

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

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ В. А. Кратасюк  
подпись  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Диагностическая значимость биферментной биолюминесцентной системы в  
выявлении загрязнения почвы

03.04.02 Физика  
03.04.02.01 Биофизика

Научный руководитель	_____	профессор, д.с.-х.н.	А. А. Шпедт
	подпись, дата		
Выпускник	_____		В. С. Матвиенко
	подпись, дата		
Рецензент	_____	профессор, д.б.н.	О. А. Сорокина
	подпись, дата		

## Реферат

Магистерская диссертация по теме: «Диагностическая значимость биферментной биолюминесцентной системы в выявлении загрязнения почвы» содержит 37 страниц текстового материала, 7 иллюстраций, 7 таблиц, 2 формулы, 2 приложения, 111 использованных источников,

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ, ПОЧВА, ТОКСИЧНОСТЬ.**

Загрязнение окружающей среды, в частности почвы с каждым днем становится всё актуальнее. Россия является одним из крупнейших в мире производителей меди, а это значит, что огромные площади подвержены загрязнению отходами медной промышленности. Для индикации состояния почвы и уровня загрязнений используются как химические, так и биологические методы. Но только биологические методы позволяют оценить воздействие поллютантов на живой организм. Почва является сложной полиморфной системой, которую сложно оценивать и диагностировать. Для повышения точности оценки загрязнения методами биотестирования используют несколько тест-систем разных трофических уровней. Существующие методы биотестирования охватывают все трофические уровни, но представлены только организменным уровнем организации живого. Данная тест-система представляет молекулярный (ферментный) уровень организации живого.

Цель работы - определение чувствительности люциферазной биолюминесцентной тест-системы R+L к загрязнению почвы подвижной медью.

В работе показано влияние состава почвы на примере четырех почвообразующих пород разного гранулометрического состава (связный песок, супесь, легкий суглинок, тяжелый суглинок) и одной почвы (чернозем) на интенсивность биолюминесценции тест-системы. Установлены концентрации хлорида меди, ингибирующие биолюминесценцию тест-системы на 20, 50, 80%. Описано влияние водных экстрактов разных типов почв на ингибирование биолюминесценции биферментной тест-системы раствором хлорида меди. В образцах почв, загрязненных медью показано влияние состава почвы на её ингибирующее воздействие.

Введение.....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Загрязнения почвы и методы оценки .....	6
1.1.1 Загрязнение почвы медью .....	7
1.1.2 Химические методы оценки загрязнения .....	9
1.2 Биологические методы оценки загрязнения почвы .....	12
1.2.1 Биоиндикация.....	13
1.2.2 Биотестирование.....	15
1.2.3 Биолюминесцентный метод оценки загрязнения почвы.....	19
1.2.4 Ферментативный биолюминесцентный биотест .....	21
2 Материалы и методы исследования .....	25
3 Результаты и обсуждение.....	29
3.1 Влияние состава почвы на интенсивность свечения биферментной биолюминесцентной тест-системы .....	29
3.2 Чувствительность биферментной биолюминесцентной тест-системы к хлориду меди .....	31
3.3 Сравнение результатов биолюминесцентного биотеста модельных почв с загрязненными образцами .....	33
Заключение .....	36
Список сокращений .....	37
Литература .....	38
Приложение .....	52

## Введение

В современном обществе остро стоит проблема загрязнения окружающей среды. Одним из основных источников загрязнения являются выбросы промышленных предприятий, загрязняющих экосистему вредными, а зачастую и ядовитыми веществами. Токсиканты загрязняют воздух, почву, водные объекты, растительность, и, как следствие, отрицательно влияют на здоровье животных и человека.

По данным Всемирной организации здравоохранения металлургические предприятия ежегодно выбрасывают на поверхность земли более 150 тыс. тонн меди. На 1 грамм черновой меди отходы медеплавильной промышленности содержат 2,09 тонн пыли, в составе которой содержится до 15% меди, 60% окиси железа и по 4% мышьяка, ртути, цинка и свинца [66].

Существуют различные сертифицированные методики оценки токсичности природных сред, таких как вода, воздух, и почва. В основе всех биотестов лежит реакция тест-организма на токсичные вещества, содержащиеся в этих средах. Почва является сложной полиморфной системой – действия одних веществ может нивелировать действие других. Поэтому для повышения точности оценки используют несколько тест-систем, которые могут принадлежать к разным трофическим уровням (продуценты, консументы разных порядков и редуценты).

В данной работе оценка производится по еще одному уровню – молекулярному (ферментному), где в качестве тест-системы используется бактериальная биолюминесцентная биферментная система R+L (NADH: FMN оксидоредуктаза (R) – люцифераза (L)). Эта система является удобным инструментом для анализа, так как токсическое действие, оказываемое загрязнителями в почве на ферменты, выражается в виде изменения интенсивности свечения данной системы.

Цель: определить количественные характеристики чувствительности люциферазной биолюминесцентной тест-системы R+L к загрязнению почвы подвижной медью.

Задачи:

- 1) выявить влияние состава почвы на интенсивность биолюминесценции биферментной тест-системы;
- 2) установить влияние водного раствора хлорида меди на биолюминесценцию биферментной тест-системы.
- 3) выяснить влияние водных экстрактов из почв разного гранулометрического состава на ингибирование раствором хлорида меди биолюминесценции биферментной тест-системы.
- 4) измерить влияние загрязненной медью почвы на биолюминесценцию биферментной тест-системы.

# 1 Обзор литературы

## 1.1 Загрязнения почвы и методы оценки

Почвенный покров является своеобразным фильтром промышленных и коммунальных выбросов и отходов. Почва принимает в себя тяжелые металлы, пестициды и другие химические загрязняющие вещества, тем самым уменьшая их поступление в природные воды и, соответственно, их токсическое воздействие. Попадая в почвы многие токсичные химические вещества изменяются, чаще всего они связываются с минеральными и органическими веществами почвы в нерастворимые или просто нетоксичные соединения.

Почвы, обладающие тяжелым гранулометрическим составом, высоким содержанием гумуса, а также обогащенные карбонатами лучше всего справляются с утилизацией химических загрязняющих веществ. Прежде всего, к таким почвам относятся наиболее плодородные черноземы. Благодаря этим свойствам почва обладает хорошей гибкостью к техногенному воздействию.

Сильнее всего техногенное давление влияет на почвы, расположенные вблизи крупных промышленных предприятий, больших городов, транспортных артерий. Не редко в ближайшей к предприятию зоне содержание тяжелых металлов часто значительно превышает предельно допустимые концентрации. Например, в радиусе 5 км вокруг Рудной Пристани (Приморский край) наблюдается загрязнение почв: свинцом - 300 ПДК, марганцем - 2 ПДК и др [46]. Вследствие суммарного воздействия кислотных дождей и выпадений тяжелых металлов гибнет растительность, поверхность почвы обнажается. Не защищенная растительным покровом почва подвергается усиленной эрозии и дефляции, почвенный покров разрушается практически необратимо [77].

Выделяют химический и биологический методы оценки загрязнения почвы. Химический, в свою очередь разделяется на методику определения предельно допустимой концентрации (ПДК) и методику определения

ориентировочно допустимой концентрации (ОДК), а биологический разделяется на биоиндикацию и биотестирование.

### 1.1.1 Загрязнение почвы медью

Медь химический элемент I группы периодической системы Д.И. Менделеева, порядковый номер – 29, атомная масса – 63,546. Входит в состав около 200 минералов. ПДК меди в почве 3 мг/кг. Большая часть высвобожденной из почвообразующих минералов мигрирует с глинистыми частицами, которые хорошо её адсорбируют. Наиболее сильно мигрирует в сернокислых водах зоны окисления сульфидных руд, где образуется легкорастворимый сульфат меди [79].

При взаимодействии с гумусовыми веществами почвы медь образует низкомолекулярные соединения, например, при  $pH = 6$  взаимодействие ионов меди с фульвокислотами формирует соединение хелатного типа, подвижные и растворимые в кислой среде. Гуматы меди, образующиеся при  $pH$  менее 3,5 относятся к малоподвижным, накапливающимся в кислой среде в почвах. Факторами, увеличивающими подвижность почвенной меди, являются:

- 1) подкисление,
- 2) внесение физиологически кислых азотных и калийных минеральных удобрений,
- 3) минерализация органического вещества микроорганизмами,
- 4) накопление в почве нитратов и аммиака.

К факторам, уменьшающим подвижность меди и поступление её в растения относят известкование почв и связывание меди в форме комплексных органических соединений в почве [79].

Подвижность и доступность растениям меди находится в тесной связи и с окислительно-восстановительным состоянием почвы. Усиление восстановительных процессов в почве сопровождается снижением подвижности меди. Одной из причин снижения подвижности элемента

считается образование нерастворимых соединений – карбонатов, сульфидов и фосфитов. Повышению подвижности меди способствует усиление аммонификации и нитрификации в почве [79].

В основном, медь поступает в экосистему с выбросами металлургических предприятий, минеральными и органическими удобрениями (особенно медьсодержащими), пестицидами, транспортом, осадками сточных вод. За год в окружающую среду из техногенных источников поступает с отходами 77 тыс. т., с удобрениями 94 тыс. т меди. В результате работы химических предприятий на поверхность Земли ежегодно поступает около 155 тыс. т. [23].

В разных месторождениях каменный уголь может содержать в себе от 15 до 340 мг/кг соединений меди. Приблизительно 2100 т соединений меди поступают в атмосферу каждый год только от сжигания угля и нефти. В радиусе нескольких километров от горно-металлургического комбината, концентрация соединений меди в воздухе может достигать 1,3 мг/м<sup>3</sup>, тогда как в атмосфере города данное значение равно 0,09 мг/ м<sup>3</sup> [1].

