингибирования раствора $Mn^{2+}(K)$ по формуле

$$\ln(I/I_0) = -KC.$$

Если не удастся зафиксировать начальный этап ингибирования или активации, необходимо разбавить исходный раствор соли.

Повторить эксперимент и расчеты, используя вместо раствора Mn^{2+} растворы Cu^{2+} и Pb^{2+} . Сравнить полученные величины K. Объяснить различия действия солей металлов.

*ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N8 (2 ЧАСА).
НЕАДДИТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ НА
БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ*

Очень часто действие соединений на химические и биохимические системы носит неаддитивный характер, т.е. эффект суммы соединений не равен сумме эффектов этих соединений, а больше или меньше него.

Цель работы состоит в демонстрации неаддитивности воздействия солей металлов на биолюминесцентную систему.

Используем те же растворы солей металлов и ту же биолюминесцентную систему, что и в работе N7.

Ход работы

Состав реакционной смеси тот же, что и в работе N7.

Сначала выберем объемы и концентрации растворов солей металлов, изменяющие интенсивность биолюминесцентного сигнала на 50%. Для этого необходимо добавить к раствору биолюминесцентной системы растворы исследуемых солей, уменьшая объем добавляемой соли от 50 до 2 мкл. (В случае недостижимости 50%-ного ингибирования можно разбавить исходные растворы в 10 раз до 10^{-2} М.)

Затем смешаем попарно равные объемы выбранных растворов. Получим 3 сложных раствора: 1) ($\text{Mn}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$); 2) ($\text{Mn}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$); 3) ($\text{Cu}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$). Изучим эффекты этих растворов на биолюминесценцию.

Провести контрольные измерения биолюминесцентного сигнала. Посчитать ошибку и среднее.

Добавить эти же объемы трех растворов в реакционную смесь. Зарегистрировать изменение интенсивности биолюминесценции (I/I_0). Сделать выводы об аддитивности действия

данных соединений. Постараться объяснить причины неаддитивности эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время живые бактерии и люминесцентные ферментативные системы, включающие бактериальные ферменты (люциферазы), применяются в качестве биотестов. Основной принцип биолюминесцентного анализа – корреляция между токсичностью среды и ее влиянием на интенсивность биолюминесценции. При этом экзогенные вещества либо ингибируют, либо активируют биолюминесценцию. К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных по ингибированию (активации) биолюминесценции. Систематика ингибиторов биолюминесценции до сих пор базировалась на классическом биохимическом Ментеновском подходе, в котором предполагается, что экзогенные вещества ингибируют процесс в результате связывания субстратов или ферментативных групп. Но к настоящему времени показано, что огромное количество ингибиторов и активаторов биолюминесценции не укладывается в данную схему и их эффекты не могут быть классифицированы. Причина этого – во множестве путей воздействия большинства соединений на биолюминесцентную систему. Отклик биологических систем на влияние экзогенных веществ является интегральным, он сложным образом зависит от природы этих веществ.

С точки зрения молекулярной биофизики выходом из сложившейся ситуации является новая классификация ингибиторов и активаторов биолюминесценции на основе их влияния на элементарные физико-химические процессы. При этом должны быть установлены корреляции между физико-химическими характеристиками молекул-ингибиторов (активаторов) и изменением кинетических параметров биолюминесцентной реакции. Такие корреляции тесно связаны с физическим механизмом биолюминесценции и представляют собой физико-химическую

основу биоллюминесцентного экологического мониторинга. Продемонстрированный в данной работе подход и связан с разработкой физико-химической основы биоллюминесцентного экологического мониторинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Агранович В.М., Галанин М.Д. Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах. - М: Наука, 1978.- 383 с.

Вавилов С.И. Собр.соч. - Т.II. М., 1954 -. С.116-153.

Васильев Р.Ф. Пути возбуждения хемиллюминесценции в органических соединениях // Биохемиллюминесценция. - М: Наука, 1983.- С.31-55.

