

ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ

**ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ  
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БИОТЕСТОВ  
В СИСТЕМЕ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
МИКРОЭЛЕМЕНТОВ**

**POSSIBILITIES AND RESTRICTIONS  
OF BACTERIAL LUMINESCENT BIOTESTS  
FOR TRACE ELEMENTS BIOACTIVITY RESEARCH**

*Д.Г. Дерябин \**

*D.G. Deryabin \**

ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет»

Orenburg State University, Orenburg, Russia

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** микроэлементы, биолюминесцентный анализ, биотоксичность, специфичное определение, механизмы действия.

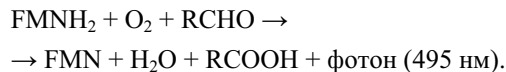
**KEYWORDS:** trace elements, bioluminescent analysis, biotoxicity, specific quantification, mechanism-specific biotests.

**РЕЗЮМЕ.** Систематизированы представления об аналитических возможностях бактериальных люминесцирующих тест-систем при оценке биологической активности микроэлементов. Обсуждено использование сенсорных тест-систем с конститутивным типом свечения при оценке интегральной токсичности (биотоксичности) отдельных химических элементов и их смесей. Приведены данные об индуцируемых люминесцирующих биотестах, характер генетической организации которых позволяет относительно специфично детектировать присутствие некоторых металлов, а также анализировать механизмы их воздействия на клетки-мишени.

**ABSTRACT.** The analytical possibilities of bacterial luminescent test systems for trace elements researches are systematized and discussed. The «lights-off» sensors supplied with constitutive expressed luminescent genes are positioned as instruments for an integrated toxicity (biotoxicity) estimation of separate chemical elements and their mixes. The inducible «lights-on» sensors carried specific promoters operably linked to the luminescent genes give the chance for specific elements quantification also as mechanism-specific biotests.

**ВВЕДЕНИЕ**

Биолюминесценция – свечение, возникающее в результате протекания специфических биохимических реакций в живых организмах, достаточно широко представлено на разных уровнях организации живой материи. У бактерий (Meighen, 1991) этот процесс сопровождается потреблением кислорода и в наиболее общем виде может быть представлен как окисление восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>) до FMN с одновременным окислением длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) до соответствующей жирной кислоты (RCOOH):



Ферменты, катализирующие данную реакцию, носят общее название «люциферазы», а в соответствии с международной номенклатурой рассматриваются как щелочные FMN-зависимые монооксигеназы (E.C.1.14.14.3). У различных бактериальных видов они имеют сходное строение и представляют собой белковые α/β-гетеродимеры с молекулярной массой 76 ± 4 кДа, кодируемые генами *luxA* и *luxB* соответственно.

Стабильность световой эмиссии во времени требует непрерывного возобновления субстратов реакции биолюминесценции, для чего в бактери-

\* Адрес для переписки:

Дерябин Дмитрий Геннадьевич

E-mail: dgderyabin@yandex.ru

альных клетках имеются две основные вспомогательные ферментные системы, первая из которых снабжает люциферазу восстановленными формами флавиномононуклеотида, а вторая ответственна за регенерацию альдегидов из соответствующих жирных кислот. За первый из этих процессов ответственна кодируемая геном *luxG* NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза (ЕС 1.6.99), формирующая с люциферазой единую электроннотранспортную цепь и обеспечивающая последнюю восстановленным флавиномононуклеотидом (FMNH<sub>2</sub>), который возникает в процессе восстановления FMN за счет энергии NAD(P)H. В свою очередь для обеспечения люциферазы длинноцепочечным альдегидом необходима активность трех последовательно действующих ферментов: ацилтрансферазы (ЕС 2.3.1) с молекулярной массой 33 кДа; лигазы (синтазы) длинноцепочечных жирных кислот (ЕС 6.2.1.19) с молекулярной массой 42 кДа и ацил-СoА-редуктазы (ЕС 1.2.1.50) с молекулярной массой 54 кДа. При этом названные белки кодируются генами *luxE*, *luxD* и *luxC* соответственно, а каждый из них в количестве четырех идентичных копий формирует единый мультиферментный комплекс восстановления жирных кислот.