В сельском хозяйстве соединения меди применяются в виде оксида и сульфата меди, из всех минеральных удобрений большее количество меди содержится в простом суперфосфате.

Накапливаясь в почве в избыточных количествах, медь изменяет многие ее свойства. Прежде всего, изменения влияют на биологические свойства почвы: уменьшается количество микроорганизмов и их видовой состав, изменяется структура микробоценозов, снижается интенсивность основных микробиологических процессов и активность почвенных ферментов. Сильное загрязнение медью приводит к изменению и более консервативных признаков почвы, таких как гумусное состояние, структура реакции среды и др. Результатом всего этого является частичная, а в некоторых случаях и полная потеря плодородия почв.

В малых количествах в организмах растений и животных медь выступает в роли микроэлемента и содержится во множестве ферментов и белков, но в избыточных количествах медь становится токсикантом [76].



Растения чувствительны к высоким концентрациям меди в почвенном растворе, если меди более 2 мг/л, то у растений развивается хлороз, приостанавливается рост корней, тормозится усвоение фосфора и биосинтез его органических соединений, нарушаются механизмы поглощения биофильных элементов и т.д.

В организме животного медь в избыточных количествах имеет широкий спектр токсических эффектов с различными клиническими проявлениями. Токсическое действие меди в большей степени основано на способности ее ионов блокировать сульфгидрильные группы (группы SH) белков, в особенности ферментов. Кроме того, способность меди и ее соединений повышать проницаемость митохондриальных мембран обуславливает её высокую гепатотоксичность. Угнетение некоторых ферментативных процессов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку эритроцитов, а также нарушение проницаемости их мембран при острой интоксикации медью вызывают выраженный гемолиз эритроцитов [76].

### **1.1.2 Химические методы оценки загрязнения**

В настоящее время, методика определения ПДК является основным показателем санитарно-гигиенической оценки загрязненности почвы вредными веществами. Она направлена на выявление опасности загрязнения почвы. Уровень химических веществ не должен превышать экспериментально подобранных нормативов.

Методика определения ОДК показывает уровень загрязнения почвы. Методология основана на стандартах, рассчитанных для оценки безопасности продуктов питания. Такой подход связан с тем, что вредные вещества из почвы, как правило, проникают в растения, а в дальнейшем могут попадать в организм человека.

Оценка загрязнения почвы осуществляется в зонах экологической катастрофы, а также на сельскохозяйственных землях, прилегающих к

источникам загрязнения почв, и на полях (участках), предназначенных для выращивания экологически чистых продуктов. В образцах почвы определяют подвижные формы тяжелых металлов и их валовое содержание. Перечень показателей химического загрязнения почв сельскохозяйственных угодий тяжелыми металлами, пестицидами и другими химическими веществами и методы их определения приведены в таблице 1. Методики проведения анализов изложены в специальной нормативно-методической документации (ГОСТ, ОСТ и др.).

Данные методы оценки обладают исключительной избирательностью и точностью, но недостатками можно считать длительность измерения, невозможность определить все вещества (в настоящее время определено более 2 миллионов токсических веществ), и, самое важное, они не учитывают биологический эффект. В почвах некоторые химические соединения связываются с гуминовыми и фульвокислотами, и, благодаря этому, теряют свой токсический эффект [4].

Таблица 1 – Перечень основных показателей химического загрязнения почв [37]

Показатель	Методы определения
1 -го класса по ГОСТ 17.4.1.02	
Мышьяк	МУ по определению мышьяка в почвах фотометрическим методом, 1993
Кадмий:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90 [68]
водорастворимая форма	РД 52.18.286-91 [69]
кислоторастворимая форма	РД 52.18.191-89 [70]
Ртуть	МУ ЦИНАО, 2000
Селен	Отсутствуют
Свинец:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90 [68]
водорастворимая форма	РД 52.18.286-91 [69]
кислоторастворимая форма	РД 52.18.191-89 [70]
валовая форма	ОСТ 10 259-2000 [44]
Цинк:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90, ГОСТ Р 50686-94 [68, 18]
водорастворимая форма	РД 52.18.286-91 [69]

кислоторастворимая форма	РД 52.18.191-89 [70]
валовая форма	ОСТ 10 259-2000 [44]
Фтор, подвижная форма	МУ Минсельхоз России, 1993
Бенз(а)пирен	Отсутствуют
2-го класса опасности по ГОСТ 17.4.1.02	
Бор, подвижная форма	ГОСТ Р 50688-94 [18]
Кобальт:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90, ГОСТ Р 50687-94 [68, 18]
водорастворимая форма	ГОСТ Р 50683-94, РД 52.18.286-91 [18, 69]
кислоторастворимая форма	РД 52.18.191-89 [70]
валовая форма	ОСТ 10 259-2000 [44]
Никель:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90 [68]
водорастворимая форма	РД 52.18.286-91 [69]
кислоторастворимая форма	РД 52.18.191-89 [70]
валовая форма	ОСТ 10 259-2000 [44]
Молибден, подвижная форма	ГОСТ Р 50689-94 [18]
Медь:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90, ГОСТ Р 50684 94 [68, 18]
водорастворимая форма	ГОСТ Р 50683-94 [18]
кислоторастворимая форма	РД 52.18.286-91 [69]
валовая форма	РД 52.18.191-89, ОСТ 10 259-2000 [70, 44]
Сурьма	Метод атомно-эмиссионной спектроскопии №8.023-96 [38]
Хром:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90 [68]
водорастворимая форма	РД 52.18.286-91 [69]
кислоторастворимая форма	РД 52.18.191-89 [70]
валовая форма	ОСТ 10 259-2000 [44]
3-го класса опасности по ГОСТ 17.4.1.02	
Барий	Метод атомно-эмиссионной спектроскопии №8.023-96 [38]
Ванадий	Метод атомно-эмиссионной спектроскопии №8.023-96 [38]
Вольфрам	Метод атомно-эмиссионной спектроскопии №8.023-96 [38]
Марганец:	
подвижная форма	РД 52.18.289-90, ГОСТ Р 50682-94 [68, 18]
водорастворимая форма	РД 52.18.286-91, ГОСТ Р 50685-94 [69, 18]
кислоторастворимая форма	РД 52.18.191-89 [70]
валовая форма	ОСТ 10 259-2000 [44]
Стронций, валовая форма	ОСТ 10 259-2000 [44]
Ацетофенон	Отсутствуют
Нефть и нефтепродукты	РД 39-0147098-015-90 [27]
Сумма изомеров полихлорбифенолов	РД 52.18.578-97 [40]
Загрязнение почв пестицидами	
Пестициды по видам	СанПиН 42-128-4275-87, ГН 1.1. 546-96, РД 52.18.156-99 [72, 70]
Суммарный показатель загрязнения	Рекомендации. Росагропромиздат, 1990

Степень загрязнения почв определяется по сравнению с предельно допустимой концентрацией или ориентировочно допустимой концентрацией соответствующего элемента в почве с его фоновым содержанием. Концентрация тяжелых металлов в почвах, установленные в ПДК и ОДК, показана в таблице 2.

Таблица 2 – ПДК и ОДК тяжелых металлов в почвах, мг/кг [41]

Металл	ПДК (ОДК)	Форма элемента
Мышьяк	2,0	Валовое содержание
Ртуть	2,1	Валовое содержание
Свинец	32,0	Валовое содержание
Свинец + ртуть	20,1 + 1,0	Валовое содержание
Хром (VI)	0,05	Валовое содержание
Марганец	1500	Валовое содержание
Ванадий	150	Валовое содержание
Марганец + ванадий	1000+100	Валовое содержание
Сурьма	4,5	Валовое содержание
Медь	3,0	Подвижные соединения
Никель	4,0	Подвижные соединения
Цинк	23,0	Подвижные соединения
Кобальт	5,0	Подвижные соединения
Хром	6,0	Подвижные соединения

## 1.2 Биологические методы оценки загрязнения почвы

Биологические методы, как правило, обладают высокой чувствительностью, улавливают более низкие концентрации веществ, чем аналитические датчики. Информативность этих методов оценки последствий вредного воздействия на окружающую природную среду превосходят физико-химические методы анализа [1]. Вследствие сложности в выявлении степени загрязнения сложных по составу анализируемых сред, содержащие десятки загрязняющих веществ, для контроля загрязнения используют биологические системы разного уровня сложности (от экосистемы до отдельного организма). Контроль состояния почвы при помощи живых организмов относят к биологическому мониторингу почв. Определение токсичности среды

непосредственно при действии ее на живой организм осуществляется методами биоиндикации и биотестирования.

### 1.2.1 Биоиндикация

Основным методом биологического почвенного мониторинга считается биоиндикация. Благодаря тесной корреляции жизненных функций организмов или сообществ с определенными факторами среды есть возможность применять их для оценки, такие организмы или сообщества организмов называются биоиндикаторами.

Биоиндикация может осуществляться на различных уровнях организации живого (макромолекула, клетка, орган, организм, популяция, биоценоз). А сами биоиндикаторы могут иметь следующие особенности [77]:

- высокая чувствительность биологических объектов позволяет регистрировать реакцию на относительно слабые нагрузки, а также эффект кумуляции дозы;
- позволяет суммировать эффекты различных антропогенных факторов;
- фиксирует скорость проходящих изменений в окружающей среде, а также тенденции развития;
- обнаруживает возможные пути попадания токсикантов в пищевые цепи;
- позволяет оценить возможную степень воздействия загрязняющих веществ на живые организмы и человека.

