

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Кратасюк В.А.
« ____ » _____ 2017

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**Применимость биолюминесцентного экспрессного теста для
исследования ирригационных растворов**

03.03.02

Руководитель _____ к.б.н. Трифонов С.В.

Выпускник ФБ13-01 №041312959 _____ Банных И.Е.

Красноярск 2017

Реферат

Тема ВКР: применимость биолюминесцентного экспрессного теста для исследования токсичности ирригационных растворов биолого-технических систем жизнеобеспечения. Работа содержит 53 страницы, 14 иллюстраций, 5 таблиц, 4 формулы, 57 использованных источников.

Перечень ключевых слов: *замкнутые экосистемы, биолого-технические системы жизнеобеспечения, ферментная система, биолюминесценция, токсичность, экспрессный тест, высшие растения.*

Гипотеза: токсичность ирригационных растворов для растений возможно определить с помощью биолюминесцентного метода.

Цель: оценка возможности применимости биолюминесцентного экспрессного теста для исследования качества питательных растворов, образующихся внутри системы.

Задачи:

1. Оценить биолюминесцентное свечение в различных типах ирригационных растворов.
2. Определить зависимости между свечением и состоянием ценозов растений, выращенных на данных растворах.
3. Установить зависимость остаточного свечения от минерального состава растворов.
4. Определить зависимость остаточного свечения от концентрации органических веществ в растворах

Актуальность и новизна: разработка экспрессных методов анализа ирригационных растворов биолого-технических систем жизнеобеспечения поможет в проектировании замкнутых экосистем; биолюминесцентный биферментный метод до этого не применялся для исследования компонентов БТСЖО.

Вывод: биолюминесцентный биферментный экспрессный тест не позволяет определить наличие немодельного токсина в растворах.

Содержание

Реферат.....	2
Введение.....	4
1.1. Космонавтика и системы жизнеобеспечения.....	4
1.2. Высшие растения как звено СЖО.....	11
1.3. Эксперименты в вегетационных камерах.....	14
1.4. Токсичность.....	15
1.5. Определение токсичности.....	17
1.6. Биолуминесцентный метод тестирования.....	20
2. Материалы и методы.....	23
2.1. Характеристика образцов.....	23
2.2. Фотометрия.....	24
2.3. Хромато-масс-спектрометрия.....	25
2.4. Биолуминесценция.....	25
2.5. Уравнение парной регрессии.....	27
3. Результаты и обсуждение.....	29
3.1. Результаты биолуминесцентного теста.....	29
3.2. Корреляционный анализ минеральных веществ.....	31
3.2.1. Параметры уравнения регрессии.....	32
3.2.2. Коэффициент корреляции.....	32
3.2.3. Уравнение регрессии (оценка уравнения регрессии).....	33
3.3. Характеристика корреляций.....	35
3.4. Корреляционный анализ зависимости остаточного свечения от органических веществ.....	43
Выводы.....	44
Заключение.....	45
Список сокращений.....	46
Список использованных источников.....	47

Введение

Изучение космического пространства нельзя представить без нахождения человека в космосе. Чтобы обеспечить возможность длительного существования человека в условиях космических миссий необходимо поместить его в соответствующую среду на космическом судне или станции.

Для этой цели разрабатываются технологии замкнутых систем жизнеобеспечения. Наиболее оптимальным вариантом на сегодняшний день являются биолого-технические системы жизнеобеспечения (БТСЖО), в которых регенерация среды и утилизация органических отходов осуществляется биологическими и физико-химическими звеньями. Прообразом такой БТСЖО, например, является БИОС-3 в Институте Биофизики СО РАН.

Разработка БТСЖО, которые включают в себя звено с высшими растениями, связана с необходимостью обеспечить такую систему обширным пулом необходимых для замыкания системы веществ. Предсказать поведение СЖО с большим количеством составляющих — нетривиальная задача, поэтому для своевременного управления экспериментом необходимы экспрессные методы анализа.

1.1. Космонавтика и системы жизнеобеспечения

Реализация перспективных орбитальных и межпланетных полетов связана с совершенствованием систем жизнеобеспечения (СЖО) экипажа. Жизнеобеспечение, основанное на запасах воды и кислорода, оправдывает себя только при кратковременных и практически невозможно при дальних космических миссиях. Поэтому необходима организация на борту станции круговорота воды и кислорода, аналогичного происходящему в земной биосфере.[2, 3] Из-за энергетических, объемных и массовых ограничений на Международной космической станции (МКС) в настоящее время и в ближайшей перспективе будут использоваться искусственно организованные физико-химические процессы. Целесообразно введение в состав СЖО витаминной оранжереи. Использование биологических процессов и

воспроизведение пищи являются задачами будущего, но и в этом случае физико-химические системы будут согласовывать и нормировать работу биосистем. [4,9,12]

Несмотря на многочисленные работы по исследованию различных путей регенерации среды биологическими методами в замкнутых СЖО, на данный момент не существует ни одной реально действующей СЖО, основанной на использовании только биологических методов регенерации среды, либо системы с включенными в нее только биологическими методами окисления отходов. [10,15] В первую очередь это связано с тем, что такие системы имеют большие времена окупаемости (более года), занимают большие площади и технически тяжело осуществить их использование в условиях микрогравитации. А к настоящему времени, как известно, не было совершено ни одной продолжительной космической миссии на поверхности какой-либо планеты, и на сегодняшний день все пилотируемые полеты проходят на околоземной орбите. Из этого следует, что все когда-либо разрабатываемые рабочие СЖО для выполнения космических миссий основаны на физико-химических методах, что в данной ситуации является наиболее успешным технологическим решением.

Кроме того, биологические компоненты системы тяжелее контролировать, возможны процессы мутации и различные физиологические отклонения под действием условий космического полета: невесомости, радиации, повышенной температуры и др. Для выяснения влияния условий космических полетов на живые организмы проводятся многочисленные эксперименты, которые выполняются на протяжении всего периода пилотируемых космических полетов.

Биологические методы регенерации среды в плане производства пищи для экипажа незаменимы. Однако выполнение остальных функций обеспечения благоприятных условий для экипажа следует проводить совместно с физико-химическими методами, так как они могут ускорять некоторые процессы преобразования вещества. Таким образом, можно подчеркнуть, что именно

интегрированные биолого-технические системы жизнеобеспечения (БТСЖО), в которых совмещены биологические и физико-химические методы регенерации среды, являются наиболее перспективными. [11,18]

К настоящему времени было создано несколько прототипов замкнутых систем жизнеобеспечения. Ведущими странами в этом направлении являются США, Россия, Япония, Китай и ЕС. Некоторые из этих систем предназначены не только для отработки технологий регенерации среды в условиях космических миссий, но и для проведения экологических экспериментов, с применением полученных данных в земных приложениях – прогнозирование результатов воздействия некоторых антропогенных факторов на экологическое состояние планеты. Так, например, японская замкнутая БТСЖО CEEF (Closed Ecology Experiment Facilities) предназначена в первую очередь для исследования путей и динамики транспорта радиоактивного изотопа углерода C^{14} из воздушной среды, через растения и гетеротрофные организмы к человеку [6]. Данная система состоит из 4-х звеньев: звено высших растений, звено гетеротрофных организмов (2 козы), экипаж (2 испытателя) и звено утилизации органических отходов. Наряду с экспериментами, носящими экологический характер, в этой системе отрабатываются различные технологии культивирования растений, переработки органических отходов и другие моменты, связанные с регенерацией среды обитания человека, описанные выше.

Такой подход к искусственным экологическим системам вполне оправдан, так как они представляют собой упрощенную модель земной биосферы, в которой также налажены потоки вещества между различными трофическими звеньями: продуцентами, консументами и редуцентами. [3] К тому же данные системы позволяют проводить эксперименты с различными сценариями изменения экологической обстановки, чего естественно нельзя сделать с реальной биосферой. Таким образом, искусственные экологические системы становятся удобным инструментом в руках исследователей,

позволяющим прогнозировать последствия влияния человека на естественную среду обитания. [3, 15]

Одним из ярких представителей замкнутых экологических систем, в которых «в миниатюре» исследовались процессы взаимодействия между различными экологическими нишами живой природы, является американская система BIOSPHERE-2 [16]. При создании данной системы было допущено ошибочное предположение, что для создания устойчивой замкнутой экологической системы достаточно скопировать основные экотопы, присутствующие на нашей планете. Предполагалось, что таким образом организмы из различных экологических зон самостоятельно смогут придти к равновесию в процессах массообмена и регулирования некоторых условий среды, как это происходит в естественных условиях. В случае успеха, такой опыт создания замкнутых БТСЖО мог бы использоваться при построении инопланетных баз для поддержания комфортных условий среды обитания человека.

BIOSPHERE-2 представляет собой сеть герметичных зданий общей площадью 1,5 га из лёгких материалов, разделённых на несколько независимых экосистем и покрытых стеклянным колпаком, пропускающим около 50% солнечного света. Внутреннее пространство разделено на 7 блоков, среди которых — тропический лес, миниатюрный океан, болото, пустыня, саванна и мангровый эстуарий. В комплекс было помещено восемь человек (четыре женщины и четверо мужчин), где они пробыли около двух лет, поддерживая связь с внешним миром только через компьютер. Вместе с ними туда же были доставлены 3000 видов растений и животных.

Несмотря на попытку копирования экологических условий сложившихся на нашей планете, данный эксперимент успеха не имел. В сложившихся искусственных условиях возникло множество проблем: некоторые виды растений сильно страдали от паразитов, произошло непредвиденно сильное развитие микроорганизмов и насекомых. Паразиты уничтожали посевы, нарушился баланс между окислительными процессами в почве и процессом

фотосинтеза, в результате уровень кислорода начал сильно сокращаться, и люди оказались в условиях кислородного голодания. Чтобы решить эту проблему пришлось искусственно закачивать кислород в атмосферу системы, а затем и вносить дополнительные продукты питания. Кроме того, из-за отсутствия ветра деревья становились очень хрупкими и легко ломались под своей тяжестью. В дальнейшем эксперименты с этим комплексом не проводились.

Помимо Биосферы-2 в США велись работы над созданием искусственных БТСЖО в проекте BIOPLEX (Harris, 2003). Она представляет собой систему по своей структуре значительно более простую и легкоуправляемую, чем BIOSPHERE-2. Концепция этой замкнутой СЖО заключается в следующем: главным средообразующим элементом являются высшие растения, а все органические отходы предполагается перерабатывать физико-химическим методом, используя получаемые при этом элементы в качестве минерального питания растений.

В Европе ведутся работы по проекту MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) [48, 49]. МЕЛИССА создавалась как инструмент для понимания устройства и функционирования БТСЖО, а так же, как постоянная база для развития БТСЖО для продолжительных миссий человека в космосе (лунная база, миссия на Марс и т.д.)