Вредные вещества в промышленности: Справ. для химиков, инженеров и врачей/ Под ред. Н.В. Лазарева, И.Д. Гадаксиной. 7-е изд, пер. и доп. Т.3.- Л.: Химия, 1977. - 608 с.

Гительзон И.И., Родичева Э.К., Медведева С.Е. и др. Светящиеся бактерии. - Новосибирск: Наука, 1984. – 278 с.

Ермолаев В.Л., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б., Шахвердов Т.А. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. - Л.: Наука. Ленинград.отд-е, 1977.- 311 с.

Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. – М: Междунар. дом сотрудничества, 1997.- 148 с.

Каталог культур светящихся бактерий / Под ред. Э.К.Родичева. - Новосибирск: Наука, Сиб.предприятие РАН, 1997. –125 с.

Кириллова И.П., Зайцева Л.А., Дмитриева Л.В. Биоллюминесцентный анализ и его возможности //Общие вопросы микробиологической промышленности. - 1983.- С.44.

Кукушкин Ю.Н., Маслов Е.И.. Строение атома и химическая связь / Под ред. Е.А.Максимюка.- Л.:Изд-во ЛГУ, 1973.- 80 с.

Методы определения кинетических показателей качества поверхностных вод. PD53.18.24.83-89. М.: Гидрометеиздат, 1990. – 33 с.

Химический энциклопедический словарь/ Гл. ред. И.Л.Кнунянц.- М.: Сов.энциклопедия, 1983.- 729 с.

Шарипов Г.Л., Казаков В.П., Толстикова Г.А.. Химия и хемилюминесценция 1,2-диоксетанов. - М.: Наука, 1990.- 288 с.

Шигорин Д.Н., Валькова Г.А., Гаспилович Е.А. и др. Электронно-возбужденные состояния многоатомных молекул и процессы их дезактивации.- М.:Наука, 1993.-169 с.

Гиль Т.А., Балаян А.Э., Стом Д.И. Гашение люминесценции светящихся бактерий как тест для оценки токсичности фенольных компонентов стоков // Микробиология. - 1983. -Т.52.- №6. - С.1014-1016.

Заворуев В.В., Межевикин В.В. Непрерывное культивирование светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* с управлением по люминесценции //Прикл. биохимия и микробиол.-1983.-Т.19.-№4.- С.564.

Кратасюк В.А., Гительзон И.И. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе //Успехи микробиологии.- 1987.- N21. - С.3-30.

Кратасюк В.А., Кузнецов А.М., Родичева Э.К., Егорова О.И., Абакумова В.В., Грибовская И.В., Калачева Г.С. Проблемы и перспективы биолюминесцентного биотестирования в экологическом мониторинге// Сибирский экологический журн. – 1996.- N .5 - С. 397-403.

Кратасюк В.А., Макурина В.И., Кузнецов А.М., Кудряшева Н.С., Плотникова Н.Б., Медведева С.Е., Гриценко М.С., Черных В.П. Изучение действия сульфопроизводных янтарной кислоты на бактериальную люминесценцию// Прикл. биохимия и микробиология. - 1991.- Т.27. - Вып.1. - С.127-133.

Кратасюк В.А., Егорова О.И., Кудряшева Н.С., Львова Л.С., Орлова Н.Ю., Бытев В.О. Влияние фузариотоксинов на бактериальную биолюминесцентную систему *in vitro*// Прикл. биохимия и микробиология. - 1998.- Т.34.-№2.- С.207-209.

Кратасюк В.А., Фиш А.М. Изучение механизма действия 2,4-динитрофторбензола на бактериальную люминесценцию *in vitro*//Биохимия. –1980. - Т.45.-Вып.7. -С.1175-1182.

Кудряшева Н.С., Шалаева Е.Е., Задорожная Е.Н., Кратасюк В.А., Стом Д.И., Балаян А.Э. Закономерности ингибирования бактериальной биолуминесценции *in vitro* хинонами и фенолами - компонентами сточных вод //Биофизика. – 1994. -Т.38.- N3. - С.455-464.