Понимание описанных выше механизмов функционирования и генетического контроля биолюминесценции было положено в основу создания и практического использования бактериальных люминесцирующих тест-систем, использующих свечение в качестве результативного параметра проводимого аналитического исследования (Дерябин, 2009). При этом на основе характера экспрессии *lux*-генов и контролируемого ими свечения подобные системы могут быть принципиально разделены на две основные группы:

1) так называемые «сенсорные» тест-системы (англ. «lights-off» sensors), действующим началом которых являются природные или рекомбинантные микроорганизмы с конститутивной экспрессией *lux*-генов. В подобном случае интенсивность свечения отражает структурно-функциональную состоятельность изначально присутствующей в бактериальных клетках люминесцентной системы, активность которой может угнетаться в результате нарушения энергетического обеспечения или разобщения при разрушении самой бактериальной клетки. Соответственно, основным направлением использования сенсорных тест-систем является интегральная оценка комплексного токсического воздействия макро- и микроэлементов на люминесцирующую бактериальную клетку;

2) так называемые «репортерные» тест-системы (англ. «lights-on» sensors), действующим началом которых являются рекомбинантные микроорганизмы с индуцибельной экспрессией *lux*-генов, клонированных под контролем различных промоторов. Исходный уровень свечения подобных тест систем минимален, но многократно возрастает при появлении в среде культивирования

фактора, активирующего соответствующий промотор. Результатом является специфичная по отношению к воздействию фактору индукция свечения, каковая может быть использована для детекции определенных металлов (микроэлементов), а также оценки механизмов их действия в отношении бактериальных клеток-мишеней.

### СЕНСОРНЫЕ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ БИОТЕСТЫ

Исторически первой коммерчески доступной сенсорной тест-системой стал «Microtox», разработанный на рубеже 70–80-х годов XX века и до настоящего времени выпускаемый фирмой AZUR Environmental (США). Его основу составляет природный морской изолят *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, свечение которого демонстрирует высокую чувствительность к широкому спектру химических веществ и соединений (Johnson, 2005). Признание данного биотеста в качестве важного инструмента токсикологических исследований закреплено международной системой контроля качества ISO №11348 «Water Quality - Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria Test)», в связи с чем именно он получил столь широкое распространение в странах Западной Европы и Северной Америки. Необходимость стандартизации подобного рода исследований также привела к тому, что европейские аналоги данной сенсорной тест-системы «ToxAlert» (Merk, Германия), «LUMISTox» (Dr. Lange, Великобритания) и «BioTox» (Aboatox Oy, Финляндия) в качестве действующего начала также используют *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (табл. 1).

Другой сенсорной люминесцирующей тест-системой, на этот раз получившей только региональное распространение, явился «ToxScreen», производимый компанией CheckLight LTD (Израиль). Его особенностью явилось использование иного оригинального штамма *Photobacterium leiognathi* Eilat-1, выделенного из воды Красного моря возле курортного местечка Эйлат (Ulitzur et al., 2002). При этом преимуществами названного микроорганизма по сравнению с упомянутым выше *V. fischeri* NRRL B-11177 являлась несколько более высокая чувствительность, позволяющая на уровнях ниже 1 мг/л, обнаруживать присутствие в воде широкого круга химических веществ, включая тяжелые металлы, пестициды и нефтепродукты. Дополнительной особенностью *P. leiognathi* Eilat-1 являлся достаточно широкий температурный диапазон для проведения исследований (18–27 °С), что создало возможность для дискриминации токсических эффектов тяжелых металлов и органических веществ. Сказанное базируется на наблюдениях о том, что при повышении температуры чувствительность сенсорного микроорганизма к металлам возрастает, а к органическим соединениям, напротив, снижается.

Кроме того, в состав коммерческой тест-системы «ToxScreen» входят два оригинальных буферных раствора (Pro-Metal и Pro-Organic), первый из ко-

торых обеспечивает преимущественное выявление присутствия в среде катионов тяжелых металлов, а второй – органических соединений.

Таблица 1. Сенсорные бактериальные люминесцирующие тест-системы

Коммерческое название	Производитель	Индикаторный микроорганизм	Соответствие нормативам
Microtox	AZUR Environmental, США	<i>Vibrio fischeri</i> NRRL B-11177	ISO №11348
ToxAlert	Merk, Германия	То же	То же
LUMIStox	Dr. LANGE, Великобритания	То же	То же
BioTox	Aboatox Oy, Финляндия	То же	То же
ToxScreen	CheckLight LTD, Израиль	<i>Photobacterium leiognathi</i> Eilat-1	–
Микробиосенсор В17-677F	ИБСО РАН, Россия	<i>Photobacterium phosphoreum</i> В17-677F	–
Эколюм	МГУ им. М.В. Ломоносова, ОАО «Иммунотех», Россия	<i>Escherichia coli</i> с <i>lux</i> -оперонами <i>V.fischeri</i> , <i>P.leiognathi</i> или <i>P.luminescence</i>	MP № 01.018-07, № 01.019-07, № 01.020-07, № 01.021-07*

