

На правах рукописи



Колосова Елизавета Маратовна

**ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ КОМПЛЕКСНЫМ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ
БИОТЕСТИРОВАНИЕМ (НА ПРИМЕРЕ ПОЧВ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ)**

Специальность: 1.5.15 – Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель: **Кратасюк Валентина Александровна**, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Терехова Вера Александровна**, доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет почвоведения, кафедра земельных ресурсов и оценки почв, профессор

Коротченко Ирина Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», кафедра экологии и природопользования, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет»

Защита диссертации состоится «11» апреля 2023 г. в 10:00 час. на заседании диссертационного совета 99.0.036.02 на базе ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», по адресу: 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, д. 79, ауд. Р8-06.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» и на сайте организации <http://www.sfu-kras.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
канд. биол. наук

Л.А. Глущенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. При разработке современных методов экологического мониторинга почв важными являются проблемы понимания происходящих в почве процессов, идентификации многочисленных загрязняющих химических веществ и оценки их биодоступности (Huang, Sumner, 2011). Причина тому – сложность состава самой почвы как системы (Добровольский, 2008; Апарин, 2012), а также многообразие загрязнителей, механизмы действия которых на почвенные экосистемы мало изучены или неизвестны, что также затрудняет обоснование для них предельно допустимых концентраций. Так как почва является средой жизни множества организмов и функционирования молекулярных структур (ферментов), то для преодоления таких трудностей предлагается совместное использование нескольких тест-организмов – создание «батареи биотестов» (Cairns, 1986; Bierkens et al., 1998; Ko et al., 2012), сочетание химических, биоиндикационных методов и методов биотестирования в «Триадном» подходе (Charman, 1990; ISO 19204:2017), а также методология, основанная на многофакторных реакциях тест-организмов в биотестах (Олькова, 2020).

При этом часто теоретически декларируется возможность применения экспрессных биотест-систем разного уровня организации – от популяционного, организменного, клеточного до субклеточного и молекулярно-биохимического, но в реалиях продолжается практика использования одиночных биотестов. Использование живых организмов в качестве «аналитического датчика» имеет ряд недостатков, наиболее существенные из которых: низкая повторяемость результатов, длительность и трудоемкость проведения анализа (Terekhova, Gladkova, 2013). К тому же, чувствительность тест-объектов к разным поллютантам также различается, что делает необходимым использование «батареи биотестов» (Van Gestel et al., 2001; Ko et al., 2012; Rodriguez-Ruiz et al., 2014).

Ферментативные процессы – универсальные процессы, лежащие в основе всех уровней организации живого. Ферменты, с одной стороны обладая видовой специфичностью в строениях и свойствах, выполняют строго определенную функцию, присущую разным организмам. Для увеличения точности и чувствительности биотестов было предложено использовать вместо интактных организмов их ферментативные реакции (Кратасюк, 1985), с помощью которых осуществляется какая-либо функция живого организма как тест-объекта. На примере биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р + Л) из светящихся бактерий был разработан надежный экспрессный метод, в котором подавление активности ферментов хорошо коррелирует со степенью загрязнения водных образцов тяжелыми металлами, органофосфатами, нефтехимическими веществами (Esimbekova et al., 2014), гербицидами β -трикетона (Thiouг-Mauprivez et al., 2019) и другими веществами. При этом, так же как в биотестах на светящихся бактериях, измеряется интенсивность биолюминесценции как функция интактного организма (Esimbekova et al., 2017; Esimbekova and Kratasyuk 2014, 2015). Была предложена схема анализа, дающая интегральный ответ, не зависящий от механизмов действия токсических веществ

(Кратасюк, 1985; Kudryasheva, 2006), а также количественного и качественного состава анализируемой смеси (Есимбекова и др., 2021). Биферментная система Р + Л показала свою эффективность для оценки загрязнения природных водных экосистем и промышленных сточных вод (Esimbekova et al., 2013), а также была продемонстрирована правильность идеи о том, что в случае выбора репрезентативных ферментных систем, отражающих ключевые функции метаболических цепей организма, можно создать комплексный ферментативный биотест как «модель живого организма» для оценки качества и загрязнения образцов сложного состава, таких как почва.

Цель исследования: создание научных основ комплексного ферментативного биотеста для оценки загрязнения почвенных систем.

Задачи исследования:

1) Оценить чувствительность моно-, би- и триферментных систем, ответственных за разные метаболические функции организма, к модельным поллютантам, с целью выбора ферментов для комплексного биотеста, моделирующего функции живого организма;

2) Изучить закономерности влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии модельных поллютантов и без них;

3) Разработать формализацию и конечный программный продукт, реализующий комплексный ферментативный тест для анализа загрязнения почв;

4) Провести оценку загрязнения сельскохозяйственных и городских почв Красноярского края, подверженных длительному антропогенному влиянию, с помощью ферментативного биотеста.

Положения, выносимые на защиту

1. Ферментативные системы (моноферментные, катализируемые НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и бутирилхолинэстеразой, биолюминесцентная биферментная и сопряженная с ней триферментная) обладают чувствительностью к модельным почвенным поллютантам на уровне ПДК, что обеспечивает возможность их включения в состав комплексного ферментативного биотеста.

2. Банк из 68 модельных почвенных грунтов в качестве контрольных образцов для учета влияния типа и разновидности почвы при проведении ферментативного биотестирования.

3. Информационная платформа, позволяющая сравнивать результаты ферментативного биотестирования загрязненных почв с референтными «чистыми» показателями.

4. Комплексный ферментативный биотест применим для оценки загрязнения почв, возникшего в результате промышленной и сельскохозяйственной деятельности.

Научная новизна. Впервые показано, что ключевые ферменты метаболических цепей, отвечающие за функционирование живых тест-объектов, могут быть использованы для мониторинга сложных по составу почв в нативном состоянии и в условиях их загрязнения. Изучены факторы, влияющие на чувствительность

ферментативного метода анализа загрязнения почв (влияние рН, мутности водной вытяжки из почвы, тип и разновидности почв и др.). На примере биотестирования почв предложены новые подходы при создании комплексного многоферментного биотеста для экологического мониторинга и анализа образцов сложного состава. В модельном эксперименте в состав комплексного биотеста предложены ферментативные тест-системы для выявления промышленного и сельскохозяйственного загрязнения почв. Впервые составлен уникальный банк стандартных почвенных грунтов (68 образцов) Красноярского края, различающихся гранулометрическим составом и содержанием гумуса, в качестве эталонов сравнения почв. Разработана специализированная программа для ЭВМ, позволяющая визуализировать всю информацию об анализируемых почвенных образцах.

Практическая значимость работы заключается в создании комплексной экспрессной тест-системы для мониторинга сложных по составу объектов, основанной на воздействии водной вытяжки из разных почв в нативном состоянии и в условиях их загрязнения на ключевые ферменты метаболических цепей. Подобраны условия проведения анализа и пробоподготовки, обеспечивающие высокую чувствительность метода для включения их в систему государственного мониторинга.

Личный вклад автора состоял в проведении экспериментов при разработке комплексного биотеста, подборе условий пробоподготовки почв и их влияния на биoluminesцентные реакции, обработке и обсуждении экспериментальных данных, анализе литературы, разработке программного обеспечения, написания публикаций и тезисов конференций.

Достоверность полученных результатов подтверждается большим массивом данных и тщательной обработкой и анализом полученных результатов. Различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$).

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы апробированы на конференциях и других научных мероприятиях российского и международного уровня: X Всероссийской с международным участием научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука», посвященной 80-летию образования Красноярского края, (Красноярск, 2014); 18-ом Международном симпозиуме по биoluminesценции и хемилумinesценции (Швеция, Уппсала, 2014); Встрече молодых ученых – экологов (Сербия, Петница, 2015); V Инновационном форуме (Железногорск, 2015); XIX Докучаевских молодежных чтениях «Почва – зеркало ландшафта» (Санкт-Петербург, 2016); VII съезде Общества почвоведов им. В.В. Докучаева и Всероссийской с международным участием научной конференции «Почвоведение – продовольственной и экологической безопасности страны» (Белгород, 2016); IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Динамика современных экосистем в голоцене» (Пушино, 2016); Международной научной конференции "Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни" (Красноярск, 2016, 2017); Красноярском

экономическом форуме (Красноярск, 2017); 28-ой ежегодной встрече Европейского общества SETAC (Италия, Рим, 2018); Международной онлайн-конференции «Устойчивое развитие после COVID-19: экологические проблемы и вызовы» (Индия, 2020); Международной сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» (Красноярск, 2021); на семинарах Лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета (Красноярск, 2014-2022).