В нашей стране проводились эксперименты с включением экипажа из 2 – 3 человек длительностью от 4 до 6 месяцев в 70-х годах в экспериментальной замкнутой БТСЖО БИОС-3. Сама по себе эта система является пионерским и наиболее успешным прототипом будущих замкнутых БТСЖО. Основной целью создания БИОС-3 являлась имитация условий существования человека в замкнутом пространстве с использованием земных круговоротных процессов настолько долго, насколько это возможно.

Главные технологии, которые были отработаны в течение этих экспериментов:

1. гидропонный и аэропонный методы выращивания высших растений;

2. использование транспирационной влаги, как источника питьевой воды (с добавлением минералов);
3. и сжигание летучих органических примесей в каталитической печи для снижения уровня O_2 и включения части несъедобной растительной биомассы во внутрисистемный массообмен.

Основными результатами экспериментов 70-х – 80-х годов являлись:

1. достигнуто обеспечение самоподдерживающегося режима в течение 4 – 6 месяцев для экипажа из 2 – 3 человек с почти 100 % замыканием по воде и кислороду, а также более чем 50 % замыкание по пище;
2. показана надежность и стабильность биологических компонентов БИОС-3, его конструкция, герметичность и замкнутость внутреннего массообмена обеспечили устойчивое состояние системы на протяжении всего эксперимента;
3. достигнут такой уровень жизнеобеспечения экипажа, при котором не возникало жалоб на здоровье участников ни во время проведения экспериментов, ни в течение их дальнейшей жизни;
4. БИОС-3 обеспечил возможность постоянного контроля процессов изнутри самими членами экипажа, с минимальным влиянием снаружи и требуемым уровнем герметичности;
5. показана возможность поддержания в БИОС-3 высокого качества жизненных условий (настолько, насколько это возможно близко к земным условиям), обеспеченных биологическими компонентами БТСЖО и другими элементами инфраструктуры.

На сегодняшний день при исследовании БТСЖО продолжают работы по изучению возможности повышения продуктивности ценозов с помощью повышенных уровней облучения.

Несмотря на все успехи в области решения проблем регенерации среды обитания человека в условиях замкнутой БТСЖО до сих пор не было предложено метода переработки органических отходов, который мог бы в полной мере удовлетворить нуждам данного типа систем. Метод мокрого

сжигания в среде перекиси водорода, разработанный в Лаборатории УБФ Института биофизики СО РАН, является одним из наиболее перспективных в этом плане. Это обусловлено тем, что он не предполагает использование громоздкого оборудования, а процесс окисления протекает в течение малого промежутка времени при относительно низких температурах и давлении. Однако, как было сказано, до сих пор не было проведено исследования газовой составляющей продуктов мокрого сжигания, в частности, необходимо проанализировать ее состав и оценить влияние на формирование урожая высших растений.[10, 11]

В условиях БТСЖО съедобная биомасса выращенных растений должна быть использована для питания человека, а для компенсации выноса нутриентов могут быть использованы после соответствующей переработки экзометаболиты человека. К сожалению, в настоящее время нет разработанной технологии, позволяющей наиболее полно использовать минерализованные экзометаболиты, содержащие NaCl, для выращивания растений на ППС. В случае комбинированного способа выращивания растений в БТСЖО (методом гидропоники и на ППС) несъедобную биомассу растений (например, пшеницы), выращенных методом гидропоники на нейтральном субстрате с использованием минерализованных экзометаболитов человека [6], можно использовать для возмещения нутриентов, вынесенных из ППС со съедобной биомассой. При этом, как показали тестовые опыты, внесение соломы без предварительной минерализации привело к значительному снижению продуктивности редиса. В то время как продуктивность растений редиса, выращенных на ППС с внесением в ирригационный раствор минерализованной соломы, не отличается от продуктивности контрольных растений [4]. Таким образом, для использования ППС в качестве субстрата для выращивания растений в БТСЖО необходимо провести более подробные исследования, посвященные разработке способов внесения растительных остатков, изучению скорости их разложения и устранению возможного отрицательного влияния промежуточных продуктов «биологической» минерализации на рост растений.

Помимо системы БИОС-3 проводились эксперименты по созданию БТСЖО в Институте медико-биологических проблем. Так, например, выполнялись исследовательские работы с Наземным экспериментальным комплексом (НЭК), в которых предпринимались попытки совместить функционирование биологических и физико-химических методов. В том же институте был проведен эксперимент по проекту МАРС-500, в котором происходила имитация 500-дневного полета на Марс. Главной целью этого эксперимента являлось исследование психо-физиологического состояния экипажа в условиях приближенных к реальной космической Марсианской миссии. Кроме того отрабатывались некоторые технологии регенерации среды, такие как культивирование высших растений в установках предназначенных для космических полетов: «Лада», «Свет», «Фитоцикл СД» и другие. [17]

Китайские исследования по созданию БТСЖО пока только касаются вопросов имитации выращивания культурных растений в условиях искусственных экосистем[22], работ с ППС и подбора видов-кандидатов в гетеротрофное звено. [7] Экспериментов с полным замыканием массообмена в системе и включением в нее человека еще не проводились

Как видно, во всех упомянутых проектах по созданию замкнутых БТСЖО было принято, что растения являются неотъемлемой частью данных систем и играют основную роль в средообразовании. Естественно, что при проектировании полетных БТСЖО необходимо детально изучить вопросы, касающиеся взаимодействия физико-химических методов регенерации среды и высших растений фотоавтотрофного звена.

1.2. Высшие растения как звено СЖО

Для использования высших растений как регенераторов среды и поставщиков растительной пищи для полетных и планетарных СЖО потребовалось изучить вопросы влияния условий космического полета на их рост и развитие. [5, 11] Было оценено воздействие таких общих факторов

влияния, как микрогравитация, спектр и интенсивность освещения, фотопериод, влияние радиации экстремальных температур. В настоящее время интересным является вопрос изучения влияния различных звеньев замкнутой БТСЖО на высшие растения, в частности, важно знать влияние физико-химических методов регенерации среды. Главное требование к данным методам заключается в том, что они не должны препятствовать получению максимального урожая, так как первоочередной задачей растений является производство пищи и кислорода для экипажа.

Как уже было сказано, физико-химическим методам в первую очередь отводится роль утилизации и переработки органических отходов. Как правило, эксперименты, связанные с разработкой данных методов, протекают параллельно с экспериментами по выращиванию растений на получаемых продуктах минерализации. Например, японский метод сухого сжигания органических отходов доказал возможность использования получаемой золы в качестве минерального удобрения при культивировании растений. [20]

Одной из проблем, связанных с российской разработкой мокрого метода сжигания органических отходов [10, 28] является наличие в получаемом минерализованном растворе больших концентраций NaCl. Данное обстоятельство вызвано высоким содержанием этой соли в жидких выделениях человека и, вообще говоря, является проблемой для любых методов утилизации экзометаболитов человека. Как уже отмечалось выше, одним из путей решения этой проблемы является периодическая культивация солероса на получаемом минерализованном растворе, что позволит значительно сократить концентрацию NaCl в растворе. [19] Так в эксперименте с 7-месячным конвейерным выращиванием пшеницы каждые две недели забиралось 12 л питательного раствора из вегетационной камеры этого растения, и на нем культивировался солерос, затем раствор возвращался обратно в камеру с пшеницей. В результате такого метода культивирования удалось снизить концентрацию Na до 400 мг/л и получить хороший урожай пшеницы [19]. Кроме того, было показано, что возможно выращивание салатных культур при

содержании этой соли в растворе в концентрации, соответствующей ее содержанию в моче человека [51]. К тому же, возможна диета членов экипажа с пониженным потреблением соли (3 г/день), что должно позволить априори снизить концентрацию NaCl в питательной среде.

Так же были проведены эксперименты по совместному применению данного физико-химического метода мокрого сжигания органических отходов и биологического метода утилизации с помощью ППС [50]. В результате этого эксперимента было проведено 9 рабочих циклов, продолжительностью по 63 – 67 дней, включающих посадку растений, сбор урожая и возвращение биомассы в цикл. Как было показано, выращивание пшеницы прошло вполне успешно, доля органического материала переработанного методом мокрого сжигания составила 60 – 65 %, а переработанного в ППС – 35 – 40 %.

Это позволяет предположить, что метод мокрого сжигания в среде перекиси водорода может быть перспективным в плане его использования в будущих замкнутых БТСЖО. Тем не менее, до сих пор не было детально изучено влияние газовой составляющей данного метода на высшие растения в условиях биолого-технической системы жизнеобеспечения.

Несмотря на все успехи в области решения проблем регенерации среды обитания человека в условиях замкнутой БТСЖО до сих пор не было предложено метода переработки органических отходов, который мог бы в полной мере удовлетворить нуждам данного типа систем. Метод мокрого сжигания в среде перекиси водорода, разработанный в Лаборатории УБФ Института биофизики СО РАН, является одним из наиболее перспективных в этом плане. Это обусловлено тем, что он не предполагает использование громоздкого оборудования, а процесс окисления протекает в течение малого промежутка времени при относительно низких температурах и давлении.

1.3. Эксперименты в вегетационных камерах

Метод мокрого сжигания в среде перекиси водорода может быть перспективным в плане его использования в будущих замкнутых БТСЖО. Тем не менее, до сих пор не решен ряд проблем: на выходе из реактора получаются растворы с большими концентрациями NaCl. До сих пор нет методики, которая будет эффективно уменьшать концентрацию NaCl. Также нет быстрых методов разложения мочевины, те что существуют занимают по несколько часов и без добавления дополнительных реактивов не полностью разлагают мочевину до аммонийной и нитратной форм азота, которые могут быть вовлечены в массообмен системы.

Для эксперимента были выбраны растения пшеницы, чуфа и такие овощные культуры как свекла, редис и салат.

Растения выращивались в 2-х герметичных вегетационных камерах из нержавеющей стали объемом 3 м³ каждая. Посевная площадь пшеницы составляла 0,384 м², чуфы — ..., овощных культур — ...

Выращивание пшеницы проводилось методом агрегатопоники. В качестве субстрата был использован керамзит. Благодаря такой технологии выращивания полнее раскрывается биологический потенциал растений, так как упрощается борьба с болезнями и вредителями, создаются благоприятные условия водно-воздушного режима благодаря тому, что в крупных порах субстрата содержится воздух, а на поверхности его частичек – пленка питательного раствора, образуемая после увлажнения. В целом, использование гидропонного метода выращивания растений дает возможность повысить продуктивность растений на 20 – 40 % в сравнении с использованием обычного грунта, как субстрата.

Полив осуществлялся автоматически каждые 4 часа, данный режим полива был выбран для того, чтобы избежать возможного пересыхания корнеобитаемого субстрата из-за температурного режима вегетационной камеры и того, что осуществлялось вентилирование и применялись высокие

интенсивности света. Объем питательного раствора составлял 11 л, что позволяло в момент полива полностью увлажнить корнеобитаемый субстрат. Полное увлажнение субстрата происходило за 3 мин. работы насоса, благодаря такой скорости полива удавалось избежать повреждения корневых волосков, что обеспечивало нормальное развитие корневой системы растений.