Кудряшева Н.С., Белобров П.И., Шигорин Д.Н., Кратасюк В.А. Электронно-возбужденные состояния при биолуминесценции //ДАН СССР.- 1991. - Т.321.- N4. - С.837-841.

Кудряшева Н.С., Зюзикова Л.В., Гутник Т.В. Механизм действия солей металлов на бактериальную биолуминесцентную систему *in vitro* //Биофизика. - 1997.- Т.42.- N4.- С.831-838.

Кузнецов А.М., Тюлькова Н.А., Кратасюк В.А., Абакумова В.В., Родичева.Э.К. Изучение характеристик реагентов для биолуминесцентных биотестов //Сибирский экологический журн. –1997. - №5.- С.459-465.

Сущик Н.Н., Гладышев М.И., Калачева Г.С., Плаксина И.В. Динамика биомассы микроводорослей и состава внеклеточных свободных жирных кислот в экспериментальных микроэкосистемах //Известия АН. Серия биологическая. -1998.- N 6.- С.738-744.

Шигорин Д.Н. Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам и Периодический закон Менделеева//Журн.физ.химии. - 1977.- Т.51.- N8- .1894-1919.

Bioluminescence and Chemiluminescence. Perspectives for the 21st Century (Proceedings of the 10th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence held at Bologna, Italy, September 1998) Eds.A.Roda, M.Pazzagli, L J Kricka, P.E. Stanley John Wiley and Sons Chichester NY.- 628 pp.

Bulich A.A., Marking L.L., Kimerle R.A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. //In Aquatic Toxicology, Kimerle, R.A. and Marking LL (Eds) ASTM, Philadelphia, 1979.- P.98-10.

Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Kalachova G.S., Shchur L.A. The effect of algal blooms on the disappearance of phenol in a small forest pond. // Water Research. - 1998. - Vol.32 - N9. - P.2769-2775.

Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers: N.Y., 1999.- 495 p.

Loon W.V.G.M., Hermens J.L.M. Monitoring water quality in the future. Volume 2: Mixture toxicity parameters. Research Institute of Toxicology (RITOX), Utrecht, Netherlands, 1995

Meites L. (Ed.) Handbook of Analytical Chemistry, 1-st edition, McGraw-Hill Book Company, New York, San Francisco, Toronto, London, Sidney, 1963.

Moore J.W. and Moore E.A. Environmental Chemistry, Academic Press, NY, p. 423-438, 1983.

Patnaik P., (1997) Handbook of Environmental Analysis. Chemical pollutants in air, water, soil, and solid wastes, CRC Press. Inc., Boca Raton-New York-London-Tokyo.

Schmid R.D. and Scheller F.(eds). Biosensors: Application in Medicine, Environmental Protection and Process Control GBF Monographs, v. 13.

Turro N.J.. Modern Molecular Photochemistry. The Benjamin/Cumming Publishing Co.,Inc/, 1979. 490c.

Bulich A.A., Isenberg D.Z. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity //Instrum. Soc. Am. Trans. - 1981. - V.20. - N1.- P.29-33.

Bulich A.A., Marking L.L., Kimerle R.A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. //In Aquatic Toxicology, Kimerle, R.A. and Marking LL (Eds) ASTM, Philadelphia, 1979. P.98-106.

Karube I. Microbial sensors for process and environmental control, ACS Symposium Series American Chemical Society, Washington, DC. - Vol. 309, - p.330, 1986.

Khromechek E., Degermendzhy A., Kratasyuk V.A. (1996) Integral bioassay in ecological investigation//Environment and Interaction. Proceeding of the International Symposium, The

University of Porto, November 18-19, Eds. Mario V. Neves, Ana R. Neves, Paper 37, 4 pages.

Kratasyuk V.A. Principle of luciferase biotesting.//In: Proceeding of the First International School "Biological Luminescence", Wroclaw, Poland, June 20-23, 1989, World Scientific Publishing Co.,- 1990, Singapore,- P.550-558.

Kratasyuk V.A., Kchendogina E.V., Kudryasheva N.S., Vetrova E.V., Kudinova I.Yu. Development of the bioluminescent bioindicators for analyses of pollutions. The Proceedings of First International Conference and Industrial Exhibition "Field Screening Europe, Karlsruhe, Sept. 29- Oct.1, 1997. - p.207-210.