Работа проведена **при финансовой поддержке** грантов Красноярского краевого фонда науки (*№ КФ-497*); РНФ (*№ 16-14-10115*); РФФИ, Правительство Красноярского края и Красноярский краевой фонд поддержки научно-технической деятельности (*№ 18-47-240005*); Фонда Содействия инновациям (*№10059ГУ/2015*).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и рекомендуемых ВАК России для опубликования научных результатов. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Содержание диссертационной работы соответствует паспорту специальности 1.5.15 Экология (биологические науки). Положения диссертационной работы 1–3 соответствуют п.6 «Научное обоснование принципов и разработка методов прогнозирования, предупреждения и ликвидации последствий загрязнения окружающей среды», положение 4 – п.5 «Исследования в области экологической безопасности, принципы и механизмы системного экологического мониторинга, аналитического контроля в промышленности и сельском хозяйстве» паспорта специальности 1.5.15 Экология (биологические науки).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав с результатами работы, выводов (заключения) и 3 приложений. Работа изложена на 154 страницах, содержит 20 таблиц и 21 рисунок. Список литературы включает 215 источников, в том числе 95 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 рассмотрен объект исследования – почва – как сложная многокомпонентная система. Представлено общее описание земельного фонда Красноярского края и описано экологическое состояние почв. Представлен обзор современных методов биотестирования, отражены их преимущества и недостатки. Анализ современного состояния исследований в области оценки загрязнения почвенных систем позволил обосновать актуальность, идею, цель и задачи работы.

В главе 2 описаны материалы и методы исследования. В качестве основ для разработки методики были выбраны: патент РФ № 2413771 «Экспресс-способ биотестирования природных, сточных вод и водных растворов», процедура

пробоподготовки почв по ГОСТ 17.4.4.02-84 и методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» ПНД Ф.Т. 14.1:2:3:4.11-04.

Для исследования были отобраны 260 образцов почв и почвенных грунтов: банк модельных почвенных грунтов, составленный на основе песка (пойма р. Енисей, Березовский район), легкого суглинка (лесной массив «Погорельский бор», Емельяновский район), тяжелого суглинка и чернозема (ОПХ «Минино», Емельяновский район); модельные серые лесные почвы искусственной лесной экосистемы, в которую вносили разную концентрацию азота (пробы предоставлены А. И. Матвиенко); дерново-подзолистые почвы в лесу и на месте вырубки (лесной массив «Погорельский бор», Емельяновский район); горные почвы заповедных территорий (объект археологического наследия «Саяно-Пограничное б», горная система Западный Саян, Ермаковский район); почвы сельскохозяйственного назначения (пашня, залежь и целина, ОПХ «Соляное» Рыбинский район); техногенные урбостратоземы (г. Красноярск).

Органическое вещество почвы (гумус) определяли модифицированным фотометрическим методом Тюрина ($\lambda = 590$ нм). Для извлечения подвижных гумусовых веществ (ПГВ) использовали 0,1н. гидроксид натрия при соотношении почвы и растворителя 1:20. Гуминовые кислоты (ГК) в составе ПГВ осаждали серной кислотой, а содержание фульвокислот (ФК) рассчитывали по разности между общим содержанием извлекаемых щелочью гумусовых веществ и содержанием гуминовых кислот. По количеству гумусовых кислот определяли отношение ГК:ФК. Содержание нитратного азота определяли ионоселективным методом. Содержание подвижного фосфора определяли по методу Кирсанова в 0,2 н HCl вытяжке (для почв Погорельского бора) и по методу Чирикова в 0,5 н CH_3COOH (для почв ОПХ «Минино» и почв Саян). Гранулометрический состав почвы определялся в соответствии с ГОСТ 12536-2014. Показатели $\text{pH}_{\text{сол}}$ и $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ определяли потенциометрическим методом (ГОСТ 26483-85; ГОСТ 26423-85). Содержание валового мышьяка и свинца в почвах фиксировали методом атомно-эмиссионной спектроскопии (М-МВИ 80-2008, 2008), содержание водорастворимого фтора – с использованием фторселективного электрода (СанПиН 42-128-4433-87, 1988).

В качестве ферментных систем для включения в комплексный ферментативный биотест были изучены моноферментные (*алкогольдегидрогеназа* (АДГ), *НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза* (Р), *трипсин* (Тр), *бутирилхолинэстераза* (БХЭ), *глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа* (Г6ФД)), биферментная (*НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза* + *люцифераза* (Р + Л)) и триферментные системы (*лактатдегидрогеназа* + *НАДН:ФМН-оксидоредуктаза* + *люцифераза* (ЛДГ + Р + Л), *алкогольдегидрогеназа* + *НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза* + *люцифераза* (АДГ + Р + Л), *НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза* + *люцифераза* + *трипсин* (Р + Л + Тр)).

Активность моноферментных систем оценивали по изменению оптической плотности спектрофотометрическим методом. Для оценки влияния поллютанта рассчитывали остаточную активность ферментов (ОА, %). Активность биферментной и трехферментной систем определяли по величине максимальной интенсивности свечения (I/I_0 , %). В качестве контрольного раствора использовали дистиллированную воду. Количественную оценку степени влияния загрязняющих веществ на активность ферментных систем выражали в виде величин IC_{20} , IC_{50} , представляющих собой концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности системы (ингибирование) на 20 и 50%, соответственно.

Все измерения были выполнены не менее чем в трех повторностях. Обработку расчетов проводили в пакете прикладных программ Excel (Microsoft, США). Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10 (StatSoft Inc., США) с подсчетом среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (s). Различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию Стьюдента (t), корреляционную связь – по критерию Пирсона (r). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$). Планки погрешностей на графиках представляют собой стандартное отклонение.

В главе 3 представлены результаты изучения чувствительности ферментативных систем, катализируемых ключевыми ферментами метаболических процессов, к поллютантам различных классов по итогам двух модельных экспериментов.

В первом эксперименте выбраны три класса поллютантов, обнаруженных в черте города: а) **тяжелые металлы** (на примере ионов меди Cu^{2+} ; источники загрязнения – предприятия черной и цветной металлургии); б) **пестициды** (на примере инсектицида «Децис», д.в. дельтаметрин; применяется для личных подсобных хозяйств, на придомовых территориях, в парках и скверах и в быту для дезинсекции против вредных насекомых); в) **нефтепродукты** (на примере дизельного топлива; источники – в том числе автозаправочные станции). Претендентами на включение в состав «биологической части» комплексного теста для определения загрязнения городских почв являлись шесть ферментативных систем различных классов. Оценивали их чувствительность к данным поллютантам относительно значений ПДК. Концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности системы (ингибирование) на 20% представлены в таблице 1.

Ионы меди ингибировали все ферментативные системы, но характер зависимости активности работы фермента от концентрации различен: линейный для АДГ системы, нелинейный для Р системы, логарифмический для Р + Л системы. Наибольшая чувствительность наблюдается у Р + Л системы ($IC_{20} = 0,03$ мг/кг, ПДК = 3,0 мг/кг). Три ферментативные системы (Р, Р + Л и АДГ + Р + Л) показали меньшую чувствительность к пестициду «Децис» ($IC_{20} = 0,2-0,4$ мг/кг) по сравнению с ПДК (0,01 мг/кг). При этом раствор пестицида изменял кинетические характеристики триферментной системы АДГ + Р + Л. Так как АДГ + Р + Л система имела малую чувствительность к данному

веществу, то можно заключить, что в триферментной системе АДГ не является мишенью для пестицида и эффект обусловлен влиянием пестицида на фермент НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу, а увеличение длины цепи в данном случае не целесообразно. Ингибирующий эффект дизельного топлива наблюдался только начиная с уровня биферментной системы Р + Л, но зависимости от концентрации дизельного топлива не выявлено, по-видимому, из-за его гидрофобности. Чувствительность триферментной системы АДГ + Р + Л к поллютанту была выше и проявлялась зависимость степени ингибирования от объема дизельного топлива, добавляемого в измерительную кювету ($IC_{20} = 72$ мг/кг, ПДК не установлено, допустимо до 1000 мг/кг).