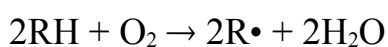
Чуфу и овощные культуры выращивали на ППС.

Температура воздуха устанавливалась в диапазоне $24 \pm 2^\circ\text{C}$, соответствующему наибольшей фотосинтетической продуктивности СЗ-растений. Терморегуляция осуществлялась с помощью автоматического нагревателя и водного охлаждения. Вода подавалась на потолок камеры, выполненный из стеклопластика, для предотвращения его оплавления под действием света лампы. Также вода подавалась в радиаторы охлаждения, установленные внутри камеры перед вентиляторами, предназначенными для перемешивания воздуха в камере.

1.4. Токсичность

В ходе эксперимента пшеница начала увядать. Предполагается, что питательные растворы содержат токсические для растений вещества — активные органические радикалы, являющиеся продуктами неполного окисления в реакторе "мокрого" сжигания. Механизм цепного окисления органических соединений в среде перекиси водорода, активированной электрическим полем можно представить следующим образом:

1) Инициирование:



2) Продолжение цепи:



$\text{ROO}\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}\cdot$, константа скорости реакции – k_3

3) Вырожденное разветвление цепи:

$\text{ROOH} \rightarrow \text{RO}\cdot + \text{OH}\cdot$, константа скорости реакции – k_4

4) Обрыв цепи:

$\text{R}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{R-R}$, константа скорости реакции – k_5

$\text{R}\cdot + \text{ROO}\cdot \rightarrow \text{ROOR}$, константа скорости реакции – k_6

$\text{ROO}\cdot + \text{ROO}\cdot \rightarrow \text{ROH} + \text{R}_1\text{COR}_2 + \text{O}_2$, константа скорости реакции – k_7

5) Ингибирование процесса:

$\text{R}\cdot + \text{XH} \rightarrow \text{X}\cdot + \text{RH}$

Свободные радикалы $\text{R}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ и $\text{OH}\cdot$ весьма активны и быстро исчезают, взаимодействуя друг с другом и органическим веществом. Поэтому в реакции окисления очень быстро устанавливается стационарная концентрация этих радикалов, при которой скорости образования и гибели радикалов равны. [57]

Было решено проверить гипотезу о токсичности компонентов питательных растворов.

1.5. Определение токсичности

Для определения токсичности могут быть использованы химические методы, основным критерием оценки которых является превышение содержания токсикантов по сравнению с их ПДК. Эти методы отличаются исключительной избирательностью и точностью, т. к. выполняются с использованием химических реагентов. Химический анализ этих веществ длителен, и реально лучшие из санитарно-эпидемиологических служб проводят анализ только по 20-50 веществам. При этом анализируются 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.

Также эффективным методом оценки потенциальной опасности химического, физического или биологического воздействий, считается биотестирование. Биотестирование осуществляется экспериментально с использованием, как правило, стандартизованных лабораторных тест-систем, путем регистрации изменений биологически важных показателей (тест-реакций) под воздействием исследуемых проб с последующей оценкой их состояния в соответствии с выбранными критериями токсичности. Тест-система представляет собой пространственно ограниченную совокупность чувствительных биологических элементов (сенсоров) и исследуемой среды, в которой они находятся.

Таким образом проводятся биотестирования токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний, цериодафний, по уровню флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей; хемотаксической реакции инфузорий и т.п. [53, 54, 55, 56]

Тест-методы – это экспрессные, простые и дешевые приемы обнаружения и определения вещества на месте (on site). Они, как правило, не требуют сложных приемов подготовки пробы к анализу (например, разделения и концентрирования). При их использовании резко сокращается и во многих случаях отпадает необходимость в использовании доро- гостоящего и сложного лабораторного оборудования и самих аналитических лабораторий. Естественно, что при этом уменьшается потребность в высоко- квалифицированных специалистах, нехватка которых ощущается во всех странах. Тест-методы в большинстве случаев служат для оценки присутствия и содержания определенных компонентов в анализируемых образцах. [37]

Общий принцип большей части химических тест-методов заключается в использовании реакций с так называемыми хромогенными (цветообразующими) реагентами. Реакции проводят в таких условиях, чтобы можно было визуально зафиксировать их результат. Этим результатом могут быть интенсивность окрашивания, цвет бумажной полоски или длина окрашенной части индикаторной трубки. Большинство используемых тест-методов служат измерительным средством однократного применения. Большое распространение получили индикаторные трубки для измерения концентрации вредных и взрывоопасных веществ в воздухе рабочей зоны [24]. Индикаторная трубка – это стеклянная трубка, заполненная твердым носителем. На пористую поверхность носителя наносят хромогенные реагенты. В качестве носителей применяют порошкообразные материалы: силикагель, фарфор, стекло. Используют и химически модифицированные носители [30]. Определение токсичных веществ (200 наименований органических и неорганических соединений) основано на измерении длины изменившего первоначальную окраску слоя индикаторного порошка после пропускания через него определенного объема воздуха, которая пропорциональна его концентрации. Этот способ получил название линейно-колористического метода. В тех случаях, когда анализируемый воздух содержит смесь веществ с близкими химическими свойствами, определение состава и содержания токсичных

компонентов можно провести после десорбции их производных с носителя методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Несмотря на внешнюю простоту таких тест-устройств, они обеспечивают погрешность измерения, не превышающую 25% при содержании определяемых веществ до $0,01 \text{ млн}^{-1}$. Основная трудность при их создании – это подбор специфических хромогенных реагентов. Для определения фосгена, например, в качестве реагентов используют смесь *n*-диметиламинобензальдегида и диэтиламина, сероводорода – соединения ртути (II).

В основу ферментных тест-методов положено свойство ионов металлов и органических токсикантов ингибировать (замедлять) процессы каталитического превращения веществ в присутствии биологических катализаторов-ферментов.

Особую роль в оценке состояния окружающей среды играют биологические тесты. Это связано с тем, что результаты химического анализа, проводимого с помощью сложного аналитического оборудования, во многих случаях не позволяют оценить истинную опасность тех или иных загрязнителей на среду обитания, прогнозировать последствия их воздействия на живые организмы. Многообразные загрязняющие вещества, попадая в окружающую среду, могут претерпевать в ней различные превращения, усиливая при этом свое токсическое действие. По этой причине оказались необходимыми методы интегральной оценки качества среды (воды, почвы, воздуха). Огромную роль при этом играют методы биотестирования и биоиндикации [25]. Под биотестированием понимают приемы исследования, при котором о качестве среды, факторах, действующих самостоятельно или в сочетании с другими, судят по выживаемости, состоянию и поведению специально помещенных в эту среду организмов – тест-объектов. Биоиндикация – родственный биотестированию прием, использующий для этих же целей организмы, обитающие в исследуемой среде. При выборе таких организмов приходится соблюдать определенные требования, среди которых возможность фиксировать четкий, воспроизводимый и объективный отклик на воздействие внешних

факторов, чувствительность этого отклика на малые содержания загрязнителей и др. Известен пример биотестирования, основанный на использовании канареек для индикации появления рудничного газа в горных выработках горняками в средние века. Поведение птицы или ее гибель оповещали шахтеров о грозящей им опасности.

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

Биолюминесцентный биферментный тест имеет такие важные преимущества как экспрессность и интегральность, а также высокую чувствительность даже к следовым концентрациям токсинов, что позволяет проводить быстрый качественный анализ.

1.6. Биолюминесцентный метод тестирования

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.

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 [46].

Новое направление биолюминесцентного биотестирования отличается тем, что в качестве тест-объектов вместо светящихся бактерий используются реакции, катализируемые люциферазой, биферментной системой: NADH:FMN-оксидоредуктаза - люцифераза.

Биферментный биолюминесцентный тест позволит делать экспрессные тесты компонентов такой сложной системы как биолого-техническая система жизнеобеспечения.

Гипотеза: токсичность ирригационных растворов для растений возможно определить с помощью биолюминесцентного метода.

Цель: оценка возможности применимости биолюминесцентного экспрессного теста для исследования качества питательных растворов, образующихся внутри системы.

Задачи:

1. Оценить биолюминесцентное свечение в различных типах ирригационных растворов.
2. Определить зависимости между свечением и состоянием ценозов растений, выращенных на данных растворах.
3. Установить зависимость остаточного свечения от минерального состава растворов.

4. Определить зависимость остаточного свечения от концентрации органических веществ в растворах

Актуальность и новизна: разработка экспрессных методов анализа ирригационных растворов биолого-технических систем жизнеобеспечения поможет в проектировании замкнутых экосистем; билюминесцентный биферментный метод до этого не применялся для исследования компонентов БТСЖО.

2. Материалы и методы

2.1. Характеристика образцов

Таблица 1. Характеристика образцов ирригационных растворов

№	Состав ирригационного раствора
1	Раствор Кнопа
2	Минерализованные методом "мокрого" сжигания экзометаболиты человека
3	Минерализованные методом "мокрого" сжигания экзометаболиты человека + коррекционные соли
4	Минерализованные методом "мокрого" сжигания экзометаболиты человека + коррекционные соли + вареные рыбы отходы
5	Ирригационная вода ППС
6	Ирригационная вода ППС + вареные рыбы отходы

Всего в работе использовались 11 образцов ирригационных растворов.

Растворы были приготовлены либо на базе почвоподобного субстрата, либо на базе растворов с сожженными экзометаболитами человека.

Разнообразие растворов по составу также обусловлено идущими в Институте Биофизики СО РАН экспериментами.

2.2. Фотометрия

Таблица 2. Минеральный анализ растворов

Образец \ Концентрация, мг/л	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Na	P	S	Zn
1. Раствор Кнопа	275,1	0,305	5,697	261,4	38,62	13,75	86,91	47,37	0,351
2. Раствор экзометаболитов 1	5,735	0,047	0,042	220,9	4,68	337,1	53,23	64,71	0,016
3. Раствор экзометаболитов 2	248,3	0,071	6,353	509,6	42,69	901,5	62,15	162,3	0,25
4. Раствор экзометаболитов 3	367,9	0,055	12,83	581,4	62,19	1091	75,08	218,1	0,533
5. Раствор экзометаболитов + корр. соли 1	98,3	0,35	3,854	179	18,81	277,6	29,18	30,9	1,084
6. Раствор экзометаболитов + корр. соли 2	94,16	0,104	0,11	164,9	18,18	255,8	29,65	27,34	0,08
7. Раствор экзометаболитов + корр. соли + рыбы отходы 1	135,3	0,154	4,628	208,3	37,41	429	34,79	39,14	0,303
8. Раствор экзометаболитов + корр. соли + рыбы отходы 2	99,51	0,07	0,174	181,9	31,88	387,2	22,08	32,63	0,045
9. Почвоподобный субстрат 1	585,9	0,055	0,748	1328	246,4	193,9	1,115	746,5	0,022
10. Почвоподобный субстрат 2	500,2	0,042	0,5	868,9	154,9	114,8	0,911	600,7	0,037
11. Почвоподобный субстрат + рыбы отходы	541,1	0,049	0,756	1107	176,9	133,5	1,396	723,1	0,075

Минеральный анализ растворов выполнен в Лаборатории аналитической химии ИБФ СО РАН с помощью методов фотометрии.