Некоторые показатели экологических и биологических свойств почв и методы их определения, рекомендуемые при проведении биологического мониторинга почв, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели эколого-биологических свойств почв и методы их определения [27]

Показатель	Метод
Численность бактерий	Люминесцентное микроскопирование по Звягинцеву и Кожевину
Численность сапротрофных бактерий	Посев на МПА
Численность актиномицетов	Посев на КАА
Численность микромицетов	Посев на подкисленную среду Чапека
Численность спорообразующих бактерий	Посев на МПА из предварительно пастеризованной суспензии
Численность <i>Azotobacter</i>	Метод комочков обрастания на среде Эшби
Структура комплекса почвенных микромицетов	По радиальной скорости роста колоний микроскопических грибов
Интенсивность выделения из почвы $CO_2$	По Макарову в модификации Галстяна
Полевое «дыхание» почвы	По Карпачевскому, Киселевой
Целлюлозолитическая способность почвы	По разложению полотна
Интенсивность накопления свободных аминокислот	По количеству аминокислот на полотне
Скорость разложения в почве мочевины	Экспресс-метод по Аристовской и Чугуновой
Активность каталазы	По Галстяну
Активность дегидрогеназы	По Галстяну
Активность ферриредуктазы	По Галстяну
Активность инвертазы	По Галстяну в модификации Хазисва
Активность уреазы	По Галстяну
Активность фосфатазы	По Галстяну в модификации Хазисва
Общий гумус	По методу Тюрина в модификации Никитина
Содержание углеводов	По методу Дюбуа в модификации Артемьева
Качественный состав гумуса	По методу Тюрина в модификации Пономаревой и Плотниковой
Содержание в почве аммиачного азота	Метод с использованием реактива Несслера
Содержание в почве нитратного азота	По методу Грандваль-Ляжу
Содержание в почве подвижных соединений фосфора	По методу Мачигина
Фитотоксичность почвы	По изменению показателей прорастания семян (всхожесть, энергия прорастания, дружность прорастания, скорость прорастания) и интенсивности начального роста проростков (длина корней, длина зеленых проростков, масса корней, масса зеленых проростков)
pH почвы	Потенциометрический метод
Eh почвы	Потенциометрический метод

На сегодняшний день нет однозначного мнения в выборе наиболее информативных показателей, подходящих для оценки состояния почв. Предпочтения отдается физическим и химическим характеристикам почвы, как индикаторам их состояния и качества, и прежде всего потому, что биологические параметры намного сложнее измерить, интерпретировать и предсказать. В то же время, считается, что биологические индикаторы имеют ряд преимуществ. Во-первых, это высокая чувствительность к внешним воздействиям, во-вторых, они позволяют нам диагностировать негативные процессы на ранних стадиях проявления; в-третьих, только через них можно судить о воздействиях, которые существенно не изменяют материальный состав почв. В некоторых странах для мониторинга и диагностики почвенных условий используются следующие показатели [80]

- Германия: микробная биомасса, дыхание, ферментативная активность почв;
- Швейцария: земляные черви, микробная биомасса, дыхание и N-минерализация;
- Чешская Республика: микробная биомасса, дыхание N-минерализация, нитрификация, ферментативная активность почв;
- Великобритания: микробная биомасса, дыхание, микробное разнообразие;
- Новая Зеландия: микробная биомасса, дыхание и N-минерализация.

### **1.2.2 Биотестирование**

Не менее эффективным методом для оценки токсического воздействия химических, физических или биологических факторов на почвы считается биотестирование. При биотестировании токсичность среды определяют с помощью тест-организмов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-организмов [35]. Биотестирование проводят в виде эксперимента в лаборатории, регистрируя изменения биологически важных

показателей (тест-реакций) под воздействием исследуемых проб. Изменения тест-реакция оценивают в соответствии с выбранными критериями токсичности. Сама по себе тест-система – это совокупность некоторых чувствительных биологических элементов (сенсоров) и исследуемой среды, в которой они находятся [73].

Основой тестовой системы являются тестовые объекты и тестовые культуры (или тестовые организмы). Тестовым объектом является проба или образец, который исследуется, им оказывают воздействие на тестовую культуру (тестовый организм), вызывая тест-реакцию. Тестовая культура представляет собой лабораторную популяцию особей, как правило, одного вида живых организмов (тестовых организмов), искусственно поддерживаемых (культивируемых) на питательной среде в стандартных условиях и используемых для оценки токсичности при биотестировании. Как сенсор здесь выступает сама живая система (популяции культуры клеток, организмы или их элементы). Чувствительность сенсоров контролируется модельным токсикантом (аналогом “стандартного образца” в аналитических химических измерениях). Биотесты проводятся для определения общей токсичности, мутагенности и канцерогенности. При проведении биотестирования в качестве критерия токсичности принимается достоверное количественное значение тестового параметра, на основании которого делается вывод о токсичности. Тестовая система измеряет воздействие путем моделирования возможных способов поступления вредного вещества в организм, поэтому основными тестируемыми объектами являются водные среды. В качестве биологических чувствительных сенсоров-объектов выступают гидробионты: простейшие, водоросли, ракообразные, моллюски, рыбы и др. Поскольку оценка воздействия твердых компонентов окружающей среды, таких как почва, на водные тест-объекты напрямую трудна, это делают опосредованным способом, в этом случае используют водные экстракты или поровые воды указанных твердых объектов. Также возможно биотестирование в фазе взвешенных частиц [73].



Реакция тест-объектов используемая в настоящее время для выявления эффектов различных воздействий на состояние среды представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Реакция тест-объектов на выявления токсичности среды

Тест-объект	Измеряемые параметры	Литература
Бактерии: <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Sarcinalutea B-110</i> , <i>Enterobacteraerogenes</i> ; <i>Rhodococcuserythropolis</i> ; <i>Acinetobactercalcoaceticus</i> ; <i>Vibrio fischeri</i> . <i>Vibrio (Benekea) harveyi</i>	Смертность, скорость роста, интенсивность свечения	Nandakumarand Mattiasson, 1999; Rettberg et al., 2000; RU2202619; RU2225000; RU2232805; РФ2207377; Скуриатов и др., 1998; Gellcrtet. et. al, 1999.
Водоросли: <i>Chlorellapyrenoidosa</i> , <i>Dunaliellasalina</i> , <i>Nitellaflexilis</i> , <i>Scenedesmusquadricauda</i> , <i>Selenastrumcapricornutum</i>	Численность клеток, флуоресценция и фотосинтез клеток <i>in vivo</i> , сырой и сухой вес, морфологические изменения клеток, содержание хлорофилла А и АТФ, подвижность клеток, скорость прорастания зооспор	Greenbaum and Sanders, 2005; Григорьев, 1997; Егороваидр. 1998; De Groote et al., 1998; Kirby et al, 1998.
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Грибы: Вешенка обыкновенная <i>Pleurotusostreatus</i>	Смертность, количество мутантных форм колоний, количество морфозов, изменение размеров колоний; регистрация изменений рН, детектирование паров фенола в воздухе рабочей зоны	RU2319959; RU2170258; RU2277125
Высшие растения: <i>Lemnaminor</i> , <i>Elodea canadensis</i> , <i>Sinapisalha</i> . рис, гречиха, овес, табак, лук-батун	Биоаккумуляция тяжелых металлов в цитоплазматических вакуолях, скорость роста побегов в длину, содержание хлорофилла, ксантофила, каротина, пролина	Остроумов, Головки,1992; Тимофеева, Балаян, 1990; Zhang, Jin, 1997.
Простейшие: инфузории Стилонихии, <i>Colpodasteinii</i> , <i>Parameciumcaudatum</i> , <i>Spirostomumambiguum</i> var. <i>MajorEhrhg.</i> , <i>Tetrahymenapyrififormis</i>	Смертность, скорость прироста, двигательная активность, дыхательная активность, хемотаксическая реакция	RU2335770; RU2262529; RU2039825 Егорова и др., 1998; Скуриагов и др., 1998; Sauvantetal, 1999.

Динофлагелляты <i>Pyrocystislunula</i>	Интенсивность свечения	US4950594
Гидра: <i>Hydra attenuata</i> Pallas, <i>Hydra vulgaris</i> Pallas	Функциональные и морфологические изменения (состояние тела и щупалец, скорость восстановления поврежденных частей тела)	Брест кина и др., 1987; Beach, Pascos, 1998.
Моллюски: <i>Arionater</i> L., <i>Mercenariamercenaria</i> , <i>Limnaeastagnalis</i> , улитки <i>Nassarius sobsoletus</i> , мидии, устрицы	Выживаемость, скорость роста, поведенческие реакции, выделение слизи, гидратация тела, действие на пищеварительные железы, характер эмбрионального развития, индекс кондиции молоди, гонадный индекс	Тюрин, Христофорова, 1995; De Groote et al., 1998.
Иглокожие: <i>Ulemicentrotuspulcherrimus</i> , <i>Anthocidariscrassispina</i> <i>Pseudocentrotusdepressus</i>	Характер эмбрионального развития, число и размер ядрышек в клетке. Тест- объекты: икра, сперма, гаметы	Макарова, 1996; Тюрин, Христофорова, 1995; Kobayashi, 1990.
Ракообразные: <i>Ampeliscaabdita</i> , <i>Ceriodaphniadubia</i> , <i>Daphniamagna</i> , <i>Diporeiaspp</i> , <i>Eohaustoriusestuaris</i> , <i>Gammaruspulex</i> (L), <i>Gammarusduebeni</i> , <i>Gammarus Lacustris</i> , <i>Leptocheirusplumulosus</i> , M. <i>Macrocopa</i> , S. <i>Mucronata</i> , C. <i>Reticulata</i> , S. <i>Vetulus</i>	Смертность, активность ферментов, плодовитость, поведенческие реакции (избегание загрязненной среды, время выхода из камеры тестирования на свет), линейный рост, сроки полового созревания, пищевая активность	RU2245367; Сафонова, Нанькина, 1998; Barber et al., 1998; Jaworska et al., 1999.
Черви: Дождевой <i>Eiseniafoetida</i> , пескожид <i>Nereisvirens</i> , модиолус <i>Modiolusdemissus</i> , трубочник <i>Tubifextubifex</i> , медицинская пиявка <i>Hirudo medicinalis</i>	Содержание ксенобиотиков в тканях, изменение репродуктивной функции, поведенческие реакции (смена статичного состояния на динамичное)	Хоружая, 1991; Lucan Bouche, 1997.
Насекомые: Комнатная муха <i>Musca domestica</i>	Процент отрождаемости личинок	RU2386697
Рыбы: Карп, окунь, белый амур, толстолобик, гольян <i>Phoxinusphoxinus</i> , чавыча <i>Oncorhynchushawyttscha</i> , лосось <i>Salmasalar</i> L.	Содержание ксенобиотиков в мышцах и икре, электрическая проводимость крови, биохимические показатели крови, поведенческие реакции (уход из токсичной среды), функциональное состояние (потребление кислорода, устойчивость к гипоксии)	Карпович, Лукьяненко, 1990; Waring, Moore, 1997.