Таблица 1 – Чувствительность ферментативных систем к модельным токсикантам, параметр IC_{20} , мг/кг

	Ферментативная система	[Cu ²⁺]	«Децис»	Дизельное топливо
Моноферментные	АДГ	0,8	1500	н/ч (723)
	Р	0,16	0,3	н/ч (1420)
	БХЭ	-	н/ч (100000)	н/ч (1170)
Биферментная	Р + Л	0,03	0,4	≈ 41
Триферментные	АДГ + Р + Л	2,2	0,2	72
	Р + Л + Тр	н/ч (0,1)	н/ч (100000)	н/ч (740)
ПДК		3,0 ^б	0,01 ^б	< 1000 ^б

Примечание – ПДК в почве согласно гигиеническим нормативам: ^аГН 2.1.7.2041-06, 2006; ^бГН 1.2.3539-18, 2018; ^вДопустимый уровень содержания нефтепродуктов в почве, ПДК не установлены; н/ч – не чувствительно в данном диапазоне концентраций, в скобках указана максимально добавляемая концентрация

Во втором эксперименте выбраны поллютанты, характерные для почв, используемых в сельском хозяйстве: а) **тяжелые металлы** (на примере ионов меди Cu²⁺; медь входит в состав некоторых пестицидов и стимуляторов роста (Пат. РФ 2171579; Пат. РФ 2229807)), б) **фосфорорганические пестициды** (на примере малатиона (инсектицид и акарицид широкого спектра действия) и диазинона (инсектицид контактного и кишечного действия)), в) **хлорорганические пестициды** (на примере γ -изомера гексахлорциклогексана (γ -ГХЦГ); инсектицид комплексного действия, запрещен к производству), г) **наноматериалы** (на примере наночастиц TiO₂; условно канцерогенен для человека; может применяться в качестве стимулятора роста растений (Owolade, Ogunlet, 2008)). Претендентами на включение в состав «биологической части» комплексного теста для определения загрязнения

сельскохозяйственных почв были выбраны семь ферментативных систем различных классов. Оценивали их чувствительность к данным поллютантам относительно значений ПДК. Концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности системы (ингибирование) на 20% представлены в таблице 2.

Моноферментная система БХЭ показала исключительную чувствительность к инсектицидам. В частности, система БХЭ была единственной из исследованных, активность которой ингибировал γ -ГХЦГ (IC_{20} = 55 мг/кг, ПДК = 0,1 мг/кг). А концентрация малатиона, вызывающая ингибирование фермента на 20%, была на два порядка ниже транслокационного ПДК данного вещества в почве (IC_{20} = 0,005 мг/кг, ПДК = 2,0 мг/кг). Наибольшей чувствительностью к диазину обладала триферментная система ЛДГ + Р + Л (IC_{20} = 0,35 мг/кг, ПДК = 0,1 мг/кг). Увеличение чувствительности к ионам меди наблюдалось в следующей последовательности ферментативных систем: АДГ < Р < (Р + Л) < (ЛДГ + Р + Л). Однако использование БХЭ системы невозможно для установления эффекта ионов меди, так как ионы тяжелых металлов изменяют форму красящего комплекса, вследствие чего создается ложное представление об ингибировании активности БХЭ (Nunes, 2011). Все исследованные системы, за исключением БХЭ, не реагировали или реагировали слабо на присутствие наночастиц диоксида титана в анализируемом растворе (IC_{20} = 1,75 мг/кг, ПДК не установлено).

Таблица 2 – Чувствительность ферментативных систем к модельным токсикантам, параметр IC_{20} , мг/кг

	Ферментативная система	Малатион	Диазинон	γ -ГХЦГ	TiO ₂	[Cu ²⁺]
Моноферментные	АДГ	н/ч (11000)	н/ч (3750)	н/ч (625)	1000	0,8
	Р	4400	25	н/ч (1250)	400	0,16
	БХЭ	0,005	0,7	55	1,75	-
	Тр	н/ч (14500)	н/ч (500)	н/ч (400)	н/ч (150)	н/ч (110)
	Г6ФД	1450	н/ч (1000)	-	н/ч (65)	110
Биферментная	Р + Л	39	1,35	н/ч (220)	н/ч (350)	0,03
Триферментная	ЛДГ + Р + Л	2	0,35	н/ч (220)	н/ч (350)	0,002
ПДК		2,0 ^а	0,1 ^а	0,1 ^а	-	3,0 ^б

Примечание – ПДК в почве согласно гигиеническим нормативам: ^аГН 1.2.3539-18, 2018; ^бГН 2.1.7.2041-06, 2006; н/ч – не чувствительно в данном диапазоне концентраций, в скобках указана максимально добавляемая концентрация.

Мишенью фосфорорганических пестицидов в организме, как правило, являются пищеварительные ферментные (трипсин, химотрипсин, эластаза, коконаза и др.) и ферменты нервной проводимости (бутирил- и ацетилхолинэстераза) (Abdollahi et al., 2004; Ленинджер, 1985). В частности, чувствительность бутирилхолинэстеразы к малатиону можно объяснить необратимым ингибированием фермента вследствие образования в его активном центре ковалентной связи «фосфорил-серин» (Лоншакова-Мукина и др., 2021). Поэтому ожидалось проявление ингибирующего действия малатиона и диазинона на моноферментные системы, катализируемые трипсином и бутирилхолинэстеразой. Однако использованная в работе методика определения активности трипсина не позволила определить его чувствительность к исследованным пестицидам.

Были выявлены некоторые особенности и ограничения изученных ферментативных систем, которые затрудняли использование этих систем в комплексном биотесте, а именно:

1. Необходимость учета оптической плотности исследуемых растворов при регистрации активности моноферментных систем спектрофотометрическим методом. Верхний предел концентраций пестицидов и наночастиц, добавляемых в реакционную смесь, был лимитирован уровнем ≈ 2 г/л.

2. Невозможность использования моноферментной системы, катализируемой БХЭ, для определения ионов меди, так как ионы тяжелых металлов изменяют форму красящего комплекса, вследствие чего создается ложное представление об ингибировании активности БХЭ;

3. Выбранные методы регистрации активности трипсина (как спектрофотометрический, так и метод сопряжения с биферментной биOLUMИнесцентной реакцией), как ключевого фермента, не подходит под поставленные задачи;

4. Водные растворы пестицидов изменяли кинетические параметры триферментной системы (ингибирование интенсивности свечения системы в течение 15-20 секунд с начала измерения с последующим ростом до фазы плато и достижением максимума), что может являться дополнительным критерием действия данных веществ на биотест;

5. Гидрофобные вещества, такие как дизельное топливо, оказывают различные эффекты. Гидрофобные свойства раствора не позволяют раствориться ему в реакционной смеси, вследствие чего компоненты реакции, находясь в меньшем объеме, сильнее взаимодействуют друг с другом (для Р системы) или препятствуют действию дизельного топлива на ферменты (для БХЭ). Для АДГ системы присутствует эффект замедления окисления восстановленного НАД⁺ вследствие медленной растворимости кислорода, вызванного расположением раствора дизельного топлива на поверхности. Поэтому для оценки действия на ферментативные системы гидрофобных соединений необходимо изменения в процедуре проведения анализа, например, использование растворителей.

Таким образом, для обеспечения обнаружения загрязняющих почву веществ на уровне ПДК в комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения городских почв рекомендуется включить следующие ферментативные системы: моноферментную, катализируемую НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой (Р), биферментную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р + Л) и триферментную систему алкогольдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза (АДГ + Р + Л). А в комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения сельскохозяйственных почв рекомендуется включить следующие ферментативные системы: моноферментную, катализируемую бутирилхолинэстеразой (БХЭ), биферментную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р + Л) и триферментную систему лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (ЛДГ + Р + Л).

Показано также, что чувствительность ферментативных систем можно существенно повысить, если производить подбор ферментативных систем на основе знаний о возможных поллютантах, находящихся в почвах. Некоторые ферменты могут быть специфическими индикаторами для определенных поллютантов. Применение триферментных систем с люциферазой также должно повысить чувствительность теста.

В главе 4 представлены результаты изучения закономерностей влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии модельных поллютантов и без них.

Возможность появления ложноположительных результатов, связанных с мутностью растворов и, как следствие, поглощения или рассеяния излучения, изучена на примере почв, отобранных в районе объекта археологического наследия «Саяно-Пограничное б». Было установлено, что непрозрачность таких образцов приводит к ослаблению билюминесцентного сигнала не более чем на 6%. С учетом того, что по методике биотестирования происходит разбавление образцов еще в 5 раз, можно утверждать, что эффект фильтра не вносит существенных искажений при анализе водных вытяжек из почв. Поэтому был сделан вывод об отсутствии необходимости расчета коэффициентов коррекции при каждом измерении билюминесцентного сигнала. Аналогичные результаты были получены при измерении оптических свойств водных вытяжек из почв, отобранных на территории г. Красноярска (Байгина и др., 2017).