Примечание: \* – методические рекомендации ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В свою очередь, на территории бывшего СССР аналогичный биотест, основанный на использовании природного изолята *Photobacterium phosphoreum* В17-677F, был разработан в Институте биофизики Сибирского отделения Российской Академии наук, где до настоящего времени выпускается в виде коммерчески доступного препарата «Микробиосенсор В17-677F» (Medvedeva et al., 2009). Однако по ряду причин наибольшее распространение в современной России получила тест-система «Эколюм» (от рус. – экологическая люминометрия), разработанная сотрудниками МГУ им. М.В. Ломоносова и использующая в качестве действующего начала генноинженерные конструкции на основе хозяйского штамма *Escherichia coli* K12 TG1 с клонированными в векторных плаزمидях *pBR322*, *pUC19* или *pUC18* полными *luxCDABE*-оперонами *Vibrio fischeri* 6, *Photobacterium leiognathi* 54D10 или *Photobacterium luminescence* ZM1 (Данилов и др., 2002). Начиная с 2000 г., реализуемые с их использованием технологии биотестирования получили нормативную поддержку со стороны Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ (ныне – Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека).

Конкретная процедура биотестирования с использованием каждой из перечисленных выше сенсорных тест-систем описывается в инструкциях по их применению. В то же время все они основаны на едином принципе – выявлении интенсивности тушения бактериальной биолюминесценции, выраженность которого прямо пропорциональна развивающемуся токсическому эффекту. Кроме того, реализуемые с их использованием технологии имеют ряд универсальных этапов, наиболее общими из которых являются: (1) подготовка люминесцирующего бактериального биосенсора с проверкой его светимости, а также реакции на стандартное (эталонное) химическое воздействие; (2) контакт биосенсора с тестируемым веществом, смесью соединений или водной вытяжкой из объектов окружающей среды; (3) оценка интенсивности свечения в опытных и контрольных пробах с последующим расчетом величин, характеризующих детектированный в эксперименте уровень биотоксичности. В частности, часто употребляемой величиной является индекс токсичности, при его определении в ряду концентраций дополнительно позволяющий провести расчет параметра  $EC_{50}$  (от англ. – effective concentration), под которым в данном случае по-

нимается количество химического вещества, вызывающего тушение свечения сенсорного микроорганизма на 50% по сравнению с контролем.

За более чем 30-летний период использования сенсорные люминесцирующие тест-системы хорошо зарекомендовали себя при исследованиях качества природных, промышленных и сточных вод, почвы и донных осадков, а также определении степени токсичности индивидуальных веществ и соединений. Так библиография по различным аспектам использования только тест-системы «Microtox» к настоящему времени составляет около 1400 источников. Одновременно многочисленные, в том числе многоцентровые исследования сходятся на том, что проведение биотестирования с использованием описанных выше тест-систем оказывается наиболее чувствительным, быстрым, простым и экономичным подходом, одновременно демонстрирующим высокую степень корреляции с показателями токсичности, полученными с использованием более сложных моделей. В частности, в ставшей классической работе К.Л.Е. Kaiser (1998) подтверждается высокий уровень корреляции между значениями токсичности, характеризуемыми величинами  $EC_{50}$  для *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 и  $LD_{50}$  – дозами, вызывающими летальный эффект в отношении 50% взятых в опыт одноклеточных или многоклеточных организмов. При исследовании нескольких сотен химических веществ были установлены значительные совпадения токсичности для многих водных организмов, включая различные виды рыб, дафний, простейших и водорослей. На этом фоне аналогичные корреляции с данными, полученными на млекопитающих (мышах и крысах), были несколько слабее, но сохраняли высокую степень соответствия с результатами биолюминесцентного анализа. Достаточно интересен и тот факт, что качество соответствий значений  $EC_{50}$  повышалось в ряду  $LD_{50}$ , определенных при пероральном → внутрибрюшинном → внутривенном введении токсикантов.