Как видно, широко используемые в экотоксикологическом контроле методики, главным образом, основаны на реакциях живого организма на разных уровнях его организации (макромолекула, клетка, орган, организм, популяция). Каждый вышестоящий уровень представляет собой систему, в которую входит нижележащий уровень как компонент (элемент) со всеми составляющими. Оценка воздействия токсикантов производится на основании подсчета показателей смертности особей, плодовитости, подавления прироста численности популяции клеток водорослей, потере подвижности инфузорий и др.

Почва, в связи со своей гетерогенностью, является сложным объектом для биотестирования. Результаты различных биотестов могут существенно отличаться, не только из-за использования различных тест-организмов, но и из-за различий в процедурах пробоподготовки. Кроме того, различные тест-организмы обладают разной чувствительностью к поллютантам. Поэтому в биологическом мониторинге почв используется комплексный подход с использованием тест-батарей, состоящих из организмов разных трофических уровней, совмещение твердо- и жидкофазных методов, а также привлечение химических методов определения концентрации поллютантов в почве [73].

### **1.2.3 Билюминесцентный метод оценки загрязнения почвы**

Биологический анализ, как правило, требует много времени, и профессионального культивирования организмов. Из-за потенциального воздействия загрязняющих веществ, особенно новых синтезированных химических веществ, актуальность разработки быстрого, удобного и экономически эффективного метода оценки биологической токсичности крайне высока. Применение люминесцентных бактерий для анализа токсичности привлекло внимание исследователей и быстро развивалось. Дальнейшее использование этого метода и выявление его преимуществ по сравнению с существующими биотестами сделало билюминесцентный анализ одним из

перспективных методов биологического мониторинга. Биолюминесценция обеспечивает потенциально неограниченные, но все еще мало используемые возможности для создания широкого спектра принципиально новых методов анализа, совмещающих в себе преимущества быстрой неспецифической системы детекции с возможностью сверхчувствительной специфической идентификации отдельных соединений, стабильности реагентов с возможностью проведения анализов в полевых условиях и простотой в обращении.

Люминесцентные бактерии могут излучать сине-зеленый свет в процессе нормального метаболизма, а воздействие токсических веществ уменьшает интенсивность свечения организмов. Первый люминесцентный бактериальный штамм был получен Heller J. F. в 1854 году и с 1930-х годов был первым эталоном для оценки острой токсичности. В 1978 году появился первый серийный биолюминесцентный биотест для образцов воды (Microtox® test by Beckman Instruments, Inc. U.S.A.) [85], тест основан на использовании биолюминесцентных бактерий *V. fischeri* в качестве тест-объекта. После этого многие страны и регионы установили официальный стандарт для анализа ингибирования люминесцентных бактерий, применяемых на образцах воды, например, французский стандарт (DIN 38412-1990), американский стандарт (ASTM D5660- 1995), китайский стандарт (GB / T 15441- 1995) и европейский стандарт (EN ISO 11348). В настоящее время во многих странах установлен стандарт токсичности на основе люминесцирующих бактерий для теста сточных вод [82].

В Московском государственном университете разработана серия бактериальных тест-систем под общим названием «Эколном» [39], представленных не только природными, но и рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*, несущим lux-оперон либо природных светящихся бактерий, либо почвенной люминесцирующей бактерии *Photobacterium luminescens* [84, 34, 59].

Биолюминесцентный анализ привлекает все большее внимание в последние годы из-за достижений в области генной инженерии, благодаря которым появилась возможность добавить люминесцентные качества не светящимся организмам, выделенным из разных биотопов. Это позволяет использовать биолюминесцентный анализ в какой угодно среде, достаточно подобрать организм с подходящими свойствами. Еще одним достоинством биолюминесцентного биотеста является легкость регистрации тест-сигнала. Изменение интенсивности свечения организмов регистрируют с помощью специальной светочувствительной аппаратуры – биолюминометров и хемиллюминометров, что позволяет получать объективные результаты анализа и минимизировать тем самым человеческий фактор в исследовании.

#### **1.2.4 Ферментативный биолюминесцентный биотест**

Ферментативные биолюминесцентные биотесты *in vitro* обладают рядом преимуществ относительно биотестов на светящихся организмах. Например, работа с выделенными ферментами позволяет изучать механизмы воздействия токсикантов на функционирование отдельных звеньев метаболической цепи, упростить и ускорить процедуру проведения анализа, варьировать чувствительность методов путем изменения условий проведения анализа (например, изменяя соотношение компонентов реакционной смеси), увеличить точность анализа за счет перехода от живого организма к реактиву. Таким образом, использование ферментов *in vitro* позволяет создать принципиально новые экспрессные регулируемые биодатчики для экологического мониторинга.

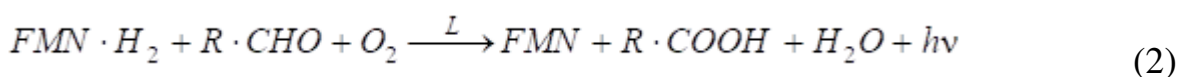
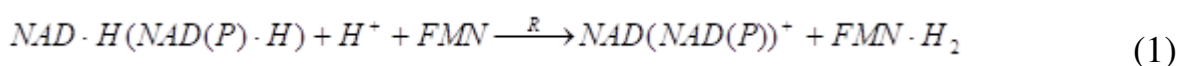
Примером является использование для анализа токсичности различных сред биолюминесцентных ферментативных биотестов *in vitro*, основанных на фермент-субстратных комплексах светящихся бактерий [30].

Биолюминесцентная реакция, катализируемая выделенными из светящихся бактерий люциферазой и НАД(Ф)Н: ФМН-оксидоредуктазой в

мировой практике используется главным образом для разработки специфических методов анализа различных метаболитов и активности ферментов [31]. Например, разработан метод определения активности моноаминоксидазы [110], НАД-зависимой гидрогеназы [63, 64], кофакторов биолюминесцентной реакции, в том числе НАД<sup>+</sup>, НАДН, ФМН, включая активные формы витамина В2 [96, 97, 98, 100, 101, 102, 103], протеолитических ферментов [99, 105], перекиси водорода в сыворотке и моче [95, 104], содержания альдегидов, в том числе феромонов насекомых в воздухе [94]. Кроме того, разработаны способы определения люизита в водноспиртовых экстрактах [60].

Однако ферментативные системы светящихся бактерий – это уникальный тест-объект, который легко можно использовать для определения интегральной токсичности различных сред [29, 32].

Концепция биотестирования с помощью люциферазы была выдвинута в 1990 году [90]. Люциферазные биотесты позволяют обнаружить токсические свойства тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции. Они основаны на ингибировании люциферазы компонентами анализируемых смесей. В качестве тестового объекта рассматривается биферментная система: НАД(Ф)Н: ФМН – оксидоредуктаза (R) + люцифераза (L) которая катализирует последовательно 2 ферментативные реакции:



В результате первой реакции которая катализируется NADH: FMN – оксидоредуктазой восстанавливается FMN (рис. 1) с помощью NADH (рис. 2). В то же время NADH становится NAD<sup>+</sup> перенося протон и два электрона на молекулу FMN с образованием FMNH<sup>-</sup> (депротонированная форма

восстановленного флавина). В водных растворах при нейтральных рН восстановленный флавин депротонирован на 90%, а остальные 10% состоят из FMNH<sub>2</sub>, который образуется в результате отрыва протона от подходящего донора - воды. Эта реакция позволяет поддерживать постоянное (стационарное) свечение благодаря постоянному появлению FMN·H<sub>2</sub>.

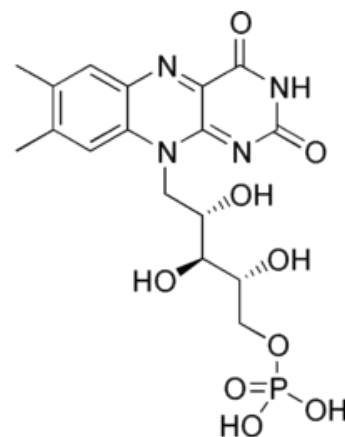


Рисунок 1 – молекула флавиномононуклеотида (FMN)

Вторую реакцию катализирует люцифераза, данная реакция является билюминесцентной. В ходе реакции восстановленный флавин и алифатический альдегид окисляются кислородом воздуха, а в итоге образуется окисленная форма флавина, жирная кислота, и испускается квант света. Считается, что в бактериях эти две реакции взаимосвязаны [89].