Так как растворимость металлов (Высоцкий, Степаненко, 2016), подвижность химических веществ и выход их в почвенный раствор зависит от величины рН, то для максимального приближения к естественным условиям необходимо сохранять собственную кислотность почвы. На примере почв, отобранных на территории г. Красноярска, было показано, что кислотные свойства почвы не влияют на процесс протекания реакции и конечный результат, в частности из-за особенности тест-системы (наличие буферного раствора, соотношение реакционной смеси и объема добавляемого водной вытяжки, отсутствие значимой корреляции) (Байгина и др., 2017).

Была оценена чувствительность моно-, би- и триферментных систем к водным вытяжкам из пяти образцов почв. Для большинства исследованных в работе моноферментных систем водные вытяжки из почвы не приводят к изменениям в активности более чем на 20% относительно контрольного образца (рисунок 1).

Водная вытяжка из чернозема ингибирует активность моноферментной системы Р на 35% (рисунок 2). С другими образцами эффект был незначительный.

Начиная с уровня биферментной системы Р + Л, наблюдается значительная чувствительность к различным водным вытяжкам из почв (рисунок 3). При этом, степень ингибирования активности фермента зависит как от гранулометрического состава, так и от содержания гумуса в образцах. Известно, что гуминовые вещества увеличивают скорость расходования эндогенного восстановителя реакции НАДН, за счёт чего снижается интенсивность биолюминесценции, показывая ложное загрязнение (Тарасова, 2012; Tarasova et al., 2011, 2012).

Таким образом, для достоверной интерпретации результатов биотестирования необходимо использовать почвенные стандарты сравнения, что также подтверждается результатами, представленными в таблице 3. Измерение чувствительности трех ферментативных систем к поллютантам в присутствии водных вытяжек из почв были выполнены относительно чистых почвенных вытяжек (в отсутствии поллютантов).

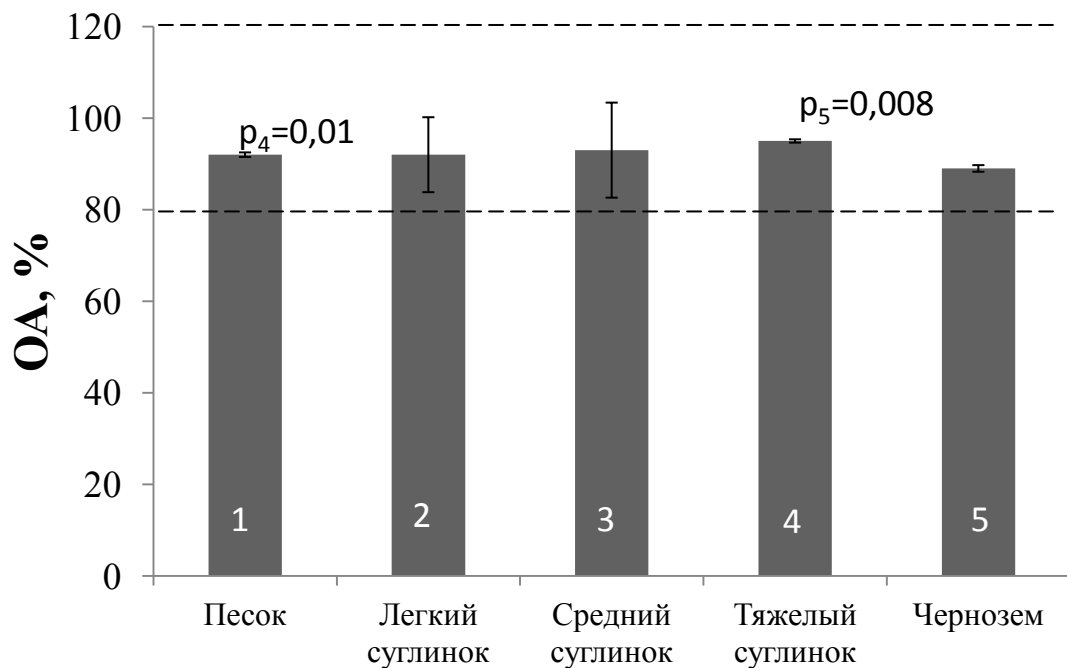


Рисунок 1 – Зависимость остаточной активности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в присутствии водной вытяжки из разных почвы и грунтов. Горизонтальными линиями обозначен диапазон допустимого изменения активности ферментов относительно контроля

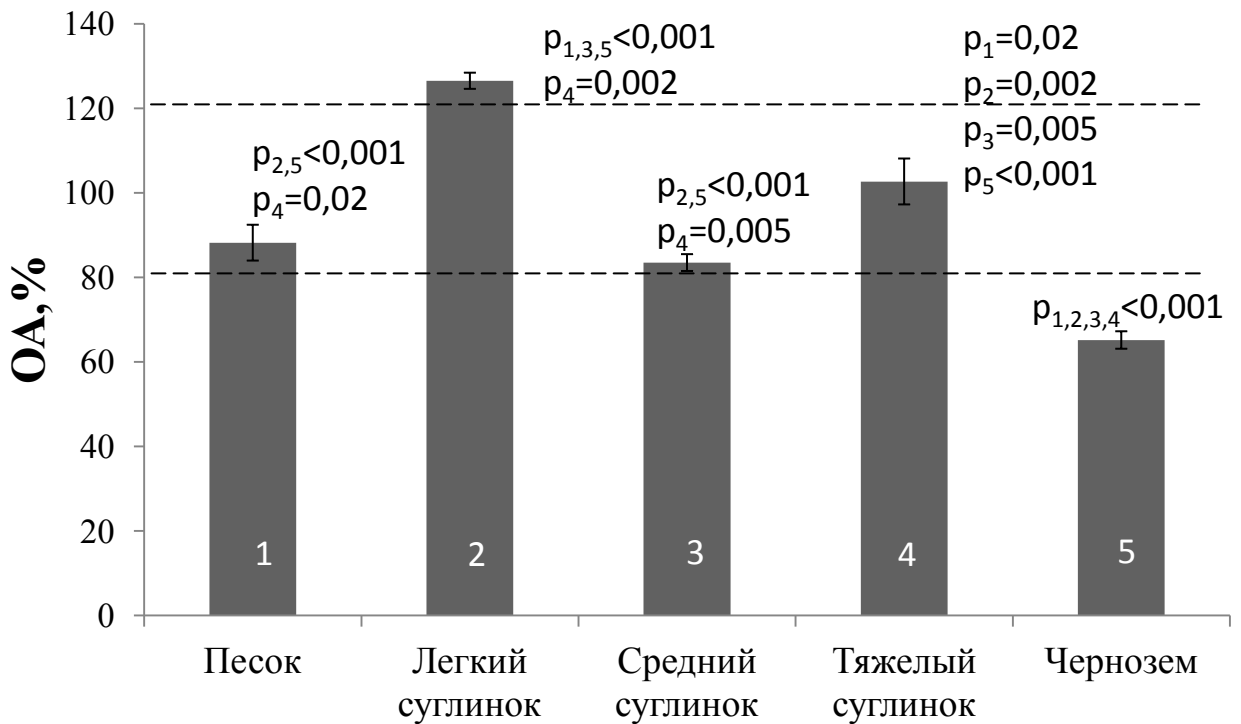


Рисунок 2 – Остаточная активность НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы в присутствии водной вытяжки из разных почвы и грунтов. Горизонтальными линиями обозначен диапазон допустимого изменения активности ферментов относительно контроля