Kudryasheva N.S., Belobrov P.I., Kratasyuk V.A., Sherbinskaya M.K. Physico-chemical regularities in the external quenching of bacterial bioluminescence.//In: Proceeding of the First International School "Biological Luminescence", Wroclaw, Poland, June 20-23, 1989, World Scientific Publishing Co.,- 1990, Singapore, -P.416-425.

Kudryasheva N.S., Kratasyuk V.A., Belobrov.P.I Bioluminescent analysis. The action of toxicants: physical-chemical regularities of the toxicants effects //Anal.Letter, - 1994 -Vol.27. - No1. - P. 2931-2947.

Kudryasheva N.S., Kudinova I.Y., Esimbekova E.N., Kratasyuk V.A., Stom D.I. The influence of quinones and phenols on the triple NAD(H)-dependent enzyme systems\\ Chemosphere. - 1999- V.38 – N 4. - P.751-758.

Kudryasheva N.S., Y.P.Mechalkin, D.N. Shigorin. Upper electron-excited states in bacterial bioluminescence. In: J.W.Hastings, Z.J.Kricka, P.E. Stanley (Editors). Bioluminescence and Chemiluminescence (Molecular Reporting with Photons), John Wiley & Sons Ltd, Chechester, 1997. - P.70-73.

Kudryasheva N.S., Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N., Vetrova, Kudinova I.Y.. Development of the bioluminescent bioindicators for analyses of pollutions // Field Analytical Chemical Technologies. – 1998. - V.2. - N. 5. - P.277-280.

Kudryasheva N.S.. Mechanism of the effect of xenobiotics on bacterial bioluminescence. // Luminescence. – 1999. – 14. - P.199-200.

Kudryasheva N.S., E. V.Nemtseva A.G. Sizykh, A.A. Shishkin, A.S. Provorov Bacterial bioluminescence spectra in the presence of aromatic fluorescent compounds. Biluminescence and Chemiluminescence: Perspectives for the 21st Century. Proceedings of the 10th Int. Symp. on Biolum. and Chemilum.(Eds. Roda A, Pazzagly M, Kricka LJ, Stanley PE), 1999. - P.585-588.

Middleton A.J., Smith E.B. General anaesthetics and bacterial luminescence. 1. The effect of diethyl ether on the in vivo light emission of *Vibrio fischeri* // Proc. Roy. Soc. Long. B. - 1976a. - V.193. - N4. - P.159-171.

Middleton A.J., Smith E.B. General anaesthetics and bacterial luminescence. 2. The effect of diethyl ether on in vitro light emission of *Vibrio fischeri* //Proc. Roy. Soc. Long. B. - 1976b. - V.193. - N4. - P.173-190.

Serat W.F., Budenger F.E. Evaluation of biological effects of air pollutants by use of luminescent bacteria //J. Bacteriol. 1965. - V.90. - N3. - P.832-833.

Serat W.F., Budinger F.E., Mueller F.K. Toxicity evaluation of air pollutants by use of luminescent bacteria //Atmospher. Environ. – 1967. - V.1. - P.21-32.

Stom D.I., Gill T.A., Balayn A.E., Shahova O.I., Kuznetsov A.M., Medvedeva S.E. Bioluminescent method in studying the complex effect of sewage components // Arch. Environ. Toxicol. – 1992. - V.22. - P. 202-203.

Ulitzur S., Reinhertz A., Hastings J.W. Factors affecting the cellular expression of bacterial luciferase //Arch. Microbiol. – 1981. - V.129. - P.67-71.

Ulitzur S., Weiser I. Acridine dyes and other DNA- intercalating agents induce the luminescence system of luminous bacteria and their dark variants //Proc.Natl. Acad.Sci.USA. – 1981.- V.78. - N6. - P.3338-3342.