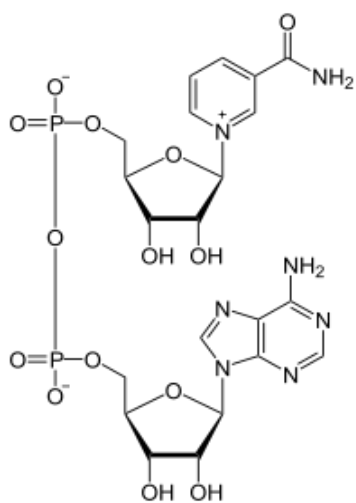


Рисунок 2 – молекула никотинамидаденинуклеотида (NADH)

Измерения проводят следующим образом: в измерительной кювете смешивается ферментативный комплекс НАД(Ф)Н: ФМН – оксидоредуктаза + люцифераза, субстраты и аналит, а затем максимальная интенсивность свечения регистрируется на билюминометре. Изменение интенсивности билюминесценции в присутствии образца, по сравнению с контролем, определяет токсичность смеси.

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер с молекулярной массой 79 кДа, состоящий из двух неидентичных субъединиц (42 и 37 кДа, соответственно) (рис. 3). В системе из двух ферментов R+L излучение происходит в сине-зеленой части видимого спектра с максимумом 478-505 нм. Молекула не содержит металлов, простетических групп, неаминокислотных остатков и дисульфидных связей. В настоящее время известно, что бактериальная люцифераза обладает по одному центру связывания для каждого

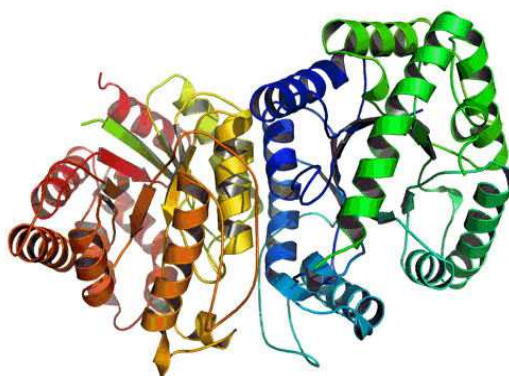


Рисунок 3 – Структура бактериальной люциферазы [110]

из субстратов - флавинмононуклеотида и альдегида. Сродство люциферазы к своим субстратам велико.

NAD(P)H: FMN - оксидоредуктаза – мономерный белок. У разных видов бактерий различают NADH и NADPH – специфические FMN редуктазы, молекулярные массы которых варьирует от 20 до 40 кДа.



## 2 Материалы и методы исследования

Для оценки диагностической значимости биферментной биолюминесцентной системы в выявлении загрязнения почвы были использованы образцы почвы и породы (далее для простоты будем называть всё почвами), отобранные в рамках модельного опыта. Образцы были отобраны в экологически чистых районах, что исключало техногенное загрязнение почв и пород (ОПХ «Минино» (Емельяновский район), лесной массив «Погорельский бор» (Емельяновский район), пойма р. Енисей (Березовский район)).

Почвы были высушены, просеяны через сито для достижения однородности. Модельный опыт заложен в сосудах с массой почвы и породы 8 кг. Повторность в опытах 4-х кратная. Породы представлены четвертичными лёссовидными отложениями (за исключением супеси). Всего, в рамках данного модельного опыта было заложено 20 сосудов (рис. 4).



Рисунок 4 – Внешний вид модельного опыта

Лабораторные исследования представленных 20 почвенных образцов были выполнены в лаборатории Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленном подразделении Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства (КрасНИИСХ) и состояли в определении рН почвенного раствора (определялось в соответствии с ГОСТ 26483-85), гранулометрического состава (определялся в соответствии с ГОСТ 12536-2014) содержания гумуса (определялось в соответствии с ГОСТ 26213-91) и остаточного свечения (Т%) (приложение А).

В качестве загрязнителя использовали медь - широко распространенное вещество, активно взаимодействующее в разнообразных биогеохимических циклах. Медь входит в состав многих окислительно-восстановительных ферментов, в которых она способна формировать стабильные комплексы со специфическими белками. При низких концентрациях в окружающей среде элемент необходим для развития организмов. По сравнению с другими микроэлементами питательная функция меди является наиболее выраженной. Потребность в меди обусловлена ее участием в образовании лигандов N, S, O в составе белков. В то же время, при поступлении в организм высоких концентраций, медь проявляет токсические свойства. Содержание элемента в почвах нормируется.

Загрязнение образцов и определение остаточных количеств поллютантов было выполнено в лаборатории ФГБУ «Красноярский референтный центр Россельхознадзора».

Приготовление экстракта почвы для проведения билюминесцентного анализа производили по следующей методике. Воздушно-сухую пробу почвы растирают в ступке, просеивают через сито и тщательно перемешивают. Навеску почвы (массой не менее 5,0 г) помещают в коническую колбу, мерным цилиндром приливают пятикратный объем дистиллированной воды (рН 6,8 - 7,4) (5 см<sup>3</sup> на 1 г образца), взбалтывают в течение 30 минут. Экстракт фильтруется через бумажный фильтр - белая лента. После фильтрации пробу

центрифугируют на центрифуге («Eppendorf» centrifuge 5810 R, 10 мин., 3500 об/мин).

Для проведения биолюминесцентного анализа необходимы следующие реагенты:

- лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов (комплект реактивов аналитической биолюминесценции, КРАБ, производство - Лаборатория нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, Красноярск), содержащий 0,5 мг люциферазы (L) EC 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*Photobacterium leiognathi*) и 0,15 ед. активности NADH: FMN-оксидоредуктазы (R) EC 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*). Препарат разбавляли в 5 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 7.0, раствор хранили при -12°C.
- субстраты ферментов: FMN (Serva); тетрадеканаль (Merck); NADH; для приготовления раствора NADH использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 6,8; для приготовления раствора FMN – дистиллированную воду, раствор 0,0025 % тетрадеканала готовили добавлением к 5 мл буфера 50 мкл 0,25 % спиртового раствора тетрадеканала;

Для определения активности сопряженной системы R+L использовали реакционную смесь следующего состава:

- 350 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера (pH = 6,9);
- 5 мкл раствора КРАБа;
- 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканала;
- 100 мкл 0,4 мМ раствора NADH;
- 50 мкл дистиллированной воды или водного экстракта почвы;
- 10 мкл 0,5 мМ М раствора FMN.

Реакционная смесь помещали в кювету люминометра («Promega GloMax» 20/20 Luminometer, USA) и измеряли интенсивность свечения в течение 150 секунд. В качестве анализируемого параметра выступает величина остаточного свечения, которую находили по формуле (7)

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\% \quad (7)$$

где  $I$  – максимальная интенсивность свечения в присутствии анализируемого образца и  $I_0$  – максимальная интенсивность свечения в контроле (дистиллированная вода).

Для оценки токсического воздействия использовали следующие критерии:

- 1 группа –  $T > 80\%$  – образец не загрязнен (допустимая степень загрязнения);
- 2 группа –  $50\% < T < 80\%$  – образец загрязнен;
- 3 группа –  $T < 50\%$  – образец сильно загрязнен.

На основании полученных данных определяли величины токсикологических параметров  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ ,  $EC_{80}$  соответствующие концентрациям токсиканта, вызывающего ингибирование системы на 20, 50 и 80% по сравнению с контрольным уровнем свечения, определяемым в присутствии дистиллированной воды.

Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторностях и обработаны методами вариационной статистики.

### **3 Результаты и обсуждение**

[Изъято 7 страниц]

## Заключение

Были выявлены следующие количественные характеристики чувствительности тест-системы к загрязнению подвижной медью для каждой почвенной разности:

- Связный песок – при концентрации подвижной меди 9,88 мг/кг (3.3 ПДК) остаточное свечение составило 84,4%, что считается не ингибирующим билюминесценцию.
- Супесь – при концентрации подвижной меди 9,77 мг/кг (3.3 ПДК) остаточное свечение составило 11%, что считается сильным ингибированием билюминесценции.
- Легкий суглинок – при концентрации подвижной меди 16,92 мг/кг (5,6 ПДК) остаточное свечение составило 91,2%, что считается не ингибирующим билюминесценцию.
- Тяжелый суглинок – при концентрации подвижной меди 16,46 мг/кг (5,5 ПДК) остаточное свечение составило 64,7%, что считается слабым ингибированием билюминесценции.
- Чернозем – при концентрации подвижной меди 1,07 мг/кг (0,6 ПДК) остаточное свечение составило 110,8%, что считается не ингибирующим билюминесценцию.

Все свойства почвы влияют на билюминесценцию. Наибольшее ингибирующее влияние на интенсивность билюминесценции биферментной тест-системы оказывает содержание физической глины в образце, также ингибирующее воздействие оказывает содержание почвенного органического вещества. Меньшее влияние оказывает реакция среды.

Диапазон чувствительности биферментной тест-системы к хлориду меди составляет от 1,7 мг/л до 0,14 мг/л.

Экстракты почти всех типов почв ослабляют ингибирующее воздействие токсиканта на билюминесценцию биферментной тест-системы. Исключением стал экстракт супеси, который не оказал существенного влияния на токсикант.

Медь, внесенная в количестве 6 ПДК в чернозем, легкий суглинок и связный песок не влияет на интенсивность билюминесценции биферментной тест-системы. В составе тяжелого суглинка медь ингибирует тест-систему, а в составе супеси оказывает сильное ингибирующее влияние.