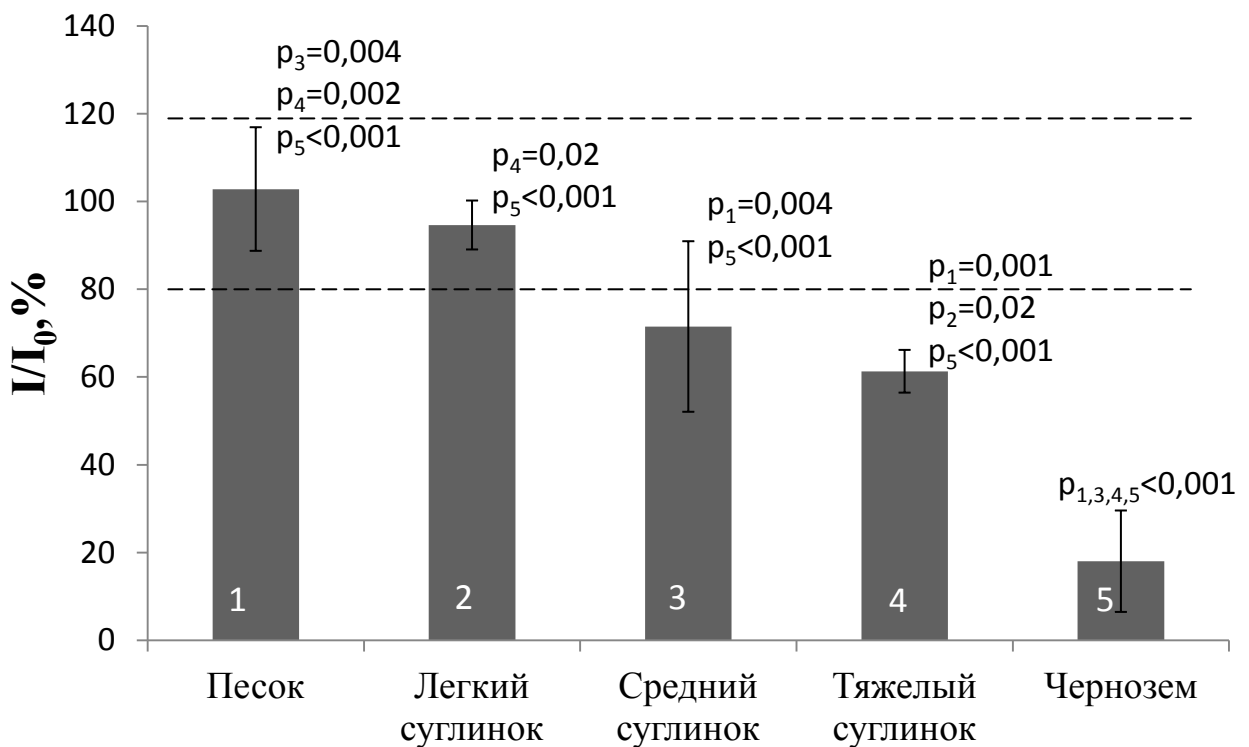


Рисунок 3 – Зависимость остаточной активности биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза от водной вытяжки из разных почвы и грунтов. Горизонтальными линиями обозначен диапазон допустимого изменения активности ферментов относительно контроля

Установлено, что при добавлении поллютантов в различные водные вытяжки из почв, в большинстве случаев происходит снижение их ингибирующего действия на ферментативные системы. Особенно выражен данный эффект для ионов меди, чувствительность к ним падает на три и один порядок при тестировании этого поллютанта, добавленного в водную вытяжку из чернозема с помощью моно- и биферментной систем соответственно, а также на один порядок при его тестировании в водной вытяжке из среднего суглинка с помощью системы ЛДГ + Р + Л. Данный факт связан с тем, что гуминовые вещества с одной стороны являются самостоятельным ингибитором биOLUMИнесцентной реакции, с другой стороны выступают в качестве ремедиатора почвы, т.е. инактивируют ионы меди (Портнова и Вольхин, 2008; Tarasova et al., 2012; Степанов и Якименко, 2016). Данный факт нельзя обнаружить без сравнения с чистым, фоновым образцом.

Таблица 3 – Параметр IC₂₀ (мг/кг) для исследованных загрязнителей при использовании ферментных тест-систем Р, Р + Л, ЛДГ + Р + Д

Образец	Малатион			Диазинон			Cu ²⁺		
	Р	Р+Л	ЛДГ +Р+Л	Р	Р+Л	ЛДГ +Р+Л	Р	Р+Л	ЛДГ+Р +Л
дН ₂ О	4400	39	2	350	1,3	0,35	0,4	0,06	0,004
Песок	-	<u>30</u>	<u>1</u>	1500	<u>1,15</u>	<u>0,15</u>	169,8	0,21	0,004
Легкий суглинок	-	600	20	<u>300</u>	9	3	6,35	0,12	0,004
Средний суглинок	-	130	20	1800	2,4	0,5	17	<u>0,03</u>	0,16
Тяжелый суглинок	-	<u>18,5</u>	8	<u>300</u>	16,5	<u>0,15</u>	21,25	0,55	0,04
Чернозем	-	39	<u>1</u>	3000	1,7	<u>0,3</u>	255	0,7	0,0045
ПДК	2,0 ^а			0,1 ^а			3,0 ^б		

Примечание – ПДК в почве согласно гигиеническим нормативам: ^аГН 1.2.3539-18, 2018; ^бГН 2.1.7.2041-06, 2006.

Может наблюдаться также и обратный эффект, особенно выраженный при исследовании влияния пестицидов. Так, чувствительность ферментативных систем к поллютантам может повышаться в присутствии водных вытяжек из почв (таблица 3, подчеркнута). В большинстве случаев таким эффектом обладает водная вытяжка из песка. Известно, что биодоступность и степень деградации пестицидов в почвах зависит от её свойств. Для малатиона было показано, что деградация его в почве происходит по химическому механизму, напрямую связанному с адсорбцией. Также разложение малатиона на продукты увеличивается в ряду от кислых до сильнощелочных почв (Konrad et al., 1969).

Кроме того, особенностью ферментативного метода является анализ действия веществ в микрообъемах. Соли меди хорошо диссоциируют на ионы в воде, вследствие

чего раствор становится гомогенным. Однако растворы пестицидов представляют собой суспензию, контролировать концентрацию действующего вещества, находящегося в забираемом с помощью микродозатора анализируемом объеме, становится затруднительным. Возможно, при взаимодействии малатиона и диазинона с водными вытяжками из некоторых почв повышается его биодоступность относительно водного раствора.

Для решения вышеперечисленных вопросов был составлен банк модельных почвенных грунтов, в широком диапазоне различающийся по гранулометрическому составу и содержанию гумуса (рисунок 4).



Схема опыта 1

1. Супесь.
2. Легкий суглинок.
3. Средний суглинок.
4. Тяжелый суглинок.
5. Исходная высокогумусная почва (содержание гумуса 9,5-10%).

Схема опыта 2

1. Супесь + почва (1% гумуса).
2. Супесь + почва (3% гумуса).
3. Супесь + почва (5% гумуса).
4. Легкий суглинок + почва (1% гумуса).
5. Легкий суглинок + почва (3% гумуса).
6. Легкий суглинок + почва (5% гумуса).
7. Средний суглинок + почва (1% гумуса).
8. Средний суглинок + почва (3% гумуса).
9. Средний суглинок + почва (5% гумуса).
10. Тяжелый суглинок + почва (1% гумуса).
11. Тяжелый суглинок + почва (3% гумуса).
12. Тяжелый суглинок + почва (5% гумуса).

Рисунок 4 – Внешний вид модельного опыта №1, описания схем модельных опытов №1 и №2

Образцы почвенных грунтов имели разный гранулометрический состав, pH_{KCl} и сильно отличались по содержанию гумуса, которое изменялось в широких пределах, от 0,37 до 8,50%, с переходом через 1, 3, 5%. Содержание физической глины колебалось от 8,6 до 47,5%, а разновидности были представлены связным песком, супесью, легким, средним и тяжелым суглинками. pH солевой суспензии также было различным, от 5,45 до 8,00 ед., что указывает на слабокислую, близкую к нейтральной, нейтральную, слабощелочную и щелочную реакцию среды. Значение оптической плотности D_{250} водных вытяжек из почвенных грунтов (оптическая плотность при длине волны 250 нм, мера общего количества растворенного вещества) варьирует в диапазоне от 0,16 до 1,59.