Иллюстрацией сказанного является публикуемое в настоящем номере журнала сообщение Т.Д. Дерябиной (Дерябина, 2013), посвященное использованию люминесцирующей тест-системы «Эколюм» в системе оценки токсичности ионов, нано- и микрочастиц металлов. При этом в сравнении с биотестами на растениях и животных сенсорные люминесцирующие микроорганизмы оказались более чувствительными к действию анализируемых соединений меди, а с другой – продемонстрировали сходную с ними тенденцию реагирования, свидетельствующую о росте токсичности в ряду «микрочастицы → наночастицы → ионы».

Одновременно, применительно к задаче оценки биологической активности микроэлементов, необходимо указать на неспецифический характер реагирования сенсорных люминесцирующих тест-систем, оценивающих только сам факт наличия/отсутствия токсического воздействия с учетом возмож-

ных аддитивных эффектов, но безотносительно природы химического фактора. В случае исследования известных по химическому составу веществ и их смесей это не является серьезным ограничением, в то время как при работе с предварительно неохарактеризованными образцами требует последующей оценки природы токсичного фактора с использованием методов химического анализа.

### РЕПОРТЕРНЫЕ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ БИОТЕСТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МЕТАЛЛОВ

Альтернативное решение задачи специфического реагирования люминесцирующих тест-систем на отдельные химические элементы (группы элементов) стало возможным с развитием методов генетической инженерии, в том числе позволяющих клонировать *lux*-гены под различными регуляторными и промоторными участками. В частности, в подобном качестве могут быть использованы регуляторы и промоторы генов, вовлекаемых в ответ бактериальной клетки на тяжелые металлы и специфически индуцируемых только при наличии определенного вида химического воздействия. Их интеграция непосредственно перед *lux*-генами ведет к тому, что в отсутствие детектируемых факторов транскрипция не происходит, вследствие чего подобные генетические конструкции характеризуются нулевым или чрезвычайно низким (фоновым) уровнем свечения. В свою очередь при появлении в среде анализируемого фактора происходит его взаимодействие с белком-регулятором соответствующего промотора, следствием чего является запуск транскрипции *lux*-генов, сопровождающийся закономерным развитием свечения. Тем самым подобные «репортерные» люминесцирующие тест-системы (в качестве репортеров используются *luxCDABE* гены), позволяют оценивать биологическую активность не по тушению, но по стимуляции уровня свечения, выраженность которой демонстрирует достаточно строгую пропорциональность интенсивности химического воздействия. При этом важнейшими параметрами подобных биосенсоров являются пороговая чувствительность (минимальная концентрация анализируемого вещества, вызывающего индукцию биолюминесценции), а также амплитуда ответа (кратность увеличения свечения по сравнению с интактным контролем).

Первый репортерный люминесцирующий биосенсор был разработан для детекции ионов ртути (Selifonova et al., 1993), а в современной России им стал созданный сотрудниками ГосНИИгенетики *lux*-биосенсор для детекции ионов мышьяка (Расторгуев, Завильгельский, 2001). Основу последнего составил рекомбинантный штамм *E. coli* K12 TG1, несущий гибридную плазмиду *pArsR::lux*, в которой транскрипция кодирующей бактериальную люциферазу *luxAB*-генов осуществляется с промотора *ars*-оперона. В обычных ус-

ловиях последние обеспечивают устойчивость микроорганизмов к солям мышьяка и, как правило, состоят из пяти генов *arsRDABC*. Среди их продуктов белок ArsR выполняет регуляторные функции и обеспечивает репрессию *ars*-оперона, снимаемую в присутствии  $AsO_2^-$ . В составе же гибридной плазмиды ген *arsR* встроен перед каскадом из *luxAB* или *luxCDABE*-генов *P. Luminescence*, в результате чего появление в среде метарсенита в концентрации от  $10^{-10}$  М и выше ведет к выраженному росту интенсивности свечения.

К настоящему времени на этой основе разработана уже целая линейка репортерных люминесцирующих тест-систем (Corbisier et al., 1999; Ivask et al., 2009), ориентированных на детекцию не только ртути и мышьяка, но и Cd, Sb, Cu, Ag, Co, Ni и Cr (табл. 2). При этом в большинстве случаев в качестве «хозяйского» штамма названные биотесты используют *Escherichia coli*, а также другие гамма-протеобактерии родов *Pseudomonas*, *Ralstonia* или *Alcaligenes*, что в трех последних случаях ориентировано на проведение исследований в почвенных образцах. Однако, несмотря на тот факт, что чувствительность таких тест-систем достаточно часто оказывается сравнимой с таковой у методов химического анализа, только некоторые из них доведены до состояния коммерчески доступных препаратов (пример – тест система «БИОМЕТ», VITO, Бельгия) и пока еще не получили широкого нормативного закрепления.