## Список сокращений

ПДК – предельно допустимая концентрация;

ОДК – ориентировочно допустимая концентрация;

R – NADH: FMN оксидоредуктаза;

L – люцифераза;

NADH – никотинамидадениндинуклеотид;

FMN – флавинмононуклеотид;

КрасНИИСХ – Красноярский научно-исследовательский институт  
сельского хозяйства;

КРАБ – комплект реактивов аналитической билюминесценции;

ЕС - effective concentration.

## Литература

1. Байдина, Н. Л. Загрязнение городских почв и огородных культур тяжелыми металлами / Н. Л. Байдина // *Агрохимия*. - 1995. - № 12. - С. 99-104.
2. Берестине М. Д. *Hydra attenuata* в качестве тест-объекта при оценке загрязненности сточных и природных вод. Методы биоиндикации и биотестирования природных вод / М. Д. Берестине, О. П. Данильченко, Н. А. Туманов / Вып.1. Л.: Гидрометеоиздат, 1987. – С.71-76.
3. Вальков В.Ф. Методология исследования биологической активности почв на примере Северного Кавказа / В. Ф. Вальков, К. Ш. Казеев, С. И. Колесников // *Научная мысль Кавказа*. Изд-во СКНЦВШ. 1999. № 1. С. 32-37
4. Возбутская А. Е. Химия почвы / А. Е. Возбутская. – Москва : Высшая школа, 1964. — 220 с.
5. Виноградов А. П. Биогеохимия / А. П. Виноградов. – БСЭ. Изд, 1950. – 450 с.
6. Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень) /ГН 1.546-96 Госкомэпидемнадзор РФ. – М.: Минздрав РФ, 1997. – 51 с.
7. Гительзон, И. И. Светящиеся бактерии / И. И. Гительзон, Э. К. Родичева, С. Е. Медведева и др. — Новосибирск: Наука. – 1984. – 15 с.
8. ГОСТ 26204-91 Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Чирикова в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1993. – Москва: Издательство стандартов, 1992. – 8 с.
9. ГОСТ 26205-91 Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Мачигина в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1993. – Москва: Издательство стандартов, 1992. – 10 с.
10. ГОСТ 26206-91 Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Ониани в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1993. – Москва: Издательство стандартов, 1992. – 7 с.



11. ГОСТ 26213-91 Почвы. Методы определения органического вещества. – Введ. 01.07.1993. – Москва: Издательство стандартов, 1992. – 8 с.
12. ГОСТ 26483-85. Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее рН по методу ЦИНАО. – Введ. 01.07.1986. – Москва: Издательство стандартов, 1985. – 6 с.
13. ГОСТ 29269-91 Почвы. Общие требования к проведению анализов. – Введ. 01.07.1993. – Москва: Стандартиформ, 2005. – 4 с.
14. ГОСТ Р 50682-94 Почвы. Определение подвижных соединений марганца по методу Пейве и Ринькиса в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 14 с.
15. ГОСТ Р 50683-94 Почвы. Определение подвижных соединений меди и кобальта по методу Крупского и Александровой в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 19 с.
16. ГОСТ Р 50684-94 Почвы. Определение подвижных соединений меди по методу Пейве и Ринькиса в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 14 с.
17. ГОСТ Р 50685-94 Почвы. Определение подвижных соединений марганца по методу Крупского и Александровой в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 12 с.
18. ГОСТ Р 50686-94 Почвы. Определение подвижных соединений цинка по методу Крупского и Александровой в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 16 с.
19. ГОСТ Р 50687-94 Почвы. Определение подвижных соединений кобальта по методу Пейве и Ринькиса в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 16 с.
20. ГОСТ Р 50688-94 Почвы. Определение подвижных соединений бора по методу Бергера и Труога в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 16 с.

21. ГОСТ Р 50689-94 Почвы. Определение подвижных соединений молибдена по методу Григга в модификации ЦИНАО. – Введ. 01.07.1995. – Москва: Издательство стандартов, 1994. – 14 с.
22. Григорьев Ю. С. Оперативные методы и аппаратура для биоиндикации и биотестирования загрязнения окружающей среды. / Ю. С. Григорьев // Вестн. Хакас. гос. ун-та. Сер. 4. 1997. N4. С.60-62.
23. Давыдова, С.Л. О токсичности ионов металлов / С.Л. Давыдова. // М.: Знание, 1991. – 32 с.
24. Егорова К. В. Токсикологическая оценка нефтезагрязненных почв / К. В. Егорова, С. К. Зарипова, Г. П. Каюкова, Г. В. Романов, Р. П. Наумова // Казан. гос. Ун-т; Казань. 1998. 20 с.
25. Инструкция по контролю за состоянием почв на объектах предприятий Миннефтепрома. РД 39-0147098-015-90. – М.: Миннефтегазпром, 1990. – 57 с.
26. Казеев К. Ш. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований / К. Ш. Казеев, С. И. Колесников, В. Ф. Вальков — Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 2003. — 230 с.
27. Казеев К. Ш. Биодиагностика почв: методология и методы исследований / К. Ш. Казеев, С. И. Колесников — Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2012. — 242 с.
28. Карпович Т. А. Рекомендации к разработке комплексного, экспрессного метода биотестирования сточных вод с использованием рыб в качестве тест-объекта / Т. А. Карпович, В. И. Лукьяненко // Эксперим. вод. токсикол. 1990. N 14. С.232-237.
29. Кратасюк В. А. Принципы использования светящихся бактерий для анализа / В. А. Кратасюк, И. И. Гительзон // Красноярск, 1993. - С. 4-7.
30. Кратасюк В. А. Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение: автореф. дис. д-ра биол. наук : 03.00.02 / Кратасюк Валентина Александровна. – Красноярск, – 1994. – 20 с.

31. Кратасюк В. А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В. А. Кратасюк, И. И. Гительзон // Успехи микробиологии. – 1987. – Т. 21. – С. 3-30.
32. Кратасюк В. А. Люциферазный биотест для определения степени поражения фузариозом зерна пшеницы / В. А. Кратасюк, О. И. Егорова, Е. Н. Есимбекова, Н. С. Кудряшева, Л. Ю. Орлова // Прикладная биохимия и микробиология, 1998. №6. с.688-691.
33. Кратасюк В. А. Биолюминесцентный микроанализ на основе бактериальной люциферазы и светящихся бактерий / В. А. Кратасюк, С. Е. Медведева, Н. С. Кудряшева, Е. Н. Есимбекова // Очерки экологической биофизики, Отв.ред. Т. Г. Волова, Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2003, с.174-186.
34. Куц В. В. Биолюминесцентный мониторинг экотоксикантов (экологическая люминометрия) / В. В. Куц, К. А. Аленина, О. В. Сенько, Е. Н. Ефременко, А. Д. Исмаилов // Вода: химия и экология. – 2011. – №. 10. – С. 47-53
35. Макарова Т. А. Возможности использования ядрышкового критерия для биотестирования / Т. А. Макарова // Науч.-техн. конф. проф.-преп. состава Астрах. гос. техн. ун-та. Астрахань, 1996: Тез. докл. Астрахань, 1996. С.94-95.
36. Мелехова О. П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О. П. Мелехова, Е. И. Сарапульцева и др. // М.: ИЦ Академия. – 2010. – 228 с.
37. Методические указания по проведению комплексного мониторинга плодородия почв земель сельскохозяйственного назначения. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2003. – 240 с.
38. Методика выполнения измерений массовой доли микроэлементов в почвах и илах методом атомно-эмиссионной спектроскопии № 8.023-96.
39. Методические рекомендации (МР 11-1/133-09). Методика экспрессного определения токсичности воды с помощью люминесцентного бактериального теста “Эколюм” / Ревазова Ю.А., Данилов В.С., Зарубина А.П.,

Маркелова С.И., Соловьева Л.Н., Аверин А.В. // Методические рекомендации. Гос. сан. эпид. нормирование РФ. Минздрав России. М. 2000. 19 стр. Зарегистрированы в департаменте Государственного санитарно-эпидемиологического надзора РФ (№№ 11-1/133-09) от 08 июня 2000г. — 2000. — С. 1–19.

40. Методика выполнения измерений методом газожидкостной хроматографии. РД 52.18.578-97. – М.: Федеральная служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, 1999. – 57 с.

41. Обобщённые перечни предельно-допустимых концентраций вредных веществ в почве. Приложение 1 и приложение 2 к письму ЦСИ Госкомприроды РСФСР от 18.12.90 № ЦС-299/15-73. – М.: ЦСИ Госкомнедра, 1990.

42. Онищенко Г. Г. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. / ГН 2.1.5.1315-03 – 2003. –22 с.

43. ОСТ 10070-95. Почвы. Методика определения (90) Sr в почвах сельхозугодий. – Введ. 01.01.1995.

44. ОСТ 10-259-2000. Почвы. Рентгенофлуоресцентное определение валового содержания тяжелых металлов. – Введ. 01.07.2000. – Москва, 2010

45. Остроумов С. А. Биотестирование токсичности поверхностно-активного вещества (сульфонола) с использованием проростков риса как тест-объекта / С. А. Остроумов, А. Э. Головки // Гидробиол. ж. 1992. Т. 28, N 3. С.72-75.

46. Пат. 2039825 Российская Федерация, МПК С1, С12Q1/02, G01N33/18. Способ определения токсичности объектов внешней среды/ Д.О. Виноходов, В.О. Виноходов; заявитель и патентообладатель Виноходов Дмитрий Олегович; Виноходов Владимир Олегович. – № 5036054/13; заявл. 25.03.1992; опубл. 20.07.1995.