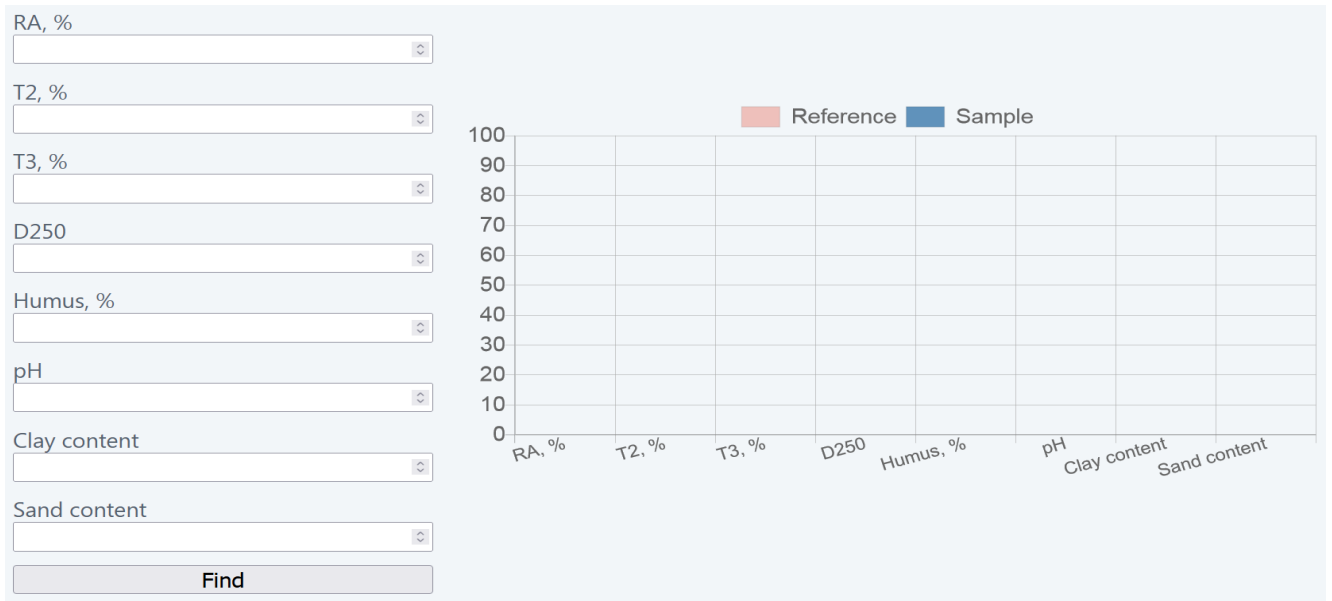
Такие модельные почвы, являющиеся эталонами сравнения почв Красноярского края, необходимы для учета влияния чистых почв на биотест и могут быть использованы также для оценки биодоступности поллютантов.

Трудности, возникающие при анализе сред сложного состава, связаны с большим числом параметров и данных, которые необходимо анализировать и интерпретировать. В главе 5 предложен подход для решения проблем анализа сред сложного состава, создана формализация и конечный программный продукт. Программа основывается на принципах обеспечения оптимального алгоритма поиска стандартного образца сравнения, удобства работы с данными в любом интернет-браузере, независимо от используемой операционной системы и платформы, и хранит данные о стандартных почвенных грунтах. Программа разработана в двух вариантах: для работы на компьютере под управлением операционной системы Windows (Свидетельство № 2021660358, 2021) и для работы в любом интернет-браузере независимо от используемой операционной системы и платформы (Kratasyuk et al., 2021).

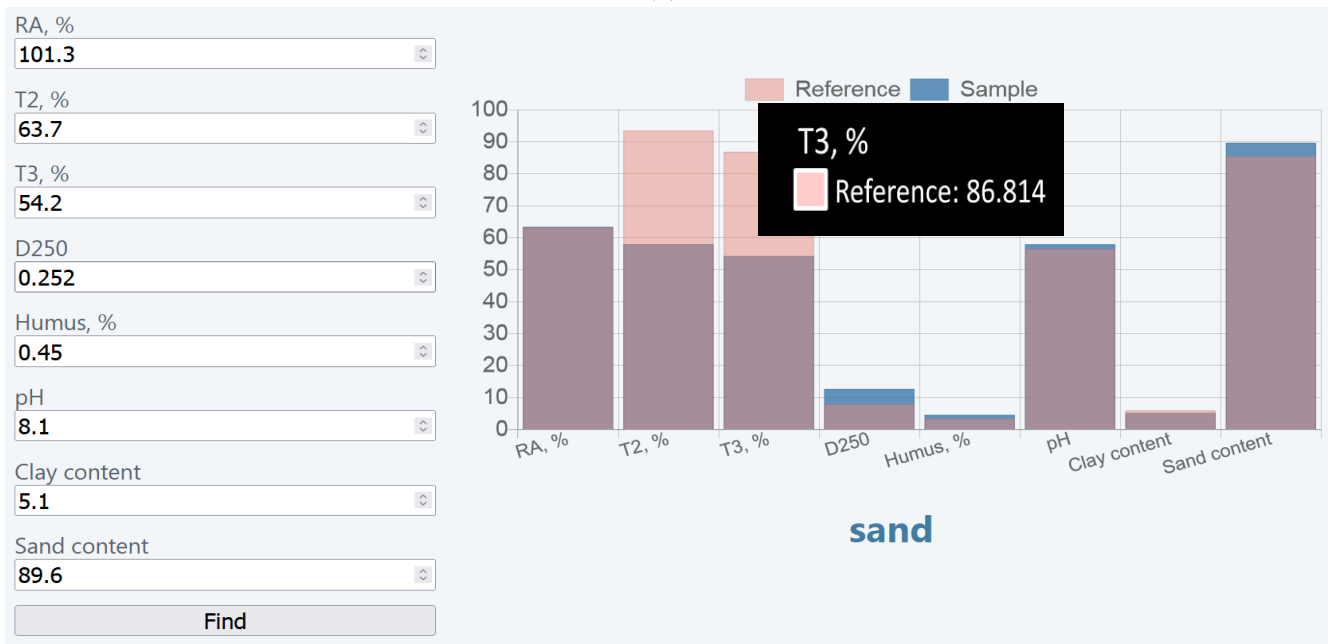
Внешний вид разработанного приложения включает поля ввода, кнопку «Найти» (Find) и графическое поле (область диаграммы) (рисунок 5). Когда приложение запускается, поля ввода не заполнены (рисунок 5а). В качестве предлагаемых для заполнения строк выступают выбранные ранее показатели, по которым можно сделать вывод о наличии или отсутствии загрязнения почв, а именно: остаточная активность моноферментной реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой (RA, %), остаточное свечение биферментной реакции НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (T₂,%), остаточное свечение трехферментной реакции НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + лактатдегидрогеназа (T₃, %), оптическая плотность водных вытяжек из почв на длине волны 250 нм (D₂₅₀), содержание органического вещества (гумуса) в процентах (Humus, %), pH солевой (pH), гранулометрический состав – процентное содержание фракций глины и песка (clay content, sand content).

Пользователь приложения (исследователь) вводит экспериментально полученные данные характеристических измерений исследуемой почвы в соответствующие поля. После того, как пользователь нажимает кнопку «Найти» (Find), программа выполняет поиск соответствующего эталонного стандарта на основе включенного в программу алгоритма (на основе евклидовой метрики). После поиска стандарта для сравнения приложение выводит диаграмму в графическом поле, в нижней части диаграммы отображается кодовое название модельного почвенного грунта (рисунок 5б). На диаграмме одновременно отображаются значения характеристик почвы для стандартного образца сравнения (розовые столбцы) и исследуемой почвы (синие столбцы). Стоит отметить, что данные о характеристиках исследуемого грунта и стандартного грунта унифицированы, то есть, приведены к одной шкале, где максимальное значение характеристики модельного образца принято за 100%. Эта унификация связана с тем, что процентное отклонение исследуемой выборки от стандарта более информативно, чем конкретное абсолютное значение. Для удобства

сравнения фиолетовым цветом показано перекрытие значений. Кроме того, при наведении курсора мыши на любой столбец, отображается его числовое значение (рисунок 5б).



(a)



(б)

Рисунок 5 – Внешний вид приложения: (а) при запуске в браузере; (б) при заполнении полей ввода и выборе подходящего стандартного грунта

Такая программа предназначена в первую очередь для помощи в интерпретации результатов анализа сред сложного состава. Как было показано ранее, ферменты могут обладать как неспецифичной, так и специфической реакцией. Так, было показано, что бутирилхолинэстераза (БХЭ) обладает высокой чувствительностью к действию фосфорорганических и карбаматных пестицидов (Arduini, 2006; Kumanar and Morita; 1995, Gogoi, 2000), чувствительность БХЭ к параксону и хлорофосу составляет 0,37 мг/л

и 0,005 мг/л соответственно (Arduini, 2006; Arduini, 2007). Также была показана возможность использования ферментативных систем различной сложности в качестве индикаторных системы для оценки степени загрязнения почв солями тяжелых металлов, пестицидами и наноматериалами почвенных образцов (Kolosova et al., 2019; Sutormin et al., 2018; Esimbekova et al., 2017). Кроме того, изменения можно отслеживать и по различиям в характеристиках почв и водных вытяжек из них (оптическая плотность, рН).

Открытый код программы подразумевает возможность включения в базу данных стандартных почвенных грунтов образцов, характерных для других регионов, а также вносить другие изменения. В результате такой подход может приблизить к решению проблем анализа сред сложного состава, связанных с их комплексным влиянием на биотесты.