2.3. Хромато-масс-спектрометрия

Таблица 3. Результат хромато-масс-спектрометрического анализа образцов

Образец	Суммарная концентрация органических кислот [RCOOH], мг/л
1. Раствор экзометаболитов	429,386
2. Раствор экзометаболитов + корр. соли + рыбы отходы	1,257
3. Почвоподобный субстрат	1,252
4. Почвоподобный субстрат + рыбы отходы	0,430

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа получены из Лаборатории аналитической химии ИБФ СО РАН

2.4. Билюминесценция

В биотесте использовалась бактериальная биферментная система НАДН:ФМН– оксидоредуктаза –люцифераза. Реакционная смесь включает в себя:

-300 мкл Na-K-фосфатного буфера 0,05M, pH 6,8

-10 мкл КРАБа – комплект реактивов аналитической билюминесценции (Институт биофизики СО РАН, Красноярск)

-50 мкл C₁₄ (тетрадеканаль, 0,0025%), («Merck», Германия).

-100 мкл NADH 4x10⁻⁴моль/литр (никотинамидадениндинуклеотид), (производство «Sigma», США)

-50 мкл исследуемого вещества

-10 мкл ФМН 5x10⁻⁴моль/литр (фламинмононуклеотид), (производство «Serva», Германия)

Реакционная смесь помещается в измерительную кювету люминометра («Promega GloMax» 20/20 Luminometer, USA). В качестве анализируемого параметра выступает величина остаточного свечения T , которая находится по формуле

$$T = \frac{I}{I_0} * 100\% \quad (4)$$

где I – интенсивность свечения образца и I_0 – интенсивность свечения контроля (дистиллированная вода).

2.5. Уравнение парной регрессии

Проведём корреляционный анализ пар значений остаточного свечения T и концентрации железа $[Fe]$.

Метод применяют для наглядного изображения формы связи между изучаемыми экономическими показателями. Для этого в прямоугольной системе координат строят график, по оси ординат откладывают индивидуальные значения результативного признака Y , а по оси абсцисс - индивидуальные значения факторного признака X .

Совокупность точек результативного и факторного признаков называется полем корреляции.

На основании поля корреляции можно выдвинуть гипотезу (для генеральной совокупности) о том, что связь между всеми возможными значениями X и Y носит линейный характер.

Линейное уравнение регрессии имеет вид $y = bx + a$.

Оценочное уравнение регрессии (построенное по выборочным данным) будет иметь вид $y = bx + a + \varepsilon$, где ε_i – наблюдаемые значения (оценки) ошибок ε_i , a и b соответственно оценки параметров α и β регрессионной модели, которые следует найти.

Здесь ε - случайная ошибка (отклонение, возмущение).

Причины существования случайной ошибки:

1. Невключение в регрессионную модель значимых объясняющих переменных;
2. Агрегирование переменных. Например, функция суммарного потребления – это попытка общего выражения совокупности решений отдельных индивидов о расходах. Это лишь аппроксимация отдельных соотношений, которые имеют разные параметры.
3. Неправильное описание структуры модели;
4. Неправильная функциональная спецификация;
5. Ошибки измерения.

Так как отклонения ε_i для каждого конкретного наблюдения i – случайны и их значения в выборке неизвестны, то:

- 1) по наблюдениям x_i и y_i можно получить только оценки параметров α и β
- 2) Оценками параметров α и β регрессионной модели являются соответственно величины a и b , которые носят случайный характер, т.к. соответствуют случайной выборке;

Для оценки параметров α и β - используют МНК (метод наименьших квадратов).

Метод наименьших квадратов дает наилучшие (состоятельные, эффективные и несмещенные) оценки параметров уравнения регрессии. Но только в том случае, если выполняются определенные предпосылки относительно случайного члена (ε) и независимой переменной (x).

Формально критерий МНК можно записать так:

$$S = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \rightarrow \min \quad (1.1)$$

Система нормальных уравнений.

$$a_n + b \sum x = \sum y \quad (1.2)$$

$$a \sum x + b \sum x^2 = \sum yx \quad (1.3)$$

3. Результаты и обсуждение

3.1. Результаты биолюминесцентного теста

Таблица 4. Остаточное свечение с образцом в смеси

Образец	Остаточное свечение T,%
1. Раствор Кнопа	27±3
2. Раствор экзометаболитов 1	41±2
3. Раствор экзометаболитов 2	51±3
4. Раствор экзометаболитов 3	47±1
5. Раствор экзометаболитов + корр. соли 1	17±2
6. Раствор экзометаболитов + корр. соли 2	39±3
7. Раствор экзометаболитов + корр. соли + рыбы отходы 1	18±1
8. Раствор экзометаболитов + корр. соли + рыбы отходы 2	62±1
9. Почвоподобный субстрат 1	17±2
10. Почвоподобный субстрат 2	54±3
11. Почвоподобный субстрат + рыбы отходы	24±4

В результате проведения биферментного биолюминесцентного теста были получены кинетические кривые с каждым из образцов, на основе которых было установлено остаточное свечение. Ожидалось, что, в виду своей относительной чистоты, раствор Кнопа будет иметь наиболее высокое значение остаточного

свечения, которое можно будет принять за референтное. Эксперимент показал неотличимость контроля от основной выборки.

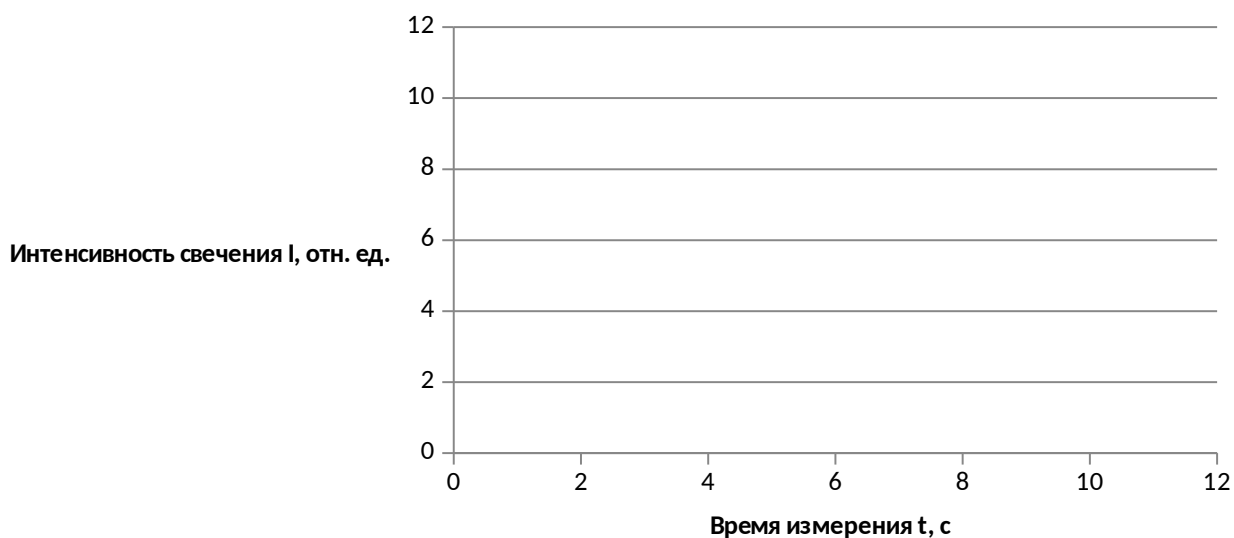


Рисунок 1. Кинетическая кривая биолюминесцентной реакции с образцом ирригационного раствора

Ввиду того, что растворы на основе минерализованных "мокрым" способом экзометаболитов человека представляют наиболее многочисленную группу, был проведен регрессионный анализ концентраций элементов в растворах и остаточного свечения.

3.2. Корреляционный анализ минеральных веществ

Для расчета параметров регрессии построим расчетную таблицу (табл. 5)

Таблица 3. Расчетная таблица для вычисления параметров регрессии

x	y	x ²	y ²	x • y
0.042	41	0.00176	1681	1.722
6.353	51	40.3606	2601	324.003
12.83	47	164.6089	2209	603.01
3.854	17	14.8533	289	65.518
0.11	39	0.0121	1521	4.29
4.628	18	21.4184	324	83.304
0.174	62	0.03028	3844	10.788
27.991	275	241.2853	12469	1092.635

Для наших данных система уравнений имеет вид

$$7a + 27.99 b = 275$$

$$27.99 a + 241.29 b = 1092.64$$

Умножим уравнение системы на (-4), получим систему, которую решим методом алгебраического сложения.

$$-27.99a - 111.96 b = -1100$$

$$27.99 a + 241.29 b = 1092.64$$

Получаем:

$$129.33 b = -7.37$$

Откуда $b = -0.0542$

Теперь найдем коэффициент «а» из уравнения:

$$7a + 27.99 b = 275$$

$$7a + 27.99*(-0.0542) = 275$$

$$7a = 276.52$$

$$a = 39.5025$$

Получаем эмпирические коэффициенты регрессии: $b = -0.0542$, $a = 39.5025$

Уравнение регрессии (эмпирическое уравнение регрессии):

$$y = -0.0542x + 39.5025$$

Эмпирические коэффициенты регрессии a и b являются лишь оценками теоретических коэффициентов β_i , а само уравнение отражает лишь общую тенденцию в поведении рассматриваемых переменных.

3.2.1. Параметры уравнения регрессии

Выборочные средние.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{27.99}{7} = 4$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} = \frac{275}{7} = 39.29$$

$$\overline{xy} = \frac{\sum x_i y_i}{n} = \frac{1092.64}{7} = 156.09$$

Выборочные дисперсии:

$$S^2(x) = \frac{\sum x_i^2}{n} - \bar{x}^2 = \frac{241.29}{7} - 4^2 = 18.48$$

$$S^2(y) = \frac{\sum y_i^2}{n} - \bar{y}^2 = \frac{12469}{7} - 39.29^2 = 237.92$$

Среднеквадратическое отклонение

$$S(x) = \sqrt{S^2(x)} = \sqrt{18.48} = 4.299$$

$$S(y) = \sqrt{S^2(y)} = \sqrt{237.92} = 15.425$$

Коэффициент корреляции b можно находить по формуле, не решая систему непосредственно:

$$b = \frac{\overline{xy} - \bar{x} \cdot \bar{y}}{S^2(x)} = \frac{156.09 - 4 \cdot 39.29}{18.48} = -0.0542$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = 39.29 - (-0.0542) \cdot 4 = 39.5025$$

3.2.2. Коэффициент корреляции

Ковариация.

$$\text{cov}(x,y) = \overline{x \cdot y} - \bar{x} \cdot \bar{y} = 156.09 - 4 \cdot 39.29 = -1$$

Рассчитываем показатель тесноты связи. Таким показателем является выборочный линейный коэффициент корреляции, который рассчитывается по формуле:

Линейный коэффициент корреляции принимает значения от -1 до $+1$.