47. Пат. 2170258 Российская Федерация, МПК С1, С12Q1/02, G01N33/18. Способ оценки общей токсичности воды/ Ю.А. Сизов; С.В.

Якутов; В.Ю. Савельев; заявитель и патентообладатель Государственное унитарное предприятие Научно-производственное предприятие “Полет”. – № 2000104314/13; заявл. 02.22.2000; опубл. 07.10.2001.

48. Пат. 2202619 Российская Федерация, МПК 7 C12Q1/18, C12Q1/06 C12Q1/18, C12R1:07. Способ определения общей токсичности твердой, жидкой и газообразной сред/ Туманов А.А., Глухова М.Н., Субботина Г.М., Крестьянинов П.А., Туманов А.С.; заявитель и патентообладатель Научно-исследовательский институт химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. – № 2001100968/13; заявл. 09.01.2001; опубл. 20.04.2003

49. Пат. 2207377 Российская Федерация, МПК 7 C12Q1/02, C12Q1/12, G01N33/18, C12Q1/02, C12R1:01. Биосенсорная система для определения 2,4-динитрофенола и ионов нитрита и биосенсоры для этой системы / Решетиллов А.Н., Ильясов П.В., Кувичкина Т.Н., Емельянова Е.В., Кнакмусс Г.И.; заявитель и патентообладатель Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (RU). – № 2000127429/13(029202); заявл. 02.11.2000; опубл. 27.11.2002, Бюллетень изобретений полезных моделей. М. 27.06.03. № 18 с. 934.

50. Пат. 2232805 Российская Федерация, МПК C2, C12N1/20, C12Q1/02. Штамм бактерий вида *acinetobacter baumannii* var. *woffii* 12r, используемый в качестве индикаторного при биотестировании питьевой воды (r-резистентный) / заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науки и здравоохранения “Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной”. – № 2002116708/13; заявл. 21.06.2002; опубл. 20.07.2004

51. Пат. 2245367 Российская Федерация, МПК C2, C12Q1/02, G01N33/18. Способ биотестирования проб воды и водных вытяжек / В.П. Ларченко; заявитель и патентообладатель Военно-медицинский институт Федеральной пограничной службы Российской Федерации при Нижегородской

государственной медицинской академии (ВМИ ФПС РФ при НГМА), Ларченко Виктор Петрович. – № 2002119432/13; заявл. 17.07.2002; опубл. 27.01.2005.

52. Пат. 2258676 Российская Федерация, МПК С2, С02F3/34, С12Q1/04, G01N33/18. Способ оценки очистки сточных вод от хрома, цинка, меди / Г.Н. Соловых, Е.А. Рябцева, В.В. Минакова; заявитель и патентообладатель Оренбургская Государственная медицинская академия (ОГМА). – № 2003126248.13; заявл. 27.08.2003; опубл. 20.08.2005..

53. Пат. 2262529 Российская Федерация, МПК С1, С12N1/10, С12Q1/10. Способ биотестирования токсигенности кишечной палочки/ В.И. Терехов, Ю.Б. Шпонько, В.Н. Боровой, С.Н. Тельнов; заявитель и патентообладатель Кубанский государственный аграрный университет. – № 2003137265/13; заявл. 23.12.2003; опубл. 20.10.2005. Бюл. №29. – 6 с.

54. Пат. 2277125 Российская Федерация, МПК С2, С12Q1/00, G01N27/12. Способ создания биосенсора для определения паров фенола в воздухе/ Ю.Е. Силина, Я.И. Коренман, Т.А. Кучменко, О.М. Цивелева; заявитель и патентообладатель Государственное унитарное предприятие Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Воронежская государственная технологическая академия. – № 2004117718/13; заявл. 10.06.2004; опубл. 27.05.2006.

55. Пат. 2319959 Российская Федерация, МПКG01N33/18, G01N33/24, С12Q1/02, С12R1/865. Способ биотестирования воды, почвы, биологически активных веществ / Р.Ф. Гарипова; заявитель и патентообладатель ФГОУ ВПО "Оренбургский государственный аграрный университет". – № 2006108152/13; заявл. 15.03.2006; опубл. 20.03.2008. Бюл. №8. – 5 с.

56. Пат. 2335770 Российская Федерация, МПК G01N33/52, С12Q1/02. Способ определения токсичности воздуха по реакции инфузорий *Paramecium caudatum*/ В.Б. Кожаева, В.П. Самсонов; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – № 2006137988/15; заявл. 27.10.2006; опубл. 10.10.2008.

57. Пат. 2376380 Российская Федерация, МПК C12Q1/00. Билюминесцентный способ определения антиоксидантной активности гуминовых веществ / Н.С. Кудряшева, Е.С. Федерова; заявитель и патентообладатель Кудряшева Н.С., Институт биофизики Сибирского отделения Российской Академии Наук. – № 2007124565/13; заявл. 29.06.2007; опубл. 20.12.2009.

58. Пат. 2386697 Российская Федерация, МПК C12Q1/04, G01N33/18, A01K67/033. Способ контроля качества воды/ О.Н. Сороколетов, В.П. Гейко, В.Л. Петухов, В.Г. Маренков, А.В. Бгатов, И.И. Гудилин, К.В. Жучаев, А.А. Фридчер, О.В. Рявкин, М.А. Барсукова, Е.В. Михеева; заявитель и патентообладатель ФГОУ ВПО Новосибирский государственный аграрный университет. – № 2008100576/13; заявл. 09.01.2008; опубл. 20.04.2010. Бюл. №11. – 5 с.

59. Пат. 2394910 Российская Федерация, МПК C12N11/04, C12Q1/02, C12Q1/66. Люминесцентный биокатализатор для определения токсикантов/ Е.Н. Ефременко, О.В. Сенько, В.В. Куц, К.А. Аленина, А.В. Холстов, А.Д. Исмаилов; заявитель и патентообладатель Ефременко Елена Николаевна, Сенько Ольга Витальевна, Куц Виктория Викторовна, Аленина Кристина Александровна, Холстов Александр Викторович, Исмаилов Анвар Джураевич. – № 2008127809/13; заявл. 07.10.2008; опубл. 20.07.2010.

60. Пат. 2472149 Российская Федерация, МПК G01N33/18 (2006.01), G01N30/68 (2006.01). Способ определения массовой концентрации люизита в воде, содержащей иприт, газохроматографическим методом с применением пламенно-ионизационного детектора/ С.В. Садовников, Е.П. Гормай, Т.Ю. Шарафудинова, И.Н. Станьков, И.Д. Деревягина, Н.Е. Кузьмина; заявитель и патентообладатель Министерство промышленности и торговли Российской Федерации. – № 5036054/13; заявл. 19.07.2011; опубл. 10.01.2013.

61. Пат. 4950594 United States, МПК C12Q 1/13; C12Q 1/02; C12R 1/90. Microbiological assay using bioluminescent organism/ Arthur V. Stiffey; заявитель и патентообладатель The United States of America as

represented by the Secretary of the Navy, Washington, DC.. – № 4,950,594; заявл. 21.12.1987; опубл. 21.08.1990.

62. Пат. 6964857 США, МПК{7} C12M 1/00, C12Q 1/00. Greenbaum Elias, Sanders Charlene A... Measuring indigenous photosynthetic organisms to detect chemical warfare agents in water : UT-Battelle, LLC. - N 10/339197; Заявл. 09.01.03; Опубл. 15.11.05; НПК 435/29.

63. Петушков В. Н. Биферментная система NADH: FMN оксидоредуктаза - люцифераза из светящихся бактерий / В. Н. Петушков, Г. А. Кратасюк, Н. С. Родионова и др. // Биохимия. - 1984. - Т. 49. - 4. - С. 699-709.

64. Петушков В.Н. Изучение эффективности работы биферментной системы NADH: FMN - оксидоредуктаза-люцифераза светящихся бактерий / В.Н. Петушков, Н.С. Родионова, П.И. Белобров // Биохимия 1985, - Т. 50. - 3. - С. 401-405.

65. Протасов В. Ф. Экология, здоровье и природопользование в России / В. Ф. Протасов, А. В. Молчанов // – М.: Финансы и статистика, 1995.

66. Пятая сессия Межправительственного форума по химической безопасности, параллельное мероприятие по вопросам тяжелых металлов. Венгрия. - Будапешт, 2006. – 39 с.

67. Руководящий документ. Методические указания. Методика выполнения измерений массовой доли кислоторастворимых форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия, кобальта, хрома, марганца) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом в лабораториях Общегосударственной службы наблюдения и контроля загрязнения природной среды. РД 52.18.191-89. – М., 1990. – С. 32.

68. Руководящий документ. Методические указания. Методика выполнения измерений массовой доли подвижных форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия, кобальта, хрома, марганца) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом в лабораториях Общегосударственной службы наблюдения и контроля загрязнения природной среды. РД 52.18.289-90. – М., 1991. – С. 35.



69. Руководящий документ. Методические указания. Методика выполнения измерений массовой доли водорастворимых форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия, кобальта, хрома, марганца) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом в лабораториях Общегосударственной службы наблюдения и контроля загрязнения природной среды. РД 52.18.286-91. – М., 1991.

70. Руководящий документ. Методические указания. Охрана природы. Почвы. Методы отбора объединенных проб почвы и оценки загрязнения сельскохозяйственных угодий остаточными количествами пестицидов. РД 52.18.156-99. – Обнинск: Федеральная служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, 1999. – 13 с.

71. Сазонова В. Е. Сравнительный анализ чувствительности двух биотестеров для определения степени токсичности воды. / В. Е. Сазонова, Е. В. Панькина // Вод. Ресурсы. 1998. Т. 25, N 1. с.80-84.