Таким образом, в **состав комплексного ферментативного биотеста** входят: набор репрезентативных ферментных систем, обеспечивающих оптимальный уровень чувствительности, банк модельных почвенных образцов, который следует использовать в качестве контроля при проведении анализа, а также программа, которая учитывает и сравнивает показатели модельных почвенных грунтов с исследуемыми.

В результате апробации части комплексного ферментативного биотеста (на примере Р + Л системы) при исследовании почв, длительное время подвергавшихся промышленному загрязнению, было показано, что необходимо уделять больше внимания предварительному исследованию и подготовке образцов почв к анализу при биотестировании.

Почвы, отобранные на территориях, находящихся в зоне негативного влияния Красноярского алюминиевого завода и ТЭЦ-1, имели превышение уровня ПДК фтора, мышьяка и свинца (от 2 до 44 ПДК). Почвы, загрязненные фтором, оказывали значительный ингибирующий эффект на Р + Л систему. Однако корреляций между содержанием водорастворимого фтора и активности ферментной системы не выявлено. Фтор имеет доказанный негативный эффект на многие живые организмы на клеточном и молекулярном уровне (Štepec and Ponikvar-Svet, 2019; Kim et al., 2015; Strunecka and Strunecky, 2020; Marquis et al., 2003). В то же время, для светящихся бактерий было показано, что даже высокие концентрации фтора не оказывали отрицательного влияния на их люминесцентную активность (Harvey, 1941) и рост (Thomulka et al., 1993). Таким образом, без проведения дозозависимых исследований эффекта соединений фтора, направленных на оценку их прямого действия на биолюминесцентную ферментную систему, нельзя утверждать о наличии или отсутствия чувствительности.

При рассмотрении всей группы почвенных образцов, загрязненных мышьяком, значимой корреляции между содержанием мышьяка в почвах и активностью системы Р + Л обнаружено не было. Учитывая тот факт, что накопление мышьяка в почвах и его выход в раствор сильно зависит от почвенных характеристик, таких как процент глинистой фракции и содержание гумуса, а также уровня рН (Thanabalasingam, Pickering, 1986; Zhang et al., 2020), все образцы разделили на четыре группы по

содержанию гумуса и гранулометрическому составу. Показано, что в группе 1 (низко и средне гумусированные, среднесуглинистые) между валовым содержанием мышьяка и активностью P + Л системы наблюдается достоверная сильная и обратная корреляция ($r = -0,72$, $p < 0,01$). Поэтому по данной группе можно утверждать, что ингибирование системы было вызвано не столько влиянием почв, сколько чувствительностью ферментов к мышьяку. Потенциально мышьяк может ингибировать работу ферментов светящихся бактерий, так как согласно данным литературы, мышьяк разных валентностей способен влиять на SH-группы ферментов и изменять процесс фосфорилирования, выступая в качестве аналога фосфора (Ochiai, 1987). Однако в модельном эксперименте не удалось определить параметр IC_{20} для ферментной системы P + Л при тестировании ее чувствительности к растворам мышьяка в диапазоне 0,095–0,105 мг/л (Kolosova et al., 2021).

Не смотря на то, что валовое содержание свинца в исследованных почвах было высоким (от 47 до 297 мг/кг), концентрации свинца в водных вытяжках не превышали 0,14 мг/кг (0,028 мг/л водной вытяжки из почвы), т.е. выход свинца в водный раствор составил 0,1% от его общей концентрации. Ранее было показано, что чувствительность к свинцу (IC_{50} , половина максимальной ингибирующей концентрации) светящихся бактерий составляет 0,3 мг/л в остром эксперименте (Fulladosa et al., 2005) и 669 мг/л в случае хронического эксперимента (Hsieh et al., 2004). Рассчитанная концентрация свинца, ингибирующая на 50% активность P + Л системы составила $IC_{50} = 0,6$ мг/л в условиях модельного эксперимента (Kalyabina et al., 2019). При исследовании урбостратоземов, несмотря на высокие значения общего содержания свинца в образцах почвы (от 47 до 297 мг/кг), указанные выше значения IC_{50} не были достигнуты из-за низкой растворимости свинца в воде. Концентрации свинца в водных вытяжках из почвы имели низкий коэффициент корреляции с величинами остаточного свечения ферментной системы ($r = 0,2$, $p < 0,05$), поэтому некорректно утверждать, что ингибирование ферментной системы вызвано именно этим поллютантом, хотя к нему и существует потенциальная чувствительность.

В результате апробации метода на почвах опытно-производственного хозяйства «Соляное» показана необходимость использования методов биотестирования для анализа не только верхних слоев почвы, но и всего почвенного профиля. Величина остаточного свечения увеличивается вниз по профилю (рисунок 6), однако для почв под пашней она не достигает 100% даже в самом нижнем горизонте, где содержание гумуса и подвижных гумусовых веществ минимально. Высокая степень ингибирования свечения биферментной системы связана с тем, что сельскохозяйственная обработка распаханной почвы проходила с использованием минеральных удобрений и пестицидов. Это также подтверждается более низким значением pH нижних горизонтов под пашней, вплоть до кислого (pH = 4,47), нетипичного для данного типа почвы.

Содержание гумусовых веществ в почве менее 0,77–1,41%, а подвижных гумусовых веществ менее 50 мгС/100г не приводит к ингибированию

биoluminesцентного свечения. Следовательно, данный метод может быть применен для оценки миграции веществ вниз по профилю почв, начиная с глубины около 30 см.

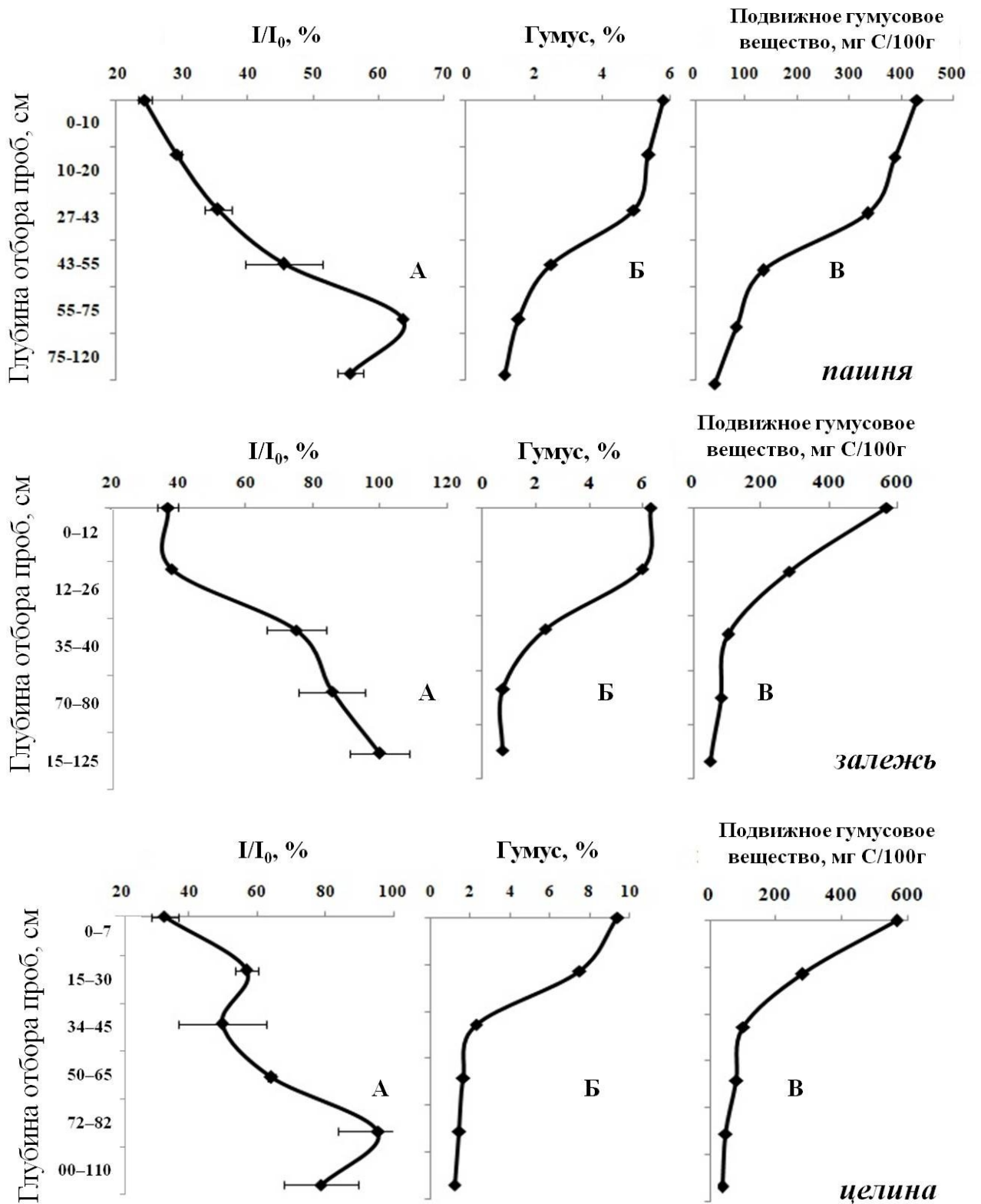


Рисунок 6 – Изменение остаточного свечения ферментативной системы (А), содержания гумуса (Б) и подвижного гумусового вещества (В) в полнопрофильном разрезе почвы пашни, 10-летней залежи и целины