Связи между признаками могут быть слабыми и сильными (тесными). Их критерии оцениваются по шкале Чеддока:

$0.1 < r_{xy} < 0.3$: слабая;

$0.3 < r_{xy} < 0.5$: умеренная;

$0.5 < r_{xy} < 0.7$: заметная;

$0.7 < r_{xy} < 0.9$: высокая;

$0.9 < r_{xy} < 1$: весьма высокая;

В нашем примере связь между признаком Y и фактором X слабая и обратная. Кроме того, коэффициент линейной парной корреляции может быть определен через коэффициент регрессии b :

$$r_{x,y} = b \frac{S(x)}{S(y)} = -0.0542 \frac{4.299}{15.425} = -0.0151$$

3.2.3. Уравнение регрессии (оценка уравнения регрессии)

Линейное уравнение регрессии имеет вид $y = -0.0542x + 39.502$

Коэффициент регрессии $b = -0.0542$ показывает среднее изменение результативного показателя (в единицах измерения y) с повышением или понижением величины фактора x на единицу его измерения. В данном примере с увеличением на 1 единицу y понижается в среднем на -0.0542 .

Коэффициент $a = 39.502$ формально показывает прогнозируемый уровень y , но только в том случае, если $x=0$ находится близко с выборочными значениями.

Но если $x=0$ находится далеко от выборочных значений x , то буквальная интерпретация может привести к неверным результатам, и даже если линия

регрессии довольно точно описывает значения наблюдаемой выборки, нет гарантий, что также будет при экстраполяции влево или вправо.

Подставив в уравнение регрессии соответствующие значения x , можно определить выровненные (предсказанные) значения результативного показателя $y(x)$ для каждого наблюдения.

Связь между y и x определяет знак коэффициента регрессии b (если > 0 – прямая связь, иначе - обратная). В нашем примере связь обратная.

Изучена зависимость Y от X . На этапе спецификации была выбрана парная линейная регрессия. Оценены её параметры методом наименьших квадратов.

Таким же образом рассматриваем остальные зависимости.

3.3. Характеристика корреляций

Таблица 4. Сравнительная таблица зависимостей, их уравнений регрессии и коэффициентов корреляции

Зависимость	Линейное уравнение регрессии	Коэффициент корреляции	Характеристика
T([Cu])	$y = -118.9989 x + 53.7526$	-0,765	Высокая обратная
T([Zn])	$y = -26.2348 x + 47.9469$	-0,596	Заметная обратная
T([B])	$y = -6.8756 x + 49.4675$	-0,505	Заметная обратная
T([Mo])	$y = -28.8205 x + 43.5306$	-0,247	Слабая обратная
T([Mn])	$y = -6.5226 x + 40.4738$	-0,0759	~
T([Fe])	$y = -0.0542 x + 39.502$	-0,0151	~
T([Ca])	$y = 0.03374 x + 34.2278$	0,243	Слабая прямая
T([P])	$y = 0.2112 x + 30.049$	0,252	Слабая прямая
T([Mg])	$y = 0.2278 x + 32.262$	0,259	Слабая прямая
T([K])	$y = 0.03526 x + 28.9799$	0,371	Умеренная прямая
T([S])	$y = 0.0827 x + 32.4913$	0,38	Умеренная прямая
T([Na])	$y = 0.01966 x + 28.955$	0,391	Умеренная прямая

Проверка методами регрессионного анализа позволила выявить корреляции между остаточным свечением T и концентрациями компонентов раствора.

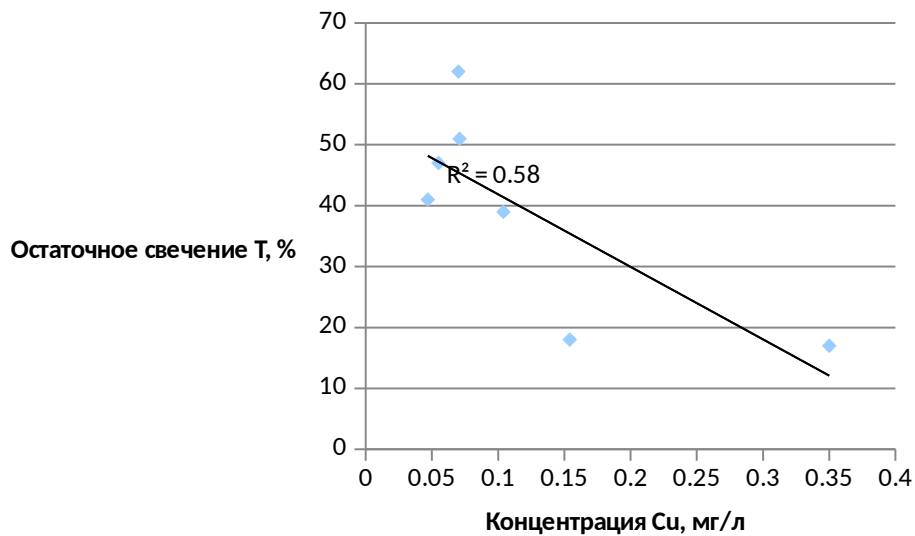


Рисунок 2. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Cu

Присутствует высокая обратная зависимость между остаточным свечением и концентрацией меди. Наблюдаемая зависимость согласуется с данными о том, что катионы без вакантных *d*-орбиталей (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+}) ингибируют свечение.

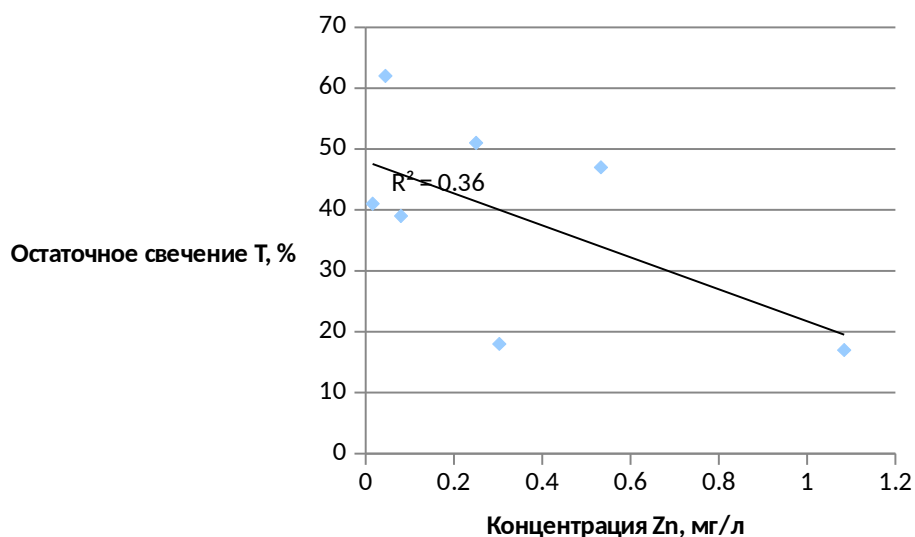


Рисунок 3. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Zn

Присутствует заметная обратная зависимость между остаточным свечением и концентрацией меди. Наблюдаемая зависимость согласуется с данными о том, что катионы без вакантных *d*-орбиталей (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+}) ингибируют свечение.

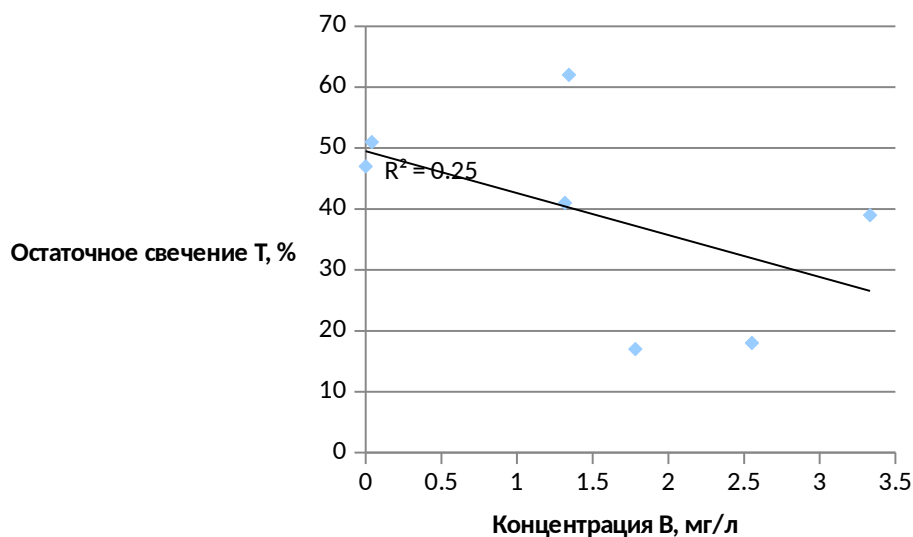


Рисунок 4. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации B

Наблюдается заметная обратная корреляция между остаточным свечением и концентрацией бора.

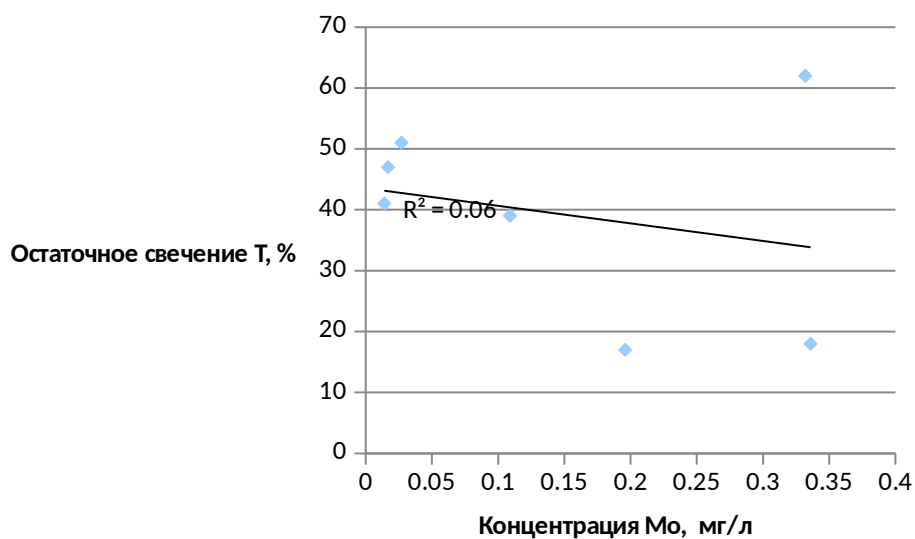


Рисунок 5. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Mo

Наблюдается слабая обратная корреляция между остаточным свечением и концентрацией молибдена.