Одной из причин подобной ситуации является то, что достижение пропорциональности между концентрацией действующего элемента и интенсивностью биоллюминесценции оказывается возможным только в определенном диапазоне концентраций – обычно около трех порядков. При этом данный диапазон, с одной стороны, ограничен минимальной пороговой действующей концентрацией металла, уже «распознаваемой» бактериальным биосенсором, а с другой – его максимальным содержанием, обеспечивающим максимальную индукцию биоллюминесценции, но не вызывающим

прямого токсического эффекта. В свою очередь дальнейшее увеличение присутствия металла ведет к системному подавлению дыхания и метаболизма бактериальной клетки, без чего развитие биоллюминесценции оказывается невозможным. В результате подобный конфликт «индукция/ингибирование» определяет тот факт, что один и тот же уровень светимости репортерного штамма может соответствовать двум различным (низкой и высокой) концентрациям определяемого вещества, тем самым затрудняя интерпретацию получаемых результатов, а для ее прояснения требуя развернутого исследования анализируемых образцов в широком диапазоне разведений.

Другое ограничение данного метода определяется тем, что репортерные люминесцирующие микроорганизмы обладают не абсолютной, но относительной специфичностью к детектируемым металлам. Естественная природа этого ограничения связана с тем, что бактерии используют универсальные детерминанты устойчивости не к одному, но к нескольким металлам, обычно расположенным в одном столбце (группе) таблицы Менделеева. В частности, основанные на *mer*-оперонах биосенсоры, помимо ртути, отвечают развитием биоллюминесценции и в присутствии Cd; генетические конструкции на основе *ars*-оперона помимо мышьяка индуцируются и Sb и т.д. (см. табл. 2). Одновременно внутри группы подобная реакция достаточно часто возрастает сверху вниз, что соответствует представлениям об увеличении у детектируемых элементов «металлических» свойств.

Важным достоинством описываемых подходов является то, что они позволяют количественно охарактеризовать не столько сам факт присутствия какого-либо металла, сколько оценить его биологически активную (бiodоступную) фракцию. В этой связи химические и микробиологические методы анализа следует рассматривать не как альтернативные, но взаимодополняющие, в совокупности позволяющие получить развернутое представление

Таблица 2. Некоторые репортерные люминесцирующие тест-системы, используемые для специфической детекции тяжелых металлов

Металл(ы)	Биосенсор: хозяйский штамм / репортерная система	Пороговая чувствительность	Амплитуда ответа, отн. ед.
Hg, Cd	<i>E. coli</i> OS8 pDN merRBSB Pmer:: <i>lux</i>	$10^{-9}$ М Hg	200
	<i>P. fluorescens</i> OS8::Kn merRBSB Pmer:: <i>lux</i>	$3 \times 10^{-9}$ М Hg	400
As, Sb	<i>E. coli</i> pArsR:: <i>lux</i>	$10^{-11}$ М As	500
Cu, Ag	<i>E. coli</i> copAp:: <i>lux</i>	$10^{-7}$ М Cu	100
	<i>P. fluorescens</i> OS8::Kn cueRРcopA:: <i>lux</i>	$5 \times 10^{-5}$ М Cu	7
Co, Ni	<i>R. eutropha</i> CH34 pMOL1550 cnrYXH:: <i>lux</i>	$10^{-7}$ М Co	>20
Cr	<i>A. eutrophus</i> AE2440 chrBΔchrA:: <i>lux</i>	$4 \times 10^{-5}$ М Cr	20

как о суммарном содержании, так и степени биодоступности учитываемых элементов. Кроме того, биотесты на основе репортерных люминесцирующих бактерий представляются чрезвычайно удобным, быстрым, высокочувствительным и экономичным инструментом скрининга антидотов, ориентированных на предотвращение или ослабление токсического эффекта тяжелых металлов в живых системах. В частности, подобная возможность рассматривается в публикуемой в настоящем номере журнала статье Е.С. Алешиной с соавт. (Алешина и др., 2003), посвященной использованию оригинального штамма *E.coli* pMerR::lux для оценки антиоксидантных свойств дитиолпропансульфоната натрия (унитиола) в условиях экспериментальной интоксикации сулемой.