72. Санитарно-гигиенические нормы предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно допустимых концентраций (ОДК) пестицидов в почвах. СанПиН 42-128-4275-87. – М.: Минздрав СССР, 1987. – 10 с.

73. Терехова В. А. Биотестирование почв: подходы и проблемы // В. А. Терехова / Почвоведение. — 2011. — № 2. — С. 190–198.

74. Тимофеева С. С. Использование биотестирования для оценки способов утилизации шламов сточных вод / С. С. Тимофеева, А. Э. Балаян // Эксперим. Водная токсикология. 1990. Вып.14. с.238-245.

75. Тюрин А. Н. Выбор тестов для оценки загрязнения морской среды / А. Н. Тюрин, Н. К. Христофорова // Междунар. совещ. по мор. биотестир. Владивосток, авг. 1994 // Биол. Моря. 1995. Т. 21, N 6. с.361-368.

76. Филов В. А. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I-IV групп / В. А. Филов – Химия, 1989. – 256 с.

77. Химическое загрязнение почв и их охрана: Словарь-справочник / Д.С. Орлов, М.С. Малинина, Г.В. Мотузова, Л.К. Садовникова, Т.А. Соколова. М.: Агропромиздат, 1991. –303 с.
78. Хоружая Т.А. К проблеме создания системы биотестирования уровня токсического загрязнения природных вод. Биотестир. в решении экол. пробл. / Зоол. ин-т РАН; – СПб, 1991. С.63-70.
79. Шеуджен А. Х. Биогеохимия / А. Х. Шеуджен – Майкоп: ГУРИПП «Адыгея», 2003. –1028 с.
80. Barber T.R., Chappie D.J., Duda D.J., Fuchsman P.C., Finley B.L. Using a spiked sediment bioassay to establish a no-effect concentration for dioxin exposure to the amphipod *Ampelisca abdita*. *Environ Toxicol Chem.* 1998. V. 17, N3. P.420-424.
81. Bloem J., Breure A.M. Microbial indicators // *Bioindicators and Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications.* – Elsevier Science, Oxford, 2003. – P. 259-282.
82. Bulich A. A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments // *Aquatic Toxicology: Proceedings of the Second Annual Symposium on Aquatic Toxicology.* – ASTM International, 1979.
83. De Groote J., Dumon G., Vangheluwe M., Jansen C. Environmental monitoring of dredging operations in the Belgian nearshore zone. *Terra ET aqua.* 1998. N 70. P.21-25
84. Efremenko E. N, Senko, O. V., Aleskerova, L. E., Alenina, K. A., Mazhul, M. M., & Ismailov, A. D. Biosensors based on the luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* immobilized in polyvinyl alcohol cryogel for the monitoring of ecotoxicants // *Applied biochemistry and microbiology.* – 2014. – T. 50. – №. 5. – С. 477-482.
85. Environmental A. Microtox-Acute Toxicity Basic Test Procedures // *Carlsbad, CA.* – 1995.

86. Jaworska J.S., Schowanek D., Feijtel T.C.J. Environmental risk assessment for trisodium [S, S] – ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applicatios. *Chemosphere*. 1999. V.38, N15. p. 3597-3625.
87. Kirby M.F., Blackburn M.A., Thain J.E., Waldock M.J. Assessment of water quality in estuarine and coastal waters of England and Wales using a contaminant concentration technique. *Mar.Pollut.Bull.* 1998. V.36, N8. P.631-642
88. Kobayashi N. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay, Wakayama prefecture, Japan, 1970-1987. *Environ. Manag.* In addition, Appropriate Use Enclos. Coast. Seas-EMECS'90: Int. Conf., Kobe, 3-6 Aug. 1990 // *Mar. Pollut. Bull.* 1990. V. 23. P.709-713.
89. Kratasyuk, V.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova, M.I. Gladyshev, E.B. Khromichek, A.M. Kuznetsov, E.A. Ivanova // *Chemosphere*, 2001. V.42, N8. - P.909-915.
90. Kratasyuk V.A., Gitelson J.I. Using of luminous bacteria in bioluminescent analysis. // *Uspekhi Microbiol.* 1987. V.21. P.3-30.
91. Lee J., Vysotski E.S. Structure and spectra in bioluminescence.
92. Lucan Bouche M.L., Biagianti Risbourg S., Habets F., Vernet G. Experimental study of the lethal effects induced by copper and lead on the *Oligochaeta Tubifex tubifex*. *BullSocZoolFr.* 1997. V. 122, N 4. P.389-392.
93. Nandakumar Renu, Mattiasson Bo. A microbial biosensor using *Pseudomonas putida* cells immobilised in an expanded bed reactor for the on-line monitoring of phenolic compounds. *Anal. Lett.* - 1999. - 32, № 12. - p. 2379-2393.
94. Patent 1134642 Canada, IPC C12Q1/66; G01N21/76. Pheromone detection system/ Inventor: Meighen Edward A; Applicant: Meighen Edward A, Priority date: 1980-06-23
95. Patent 1181800AA Japan, IPC C12Q1/66. Quantitative determination of hydrogen peroxide with luciferase / Applicant: Cardiogenic Inc. Gawad, Yahia, A., Priority date: 13.01.1988

96. Patent 2002048393A2 WO, IPC C12Q1/66. Light-activated in vitro assay process for luciferase bioluminescence / Applicant: Cardiogenics Inc. Gawad, Yahia, A., Priority date: 14.12.2001

97. Patent 200215765A Australia, IPC C12Q1/66. Light-activated in vitro assay process for luciferase bioluminescence / Applicant: CARDIOGENICS INC., Priority date: 14.12.2001

98. Patent 2004063165 United States, IPC C12Q1/66, G01N21/64, and G01N21/78. Light-activated in vitro assay process for luciferase bioluminescence/ Inventor: Gawad Yahia A; Applicant: Gawad Yahia A, Priority date: 2000-12-15

99. Patent 20060183177A1 United States, IPC C12Q1/66. Bioluminescent protease assay / Applicant: Promega Corp , Priority date: 02.02.2006

100. Patent 2328684A1 Canada, IPC C12Q1/66. Photon-triggered luminescent assay / Applicant: Cardiogenics In, Priority date: 15.12.2000

101. Patent 2431785 Canada, IPC C12Q1/66. Light-activated in vitro assay process for luciferase bioluminescence / Inventor: Gawad Yahia A; Applicant: Cardiogenics inch, Priority date: 2000-12-15

102. Patent 3660240A United States, IPC C12Q1/66. Flavin co-enzyme assay / Inventor: Chappelle Emmett W, Picciolo Grace L; Applicant: NASA, Priority date: 1969-05-05

103. Patent 4806415 United States, IPC C12Q1/00, C12Q1/04, and C12Q1/26. Method and system for determining the presence of adenosine triphosphate or flavin mononucleotide / Inventor: Rossetti Pero; Applicant: Miles in , Priority date: 1983-12-21

104. Patent 60218070AA Japan, IPC G01N33/50. Quantitative determination of hydrogen peroxide by bacterial luciferase / Applicant: Toyobo Co Ltd, Priority date: 12.04.1984

105. Patent 7148030 United States, IPC C07D277/66, C07K14/435, and C07K19/00. Bioluminescent protease assay / Applicant: O'Brien Martha Wood Keith V., Priority date: 2002-02-01

106. Rodrigues E. S., de Aragão Umbuzeiro G. Integrating toxicity testing in the wastewater management of chemical storage terminals—A proposal based on a ten-year study // *Journal of hazardous materials*. – 2011. – Т. 186. – №. 2-3. – С. 1909-1915.

107. Rettberg P., Bandel K., Baumstark-Khan C., Horneck G. 03.08-04Д2.484. Повышение чувствительности SOS-LUX теста для обнаружения гидрофобных генотоксичных веществ с использованием в качестве штамма - хозяина *Salmonella typhimurium* TA1535. *Anal. Chin. Acta.* - 2000. - 426, № 2. - р. 167 - 173. - Англ.

108. Tu S.C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases / S.C. Tu // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2007. — №7.

109. Waring C.P., Moore A. Sublethal effects of a carbamate pesticide on pheromonal mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L) parr. *Fish Physiol Biochem.* 1997. V.17, N 1-6. P.203-211.

110. Zhou Y., Wang R., Li L., Xia X., Sun Inferring functional linkages between proteins from evolutionary scenarios // *Journal of molecular biology* – 2006. - V. 359 (416). – P. 1150–1159

111. Zhang T., Jing H.J. Use of duckweed (*Lemna minor* L.) growth inhibition test to evaluate the toxicity of acrylonitrile, sulphocyanic sodium and acetonitrile in China. *EnvironPollut.* 1997. V.98, N 2. P.143-147.

## Приложение

Таблица 1 - Результаты лабораторных анализов почвенных образцов

[Изъята 1 таблица]

## **Приложение Б**

Таблица 2 - Результаты люминесцентного биотестирования и количество подвижной меди в загрязненных образцах

[Изъята 1 таблица]



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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В. А. Кратасюк В. А. Кратасюк

подпись

« 14 » 06 20 18 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Диагностическая значимость биферментной биоломинесцентной системы в  
выявлении загрязнения почвы

03.04.02 Физика

03.04.02.01 Биофизика

Научный руководитель

А. А. Шпедт  
подпись, дата

профессор, д.с.-х.н.

А. А. Шпедт

Выпускник

В. С. Матвиенко  
подпись, дата

В. С. Матвиенко

Рецензент

О. А. Сорокина  
подпись, дата

профессор, д.б.н.

О. А. Сорокина