Выводы:

1) На основе анализа чувствительности моно-, би- и триферментных систем, ответственных за разные метаболические функции организма, к модельным почвенным поллютантам, были выбраны ферментативные системы для комплексного ферментативного биотеста для оценки загрязнения почвенных систем. Ферментативные системы (моноферментные, катализируемые НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и бутирилхолинэстеразой, биолюминесцентная биферментная и сопряженная с ней триферментная) обладают чувствительностью к модельным почвенным поллютантам на уровне ПДК, что обеспечивает возможность их включения в состав комплексного ферментативного биотеста.

2) Комплексные ферментативные биотесты для оценки загрязнения почв различаются по составу в зависимости от назначения. Для оценки промышленного загрязнения применяют оксидоредуктазу, биферментную систему Р + Л и триферментную систему, сопряженную с алкогольдегидрогеназой, для оценки сельскохозяйственного загрязнения применяют бутирилхолинэстеразу, биферментную биолюминесцентную систему Р + Л и триферментную систему, сопряженную с лактатдегидрогеназой.

3) Изучение закономерностей влияния водных вытяжек из модельных почвенных смесей и природных почв и грунтов на моно-, би- и триферментные системы в присутствии модельных поллютантов и без них показало, что результаты ферментативного биотестирования зависят от типа и разновидности почвы. Наибольшее влияние оказывает содержание гумусовых веществ более 0,77–1,41%, а подвижных гумусовых веществ более 50 мгС/100г. Мутность водной вытяжки из почв и его кислотные свойства не оказывают существенного влияния на результаты биотестирования.

4) Создан банк из 68 модельных почвенных грунтов в качестве контрольных образцов для учета влияния типа и разновидности почвы при проведении ферментативного биотестирования, отличающихся в широком диапазоне содержанием гумусовых веществ и гранулометрическим составом.

5) Создана информационная платформа, позволяющая сравнивать результаты ферментативного биотестирования загрязненных почв с референтными «чистыми» контрольными показателями. Разработанная программа хранит сведения о банке стандартных почвенных образцов, обеспечивает оптимальный поиск стандарта почвы по содержанию гумуса и гранулометрическому составу и визуализирует результаты сравнения исследуемого образца со стандартом.

6) Разработанный комплексный ферментативный биотест, состоящий из набора репрезентативных ферментных систем, обеспечивающих оптимальный уровень чувствительности, банка модельных почвенных образцов в качестве контроля при проведении анализа, а также программы, которая учитывает и сравнивает показатели модельных почвенных грунтов с исследуемыми, был апробирован и показал эффективность при оценке загрязнения сельскохозяйственных и городских почв Красноярского края, подверженных длительному антропогенному влиянию.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, входящих в Перечень ВАК РФ (и приравненных к ним):

1. **Kolossova, E. M.** Bioluminescent-inhibition-based biosensor for full-profile soil contamination assessment / **E. M. Kolossova**, O. S. Sutormin, A. A. Shpedt, L. V. Stepanova, V. A. Kratasyuk // Biosensors. – 2022. – Vol. 12. – P. 353. (Q2)

2. **Kolossova, E. M.** Bioluminescent enzyme inhibition-based assay for the prediction of toxicity of pollutants in urban soils / **E. M. Kolossova**, O.S. Sutormin, L. V. Stepanova, A. A. Shpedt, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Environmental Technology & Innovation. – 2021. – Vol. 24. – P. 101842. (Q1)

3. Kratasyuk, V. A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis / V. A. Kratasyuk, **E. M. Kolossova**, O. S. Sutormin, V. I. Lonshakova-Mukina, M. M. Baygin, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, A. A. Shpedt // Sensors. – 2021. – Vol. 21(3). – P. 1017. (Q1)

4. **Колосова, Е. М.** Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы / **Е. М. Колосова**, О. С. Сутормин, Е. Н. Есимбекова, В. И. Лоншакова-Мукина, В. А. Кратасюк // Доклады академии наук. – 2019. – N 1. – С. 103-107. (Q2)

5. Сутормин, О. С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би-и триферментной систем / О. С. Сутормин, **Е. М. Колосова**, Е. В. Немцева, О. В. Искорнева., А. Е. Лисица., В. С. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В. А. Кратасюк // Цитология. – 2018. – N 10. – С. 826-829. (Q4)

6. **Байгина, Е.М.** Анализ возможности применения биолюминесцентных ферментативных биотестов для оценки загрязнения почвы (на примере почв г. Красноярска) / **Байгина Е.М.**, Римацкая Н.В., Степанова Л.В., Кратасюк В.А. // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2017. – Т. 21. – С. 21-30.

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021660358 Российская Федерация. Программное обеспечение для сопоставления стандартных результатов ферментативной активности сенсоров для анализа загрязнения почв : № 2021615905 : заявл. 20.04.2021 : опубл. 24.06.2021 / М. М. Байгин, **Е.М. Колосова** ; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ).

Наиболее значимые публикации в иных научных изданиях:

1. Korobko, A. Constructing the model-driven system for scientific researches support on the original software platform for primary data consolidation / Korobko A., Korobko A., **Kolossova E.** // International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM. – 2018. – Vol. 18. –N 2.1. – P. 255-262. (Scopus, РИНЦ)

2. **Байгина, Е.М.** Развитие методов биологического мониторинга почв / **Байгина Е.М., Шпедт А.А., Кратасюк В.А., Римацкая Н.В., Степанова Л.В., Матвиенко В.С.** // Почвенные ресурсы Сибири: вызовы XXI века. Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 110-летию выдающегося организатора науки и первого директора ИПА СО РАН Романа Викторовича Ковалева. Ответственный редактор А.И. Сысо. – Издательский Дом Томского государственного университета. – 2017. – С. 237-241. (РИНЦ)

3. Шпедт, А.А. Генезис, свойства и плодородие черноземов Красноярского края / Шпедт А.А., Кратасюк В.А., Римацкая Н.В., **Байгина Е.М.** // Черноземы центральной России: генезис, эволюция и проблемы рационального использования сборник материалов научной конференции, посвященной 80-летию кафедры почвоведения и управления земельными ресурсами в 100-летней истории Воронежского государственного университета (Воронеж, 15-19 мая 2017). - Воронежский государственный университет (Воронеж) . – 2017. – С. 433-437. (РИНЦ)

4. **Байгина, Е.М.** Оценка загрязнения почв биolumинесцентным ферментативным биотестом / **Байгина Е.М., Шпедт А.А., Кратасюк В.А.** // Почвоведение – продовольственной и экологической безопасности страны: тезисы докладов VII съезда Общества почвоведов им. В.В. Докучаева и Всероссийской с международным участием научной конференции (Белгород, 15–22 августа 2016 г.). Часть II. / Отв. ред.: С.А. Шоба, И.Ю. Савин. – Москва-Белгород: Издательский дом «Белгород» . – 2016. – С. 65-67. (РИНЦ)

5. **Elizaveta Baigina**, Nadezhda Rimatscaya, Elena Esimbekova & Valentina Kratasyuk. Enzyme Bioluminescent Method For The Integrated Assessment Of Soil Toxicity / **Elizaveta Baigina**, Nadezhda Rimatscaya, Elena Esimbekova & Valentina Kratasyuk // Технологии биотестирования в экологической оценке агроценозов и гуминовых веществ: Материалы международной молодежной школы / под общ.ред. В.А.Тереховой, К.А.Кыдралиевой, МГУ, 21-23 ноября 2014г., Москва: Изд-во «Доброе слово», С. – 103-104

6. Rimatskaia, N. Application of bioluminescent enzymatic method for assessment of the state of the soil / Rimatskaia N., **Baigina E.**, Kazanceva M., Stom D.I., Kratasyuk V. // Luminescence. –2014. – Vol. 29. – P. 76-77. (*Web of science*)