Ulitzur S., Weiser I., Yannai S. A new sensitive and simple bioluminescence test for mutagenic compounds //Mutant Res. – 1980. - V.74. - N2. - P.113-124.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ3

ГЛАВА 1. ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛ КАК ОСНОВА ПОНИМАНИЯ СЛОЖНЫХ ПРОЦЕССОВ.....6

1.1. ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА АТОМОВ.....	6
И ХИМИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ.....	6
1.1.1. Квантово-механическая модель атома Шредингера и строение электронной оболочки атома	6
1.1.2. Метод молекулярных орбиталей	13
1.2. Пути возбуждения люминесценции.....	19
1.3. СИСТЕМАТИКА МОЛЕКУЛ ПО СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ СВОЙСТВАМ.....	20
1.3.1. Орбитальная классификация электронных переходов и состояний.....	21
1.3.2. Классификация молекул по спектрально-люминесцентным свойствам.....	31
1.3.3. Особенности синглет-триплетной конверсии между состояниями одинаковой и разной орбитальной природы	33
1.3.4. Систематика молекул по спектрально-люминесцентным свойствам и ее применение	37
1.4. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КОНЦЕНТРАЦИОННОГО ТУШЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РАСТВОРАХ.....	42
1.5. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ	49

ГЛАВА 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВЕЩЕСТВ В БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СИСТЕМАХ КАК ОСНОВА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА63

2.1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ В БИОТЕСТИРОВАНИИ.....	63
2.2. ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ.....	66
2.2.1. Влияние молекул на процессы переноса энергии в биолюминесцентной системе.....	67
2.2.2. Влияние молекул на процессы переноса электрона в биолюминесцентной системе.....	74
2.2.3. Влияние молекул на процессы переноса водорода ($e^- + H^+$) в биолюминесцентной системе.....	79

ГЛАВА 3. БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОТЕСТЫ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА 85

3.1. СВЕТЯЩИЕСЯ БАКТЕРИИ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ..... 85

3.2. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ 94

3.3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕГРАЛЬНОГО МЕТОДА ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ПИТЬЕВЫХ ВОД 97

3.4. БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОТЕСТЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ПРИРОДНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ЭКОСИСТЕМ 104

 3.4.1. *Изучение влияния сезонных характеристик воды природного водоема на реакцию биолюминесцентных биотестов..... 105*

 3.4.2. *Изучение реакции биотестов на загрязнение водоема ксенобиотиками 110*

 3.4.3. *Изучение реакции биотестов на «цветение» водоема синезелеными водорослями 115*

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ..... 118

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ 120

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N1 (2 ЧАСА).
КИНЕТИКА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗой..... 120

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N2 (2 ЧАСА).
КИНЕТИКА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ЛЮЦИФЕРАЗА - NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА 123

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N3 (4 ЧАСА).
ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИЙ СУБСТРАТОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ. 126

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N4 (4 ЧАСА).
ДЕЙСТВИЕ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ МОЛЕКУЛ КРАСИТЕЛЕЙ 129

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N5 (6 ЧАСОВ).
ДЕЙСТВИЕ НЕЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ..... 131

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N6 (6 ЧАСОВ).
ДЕЙСТВИЕ ХИНОНОВ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ БИФЕРМЕНТНУЮ СИСТЕМУ 134

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N7 (4 ЧАСА).
ДЕЙСТВИЕ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ 137

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА N8 (2 ЧАСА).
НЕАДДИТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ 140

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	144

Учебное издание

Физико-химические основы биоломинесцентного анализа

Надежда Степановна Кудряшева
Валентина Александровна Кратасюк
Елена Николаевна Есимбекова

Редактор А.А. Назимова
Корректор И.А. Вейсиг

Лицензия ЛР № 020372 от 29.01.1997 г.

Подписано в печать 4.01.2002
Тиражируется на электронных носителях
Заказ 289
Дата выхода 05.02.2003
Адрес в Internet: www.lan.krasu.ru/studies/editions.asp
Отдел информационных ресурсов управления
информатизации КрасГУ
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, ауд. 22-05, e-
mail: info@lan.krasu.ru

Издательский центр Красноярского государственного
университета
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79.