### РЕПОРТЕРНЫЕ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ БИОТЕСТЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Еще более перспективными и не имеющими альтернативы со стороны химических методов анализа являются реализуемые с использованием репортерных люминесцирующих тест-систем методы выявления и количественной оценки механизмов биологической активности химических веществ и соединений, связанных с воздействием на определенные структурно-функциональные подсистемы бактериальных клеток. При этом их основу составляет интеграция *lux*-генов с промоторами так называемых «стрессовых оперонов», специфически индуцируемых при соответствующих повреждающих воздействиях (табл. 3).

Так в основу выявления мембраноповреждающего действия тестируемых факторов предложена оценка в активности гена *fabA*, кодирующего в бактериальных клетках ключевой фермент синтеза несатурированных жирных кислот бета-гидроксидеканоил-АСР-дегидраза. Соответственно, слияние промотора гена *fabA* с кассетой *luxCDABE*-генов *Vibrio*

*fischeri* и их клонирование в мультিকопийной плазмиде позволило создать достаточно чувствительный генноинженерный штамм *Escherichia coli*, реагирующий индукцией свечения при контакте с разнообразными мембранотропными химическими соединениями (Bechor et al., 2002).

Другой группой воздействий, детектируемых с использованием репортерных люминесцирующих тест-систем, являются различные физические и химические факторы, обуславливающие повреждение функциональных белковых структур бактериальной клетки. Последняя в свою очередь реагирует на подобные воздействия образованием относительно небольших молекул – шаперонов и шаперонинов, при взаимодействии с белками, стабилизирующими их третичную структуру, и предотвращая процессы агрегации. В частности, к ним относятся белки IbpA и IbpB. Первый из них обладает самостоятельной способностью к формированию внутриклеточных профиламентов, образование которых блокируется при взаимодействии с агрегированными белками или кошапероном IbpB. Существование подобных молекулярных механизмов было положено в основу репортерного люминесцирующего штамма *E.coli*, несущего полную кассету *luxCDABE*-генов *P.luminescence*, клонированных под промотором гена *ibpA* (Манухов и др., 2009).

Возможность выявления и количественной оценки окислительного стресса основана на клонировании репортерных *lux*-генов под промоторами стрессовых генов, индуцируемых при появлении в клетке активных форм кислорода и ответственных за их нейтрализацию. Так, один из первых люминесцирующих биосенсоров, позволяющих детектировать развитие окислительного стресса, был создан на основе рекомбинантного штамма *Escherichia coli* DPD2511, несущего плазмиду с *luxCDABE*-генами морского люминесцирующего микроорганизма *Vibrio fischeri*, перед которыми был интегрирован промотор гена *katG* (Belkin et al., 1996). При этом данный штамм характеризовался чрезвычайно слабым исходным уровнем свечения,

Таблица 3. Некоторые репортерные штаммы *Escherichia coli*, несущие гены люминесценции, клонированные под различными «стрессовыми» промоторами

Ген, под промотором которого клонированы <i>lux</i> -гены	Функция гена (синтезируемый продукт)	Оцениваемое воздействие
<i>fabA</i>	Бета-гидроксидеканоил-АСР-дегидраза	Повреждение мембран
<i>ibpA</i>	Шаперон IbpA	Повреждение белков
<i>katG</i>	Каталаза	Окислительный стресс
<i>soxS</i>	Транскрипционный активатор	Окислительный стресс
<i>recA</i>	Регуляторный белок RecA – активатор SOS-ответа	Повреждение ДНК

каковой мог быть многократно повышен в присутствии перекиси водорода, органических пероксидов и пероксид-продуцирующих ферментных систем. Продолжение исследований в данном направлении привело к созданию целой линейки репортерных люминесцирующих бактерий, основанных на слиянии касет *lux*-генов с промоторами вовлеченных в развитие окислительного стресса генов *sodA*, *pqi-5*, *soxR*, *fumC*, *soxS*, *inaA*, *hmp*, *malK*, *katG*, *zwf*, *fpr* или *pgi* (Lee et al., 2009). При этом исследование количественных характеристик реагирования подобных микроорганизмов на метилвиологен (паракват), а также иные индукторы образования супероксиданиона позволило продемонстрировать наиболее выраженную индукцию свечения генетической конструкции на основе промотора регуляторного гена *soxS*.