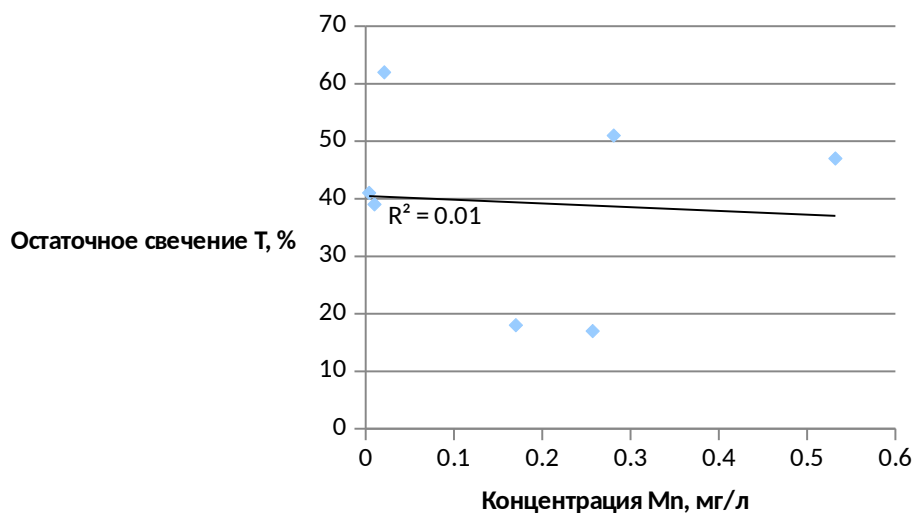


Рисунок 6. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Mn

Значение коэффициента корреляции $<0,1$ и значит не попадает в диапазон шкалы Чеддока, что может трактоваться как отсутствие корреляции.

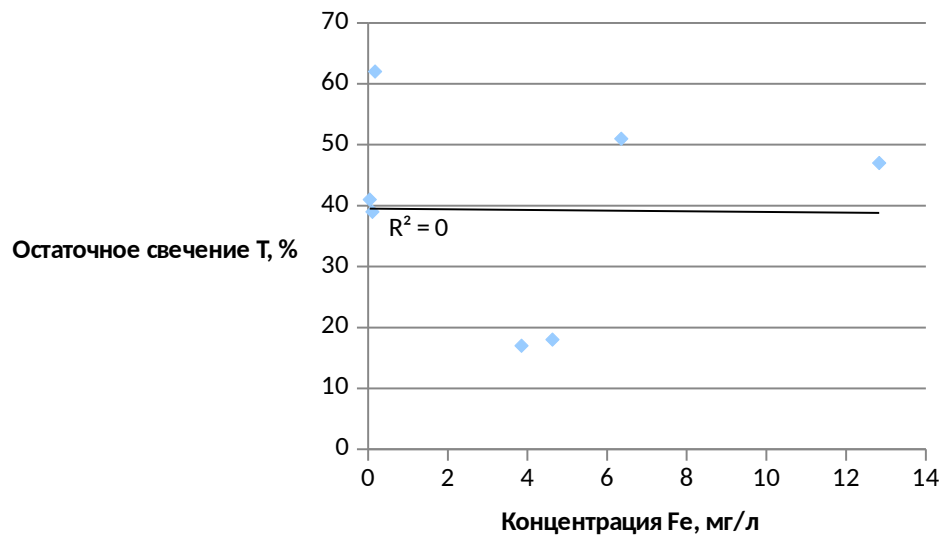


Рисунок 7. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Fe

Значение коэффициента корреляции $<0,1$ и значит не попадает в диапазон шкалы Чеддока, что может трактоваться как отсутствие корреляции.

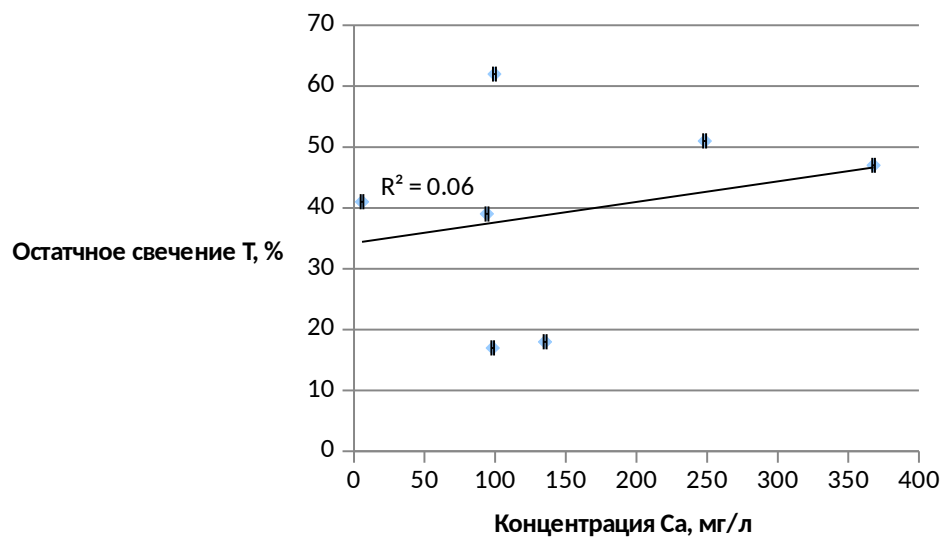


Рисунок 8. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Ca

Наблюдается слабая прямая зависимость остаточного свечения от концентрации Ca. Рост T с увеличением концентрации Ca согласуется фактом, что щелочноземельные металлы активируют биолюминесценцию.

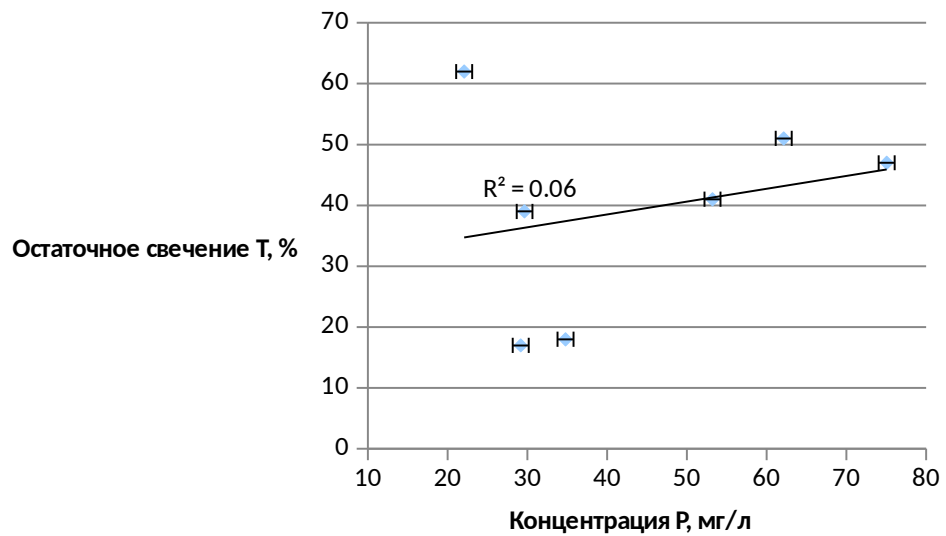


Рисунок 9. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации P

Наблюдается слабая прямая зависимость остаточного свечения от концентрации P.

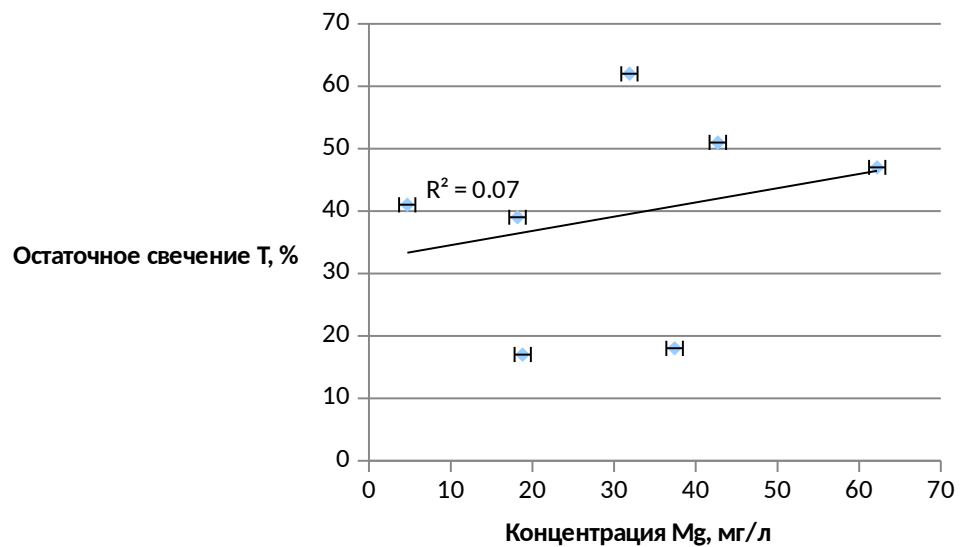


Рисунок 10. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Mg

Наблюдается слабая прямая зависимость остаточного свечения от концентрации Mg. Рост T с увеличением концентрации Mg согласуется фактом, что щелочноземельные металлы активируют биолюминесценцию.

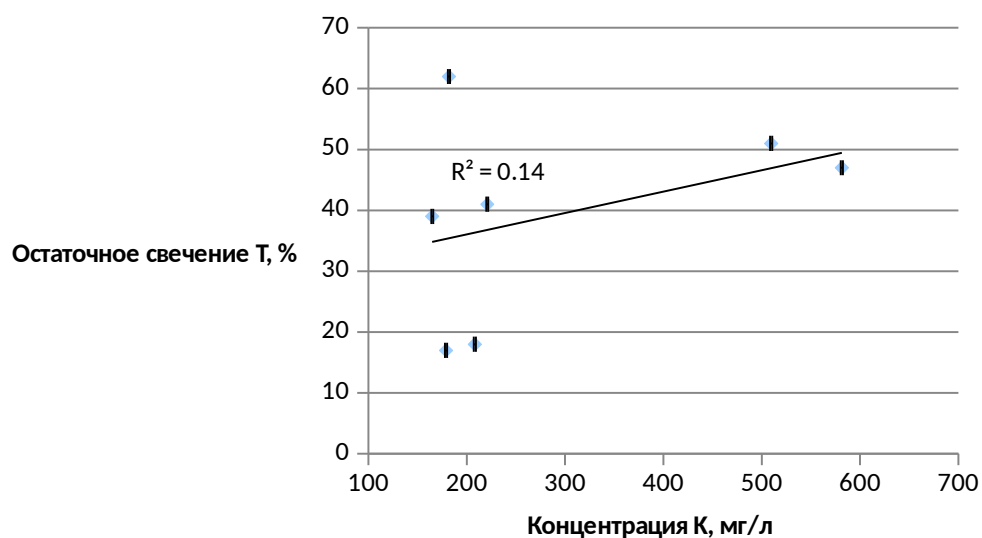


Рисунок 11. Линейное приближение зависимости остаточного свечения Т от концентрации К

Наблюдается умеренная прямая зависимость остаточного свечения от концентрации К. Рост Т с увеличением концентрации К согласуется фактом, что щелочные металлы активируют биолюминесценцию

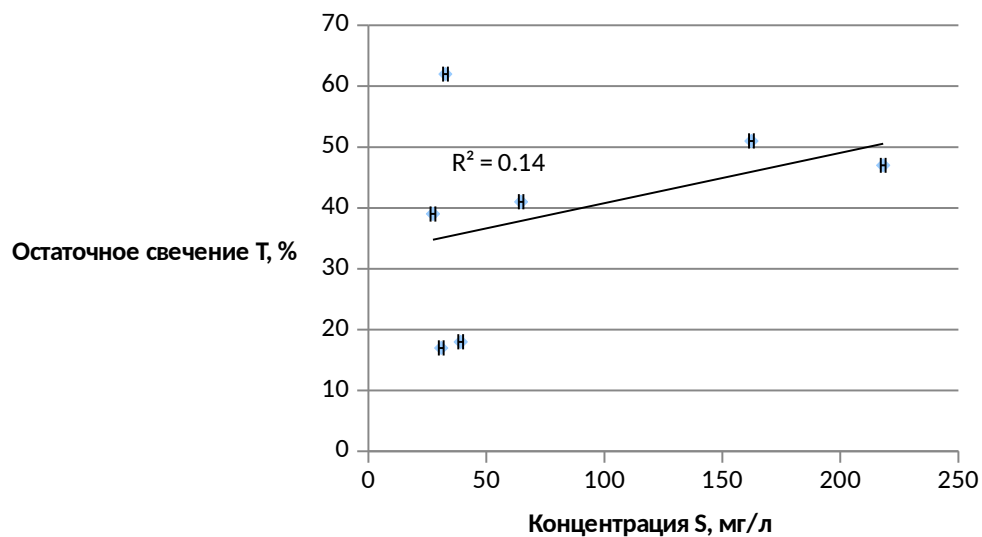


Рисунок 12. Линейное приближение зависимости остаточного свечения Т от концентрации S

Наблюдается умеренная прямая зависимость остаточного свечения от концентрации S.

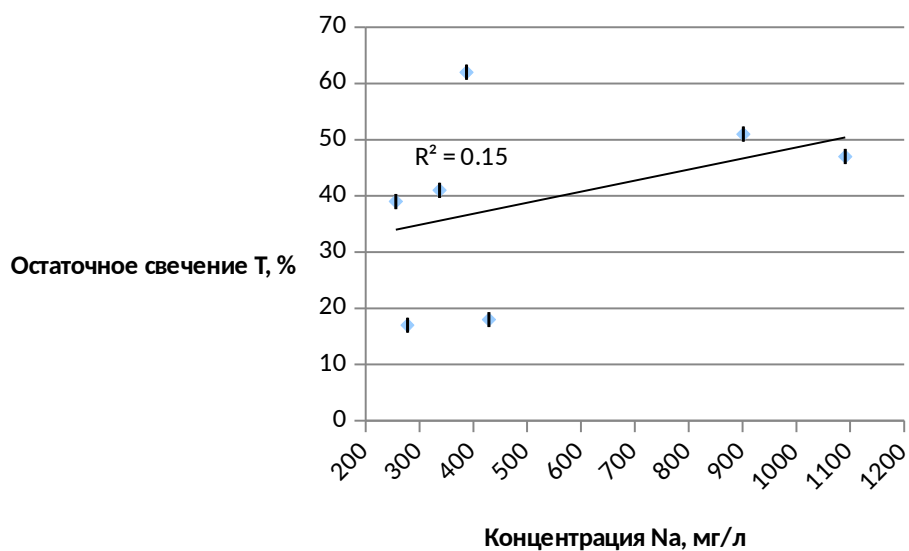


Рисунок 13. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от концентрации Na

Наблюдается умеренная прямая зависимость остаточного свечения от концентрации Na. Рост T с увеличением концентрации Na согласуется фактом, что щелочные металлы активируют биолюминесценцию.

3.4. Корреляционный анализ зависимости остаточного свечения от органических веществ

Регрессионное линейное уравнение: $y = 0.04977x + 19.6207$

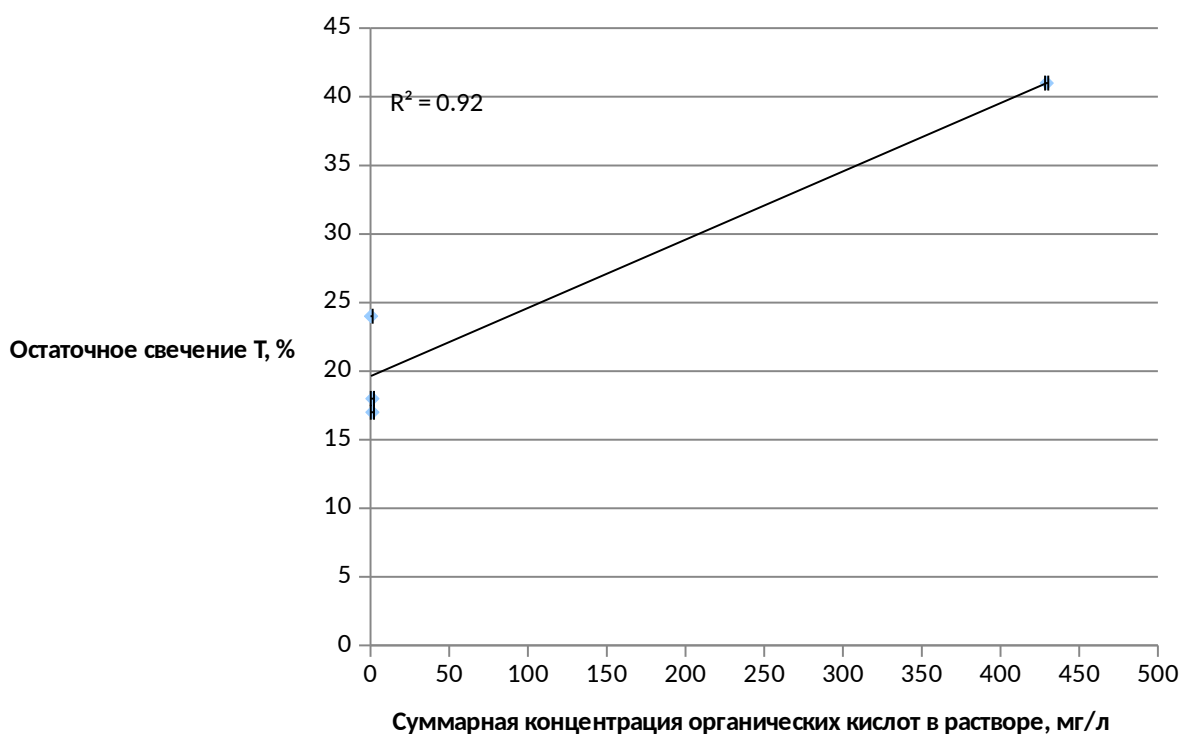


Рисунок 14. Линейное приближение зависимости остаточного свечения T от суммарной концентрации органических кислот в растворе RCOOH

Изучена зависимость T от суммарной концентрации органических кислот в растворе [RCOOH]. Была выбрана парная линейная регрессия. Установлено, что в исследуемой ситуации 92.16% общей вариабельности T объясняется изменением концентрации [RCOOH]).

Увеличение свечения объясняется идущими в свежеприготовленном растворе экзометаболитов цепными реакциями рекомбинации гидропероксидных радикалов ROO, ведущими к образованию тетраоксидов ROOOOR, который, распадаясь, образуют хемилюминесцирующие возбужденные карбонильные соединения, а также органические кислоты.

Выводы

1. При оценке свечения с различными типами ирригационных растворов не удалось обнаружить зависимости между свечением и состоянием ценозов растений.
2. Корреляционный анализ зависимости остаточного свечения от минерального состава растворов, показал, что тенденции к ингибированию (активированию) биолюминесценции в зависимости от концентрации вещества ингибитора (активатора) сохраняются.
3. Остаточное свечение увеличивается при увеличении концентрации органических кислот, что согласуется с теорией увеличения светимости в присутствии активных органических радикалов, наличие которых в минерализованных растворах подтверждается образованием данных кислот.

Заключение

Биолюминесцентный анализ не позволяет определить является ли раствор токсичным для растений, однако была установлена зависимость между наличием органических кислот и остаточным свечением, которые являются косвенным свидетельством наличия в растворах органических радикалов. Полученные коэффициенты корреляции говорят о том, что эффект ингибирования или активации также зависит от положения металла в таблице Менделеева, даже в случае, если исследуемое вещество содержит в себе большое количество различных по составу и активности компонентов. Поэтому возможно при дальнейшей доработке методики обработки растворов и детальном изучении взаимодействия компонентов будет доработать методику.

Список сокращений

БТСЖО — биолого-техническая система жизнеобеспечения

ИБФ СО РАН — Институт Биофизики Сибирского Отделения Российской Академии Наук

МКС — Международная Космическая Станция

НЭК — Наземный Экспериментальный Комплекс

ПДК — предельно допустимая концентрация

СЖО — система жизнеобеспечения

ППС — почвоподобный субстрат

CEEF — Closed Ecology Experiment Facilities

FMN — англ. flavin mononucleotide, рус. флавинмононуклеотид

NADH — англ. nicotinamide adenine dinucleotide; рус. никотинамидадениндинуклеотид

Список использованных источников

1. Samsonov N.M., Bobe L.S., V.M. Novikov et al. Water recovery from condensate of crew respiration products aboard the space station//Proc. 4th European Symp. on Space Environmental Control Systems. October 1991. Florence, Italy. ESA SP-324. V. 2. P. 625-628.
2. Абрамов И.П., Романов С.Ю., Самсонов Н.М. и др. Системы жизнеобеспечения орбитальной станции "Мир" и Международной космической станции//Изв. РАН. Энергетика. 2003. № 3. С. 33-52.
3. [Bagdigian R.](#), [Carter L.](#), [Redhard J.](#) et al. Status of the regenerative ECLSS water recovery system//Proc. 37th ICES. Chicago, USA. July 12-15, 2007. SAE Technical Paper Series. № 2007-01-3100. 12p.
4. Самсонов Н. М. и др. Регенерационные системы жизнеобеспечения экипажей космических станций //Известия Российской академии наук. Энергетика. – 2009. – №. 1. – С. 61-68.
5. Life into Space. Space life Sciences Experiments. Ames Research Center. Kennedy Research Center. 1991 – 1998. / edited by Souza K., Etheridge G., Callahan P.X. – NASA Ames Research Center, 2000. – 556 p
6. MELISSA. Yearly Report for 2004 Activity. Memorandum of Understanding TOS-MCT/2002/3161/In/CL. / edited by Vieira da Silva L., Lasseur Ch. – ESA, 2004. 245 p.
7. Ling T. Gas exchange between humans and autotrophic organisms in bioregenerative life support system / T. Ling, L. Hong, L. Ming, H. Enzhu, H. Wenting // 17th IAA Humans in Space Symposium. – Moskow, 2009. – P. 136.
8. Kurmazenko E.A. Crew's life support aboard the long-term planetary orbital station and interplanetary vehicles / E.A. Kurmazenko, M.Yu. Tomashpolskiy, K.A. Kochetkov, L.I. Gavrilov, N.N. Khabarovskiy // 17th IAA Humans in Space Symposium. – Moskow, 2009. – P. 74

9. Малоземов В.В. Системы жизнеобеспечения экипажей летательных аппаратов / В.В. Малоземов – М.: Машиностроение, 1986. – 523 с.
10. Трифонов С. В. Минерализация органических отходов в среде перекиси водорода для повышения замкнутости биолого-технических систем жизнеобеспечения. – 2012.
11. Замкнутая система: человек - высшие растения / под ред. Лисовского Г.М. – Новосибирск: Наука, 1979. – 160 с
12. Tikhomirov A. Research in the Bios-3 Closed Controlled Experiment Facility of the Institute of Biophysics of the Siberian Branch of Russian Academy of Science / A. Tikhomirov, A. Degermendzhi, S. Ushakova, [et al.] // Application of a Closed Experimental System to Modeling of ^{14}C Transfer in the Environment, 2007. P. 155 – 162.
13. Gitelson I.I. Volatile metabolites of higher plants crops as a photosynthesizing life support systems component under temperature stress at different light intensities / I.I. Gitelson, A.A. Tikhomirov, O.V. Parshina, S.A. Ushakova, G.S. Kalacheva // Adv. Space Res., V. 31, No 7, 2003. P. 1781 – 1786.
14. Тихомиров А.А. Влияние светового режима на продуктивность и качество урожая редиса / А.А. Тихомиров, И.Г. Золотухин, Ф.Я. Сидько // Физиология растений, 23 (3), 1976. С. 502 – 505.
15. Gitelson J.I. Manmade Closed Ecological Systems / J.I. Gitelson, G.M. Lisovsky, R. MacElroy – Taylor & Francis Inc., 2003. – 400 p.
16. Poynter J. The human experiment: Two years and twenty minutes inside Biosphere 2. – Basic Books, 2006.
17. Berkovich Y.A. et al. Vegetable production facility as a part of a closed life support system in a Russian Martian space flight scenario // Advances in Space Research. – 2009. – Т. 44. - № 2. – С. 170-176
18. Tikhomirov A. Research in the Bios-3 Closed Controlled Experiment Facility of the Institute of Biophysics of the Siberian Branch of Russian

- Academy of Science / A. Tikhomirov, A. Degermendzhi, S. Ushakova, [et al.] // Application of a Closed Experimental System to Modeling of ^{14}C Transfer in the Environment, 2007. P. 155 – 162.
19. Tikhomirova N.A. Influence of high concentrations of mineral salts on production process and NaCl accumulation by *Salicornia europaea* plants as a constituent of the LSS phototroph link / N.A. Tikhomirova, S.A. Ushakova, N.P. Kovaleva, [et al.] // Adv. Space Res., vol. 35, № 9, 2005. P. 1589 – 1593.
20. Tsuga S. Research and development of the waste processing system in the closed ecology experiment facilities / S. Tsuga, Y. Tako, M. Endo, K. Nishidate, S. Fukuda // Application of a Closed Experimental System Modeling of ^{14}C Transfer in the Environment, 2007. P. 119 – 126.
21. Тихомиров А.А. Светокультура растений / А.А. Тихомиров, В.П. Шарупич, Г.М. Лисовский – Новосибирск: СО РАН, 2000. – 202 с
22. Xu C.X. Crop candidates for the bioregenerative life support systems in China / C.X. Xu, H. Liu // Acta Astronautica, vol. 7, №. 10, 2008. P. 1076 – 1080.
23. Кузнецов В.В. Физиология растений / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева – М.: Высш. шк., 2006. – 742 с.
24. Удалова О. Р., Судаков В. Технологические основы культивирования растений томата в условиях регулируемой агроэкологической системы Л. Государственное Научное Учреждение Агрофизический Научно-Исследовательский Институт Российской академии сельскохозяйственных наук.
25. Тихомиров А. А. и др. Оценка почвоподобного субстрата как источника минеральных элементов для выращивания растений применительно к системам жизнеобеспечения // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2010. – №. 9.

26. Kudenko Yu.A., Gribovskaya I.A., Zolotukhin I.G. Physical-Chemical treatment of wastes: a way to close turnover of elements in LSS // *Acta Astronautica*. – 2000. Vol. 46. – №. 9. – P. 585–589
27. Lasseur Increased BLSS closure using mineralized human waste in plant cultivation on a neutral substrate / S. Ushakova [et. al]// *Adv. Space Res.* – 2009. – Vol. 44. – P. 971–978.
28. Куденко Ю.А. Оптимизация процесса физико-химического окисления экзометаболитов для использования в ЗСЖО / Ю.А. Куденко, А.А. Тихомиров, С.В. Трифонов // *Материалы научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых-физиков «НКСФ - XXXVIII (2009)»*. – Красноярск, Сибирский федеральный университет, 2009. – С. 178 – 182.
29. Tikhomirov A. Assessing the feasibility of involving gaseous products resulting from physicochemical oxidation of human liquid and solid wastes in the cycling of a bio-technical life support system / A. Tikhomirov, Yu. Kudenko, S. Trifonov, S. Ushakova // *Advances in Space Research*, V. 49, 2012. P. 249 – 253
30. Волошин М. В. и др. Минеральные добавки и гидропонная технология в производстве сока из ростков пшеницы // *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология*. – 2015. – №. 2.
31. Журавлёва В. Ф., Цапков М. М. Токсичность нитратов и нитритов // *Гигиена и санитария*. – 1983. – №. 1-С. – С. 60-69.
32. Мелехова О. П. и др. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование // *М.: Академия*. – 2010.
33. Тулинов А. Г., Шлык М. Ю., Лобанов А. Ю. Исследование состава питательных растворов на продуктивность гидропонного зеленого корма // *Символ науки*. – 2016. – №. 3-4.

34. Будников Г. К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – Т. 4. – №. 5. – С. 23-29.
35. Чернобровкина Н. П. и др. Влияние обеспеченности бором на рост и накопление элементов минерального питания у березы повислой // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. – 2011. – №. 1.
36. Евгеньев М. И. Тест-методы и экология // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №. 11. – С. 29-34.
37. Биоиндикация загрязнителей наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. М.: Мир, 1988. 350 с.
38. Золотов Ю.А. Тест-методы // Журн. аналит. химии. 1994. Т. 49, № 2. С. 149.
39. Кудряшева Н. С., Кратасюк В. А., Есимбекова Е. Н. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа. – 2002.
40. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии // М.: Бином. Лаборатория знаний. – 2003. – Т. 493.
41. Заикин В. Г., Варламов А. В., Микая А. И. Основы масс-спектрометрии органических соединений. – М. : МАИК" Наука/Интерпериодика", 2001.
42. Adams J., Gross M. L. Charge-remote fragmentations of closed-shell ions. A thermolytic analogy // Journal of the American Chemical Society. – 1989. – Т. 111. – №. 2. – С. 435-440.
43. Zhurkovich I. K., Mil'man B. L. General characterization of analytical methods: Example of mass spectrometry and chromatography-mass spectrometry // Journal of Analytical Chemistry. – 2009. – Т. 64. – №. 10. – С. 986-994.
44. Дрейпер Н. Р. Прикладной регрессионный анализ. – Рипол Классик, 1973.
45. Себер Д. Линейный регрессионный анализ. – 1980.

46. Есимбекова, Е.Н. БиOLUMиНесцентный экспресс метод определения интегральной токсичности воды и загрязнения воздуха / Е.Н. Есимбекова, Н.В. Римацкая, И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк — 2013.
47. Сидоренко О. Д., Черданцев Е. В. Биологические технологии утилизации отходов животноводства. – М. : Изд-во МСХА, 2001.
48. MELISSA. Final Report for 1995 Activity. Memorandum of Understanding ECT/FG/CB/95.205. / edited by Lasseur Ch. – ESA, 1996. 88 p.
49. Lasseur Ch. Overview of Life Support Activities in ESA / Ch. Lasseur, G. Tan // Closed Habitation Experiments and Material Circulation Technology, 2004. – P. 149 – 163.
50. Manukovsky N.S. Modeling Conversion of Organic Matter for Resource Recovery in a Bioregenerative Life Support System. / N.S. Manukovsky, V.S. Kovalev // 17th IAA Humans in Space Symposium, 2009. P. 83.
51. Polonsky V.I. Utilization of NaCl in Bioregenerative Life Support System / V.I. Polonsky, I.I. Gribovskaya // 17th IAA Humans in Space Symposium, 2009. P. 101 – 102.
52. Polonsky V.I. Net production of wheat crop under high PAR irradiance with artificial light / V.I. Polonsky, G.M. Lisovsky // Photosynthetica, vol. 14, № 2, 1980. P. 177 – 181.
53. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР. 1.39.2007.03222. – М.: Акварос, 2007. 41с.
54. Методика выполнения измерений. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. ФР. 1.39.2007.03221. М.: «АКВАРОС»; 2007
55. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции

- хлорофилла и численности клеток водорослей. ФР.1.39.2007.03223 / Н.С. Жмур, Т.Л. Орлова. — М.: Акварос, 2007.
56. ПНД Ф. Т. 14.1: 2: 3: 4.2-98 Методика определения токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий // Москва. — 1998. ПНД Ф. Т. 14.1: 2: 4.12-06 (ПНД Ф Т 16.1: 2: 3: 3.9-06) Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus // Красноярский государственный университет. — 2006.
57. Эммануэль Н.М. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе / Н.М. Эммануэль, Е.Т. Денисов, З.К. Майзус — М.: Наука, 1965. — 376 с.

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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Кратасюк В.А.
«20» июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**Применимость биолюминесцентного экспрессного теста для
исследования ирригационных растворов**

03.03.02

Руководитель



к.б.н. Трифонов С.В.

Выпускник ФБ13-01 №041312959



Банних И.Е.

Красноярск 2017