Наконец еще одна уникальная возможность, предоставляемая использованием специфически реагирующих люминесцирующих тест-систем, связана с выявлением так называемых «генотоксикантов» – веществ, способных напрямую взаимодействовать с ДНК и вызывать ее мутационные повреждения. Предложенный подход к биолуминесцентному тестированию генотоксичности заключается в сопряжении *lux*-генов с промоторами SOS-системы, находящейся под контролем белков RecA (активатор) и LexA (репрессор), управляющих экспрессией более 20 генов, активирующихся при повреждении ДНК и обеспечивающих ее эффективную репарацию. В частности, на данной основе был сконструирован рекомбинантный штамм *E.coli* C600, несущий плазмиду pPLS-1, в которой промотор вовлеченного в SOS-ответ гена вшит перед лишенным собственного промотора *lux*-опероном *P.leiognathi* (Птицын, 1996). В результате микромолярные концентрации генотоксикантов индуцируют дозозависимое увеличение уровня свечения данного штамма и его аналогов с возможностью выявления веществ, реализующих самые разные механизмы повреждения ДНК.

Ранее панель репортерных люминесцирующих биосенсоров была использована нами для сравнительного исследования механизмов биологической активности ионов, нано- и микрочастиц меди (Дерябин и др., 2013). В настоящем номере журнала аналогичный подход реализован в статье И.Ф. Каримова с соавт. (Каримов и др., 2013), что позволило получить новые данные о природе биологической активности ионов  $Fe^{2+}$ , связав их с развитием окислительного стресса и ассоциированного с этим повреждением ДНК бактериальных клеток-мишеней.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность приведенных данных позволяет констатировать достаточно широкие аналитические возможности бактериальных люминесцирующих тест-систем при оценке интегральной токсичности и биологической активности широ-

кого круга веществ и соединений. Корректное использование основанных на данном принципе методических инструментов с учетом особенностей выполняемых биотестов и их возможных ограничений представляется информативным подходом, в совокупности с современными методами физико-химического анализа и биотестами более высокого уровня организации, позволяющим получить развернутое и комплексное представление о распространении, биодоступности и механизмах биоактивности микроэлементов.

## ЛИТЕРАТУРА

Алешина Е.С., Манухов И.В., Дюзельбаева А.С. Токсичность ионов  $Hg_2^{+}$  и антиоксидантная активность унитиола, выявляемые с использованием бактериальных люминесцирующих биотестов // Микроэлементы в медицине. 2013. Т. 14. № 2. С.

Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошиников Г.Е. и др. Сенсорные биолуминесцентные системы на основе *lux*-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник Московского университета. Сер. 16: Биология. 2002. № 3. С. 20–24.

Дерябин Д.Г. Бактериальная биолуминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. 246 с.

Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Васильченко А.С. и др. Исследование механизмов антибактериальной активности наночастиц меди в тестах на люминесцирующих штаммах *Escherichia coli* // Российские нанотехнологии. 2013. Т. 8. № 5–6. С. 113–118.

Дерябина Т.Д. Токсичность ионов, нано- и микрочастиц меди в биотестах различного уровня организации // Микроэлементы в медицине. 2013. Т. 14. № 2. С.

Каримов И.Ф., Субботина Т.Ю., Каримова Д.Н. Оценка механизмов биологической активности ионов железа (II) с использованием бактериальных люминесцирующих тест-систем // Микроэлементы в медицине. 2013. Т. 14. № 2. С.

Манухов И.В., Котова В.Ю., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса. // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25.

Птицын Л.П. Биолуминесцентный анализ SOS-ответа клеток *Escherichia coli* // Генетика. 1996. Т. 32. № 3. С. 354–358.

Расторгуев С.М., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсор для детекции ионов мышьяка // Биотехнология. 2001. № 2. С. 77–82.

Bechor O., Smulski D.R., Van Dyk T.K. et al. Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants detection by *Escherichia coli* bearing *fabA':lux* fusions // J. Biotechnol. 2002, 94(1):125–132.

Belkin S., Smulski D.R., Vollmer A.C., et al. Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG':lux* fusion // Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62(7):2252–2256.

- Corbisier P., Lelie D. van der, Borremans B., et al.* Whole cell- and protein-based biosensors for the determination of bioavailable heavy metals in environmental samples // *Anal. Chim. Acta.* 1999, 387:235–244.
- Ivask A., Rolova T., Kahru A.* A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing // *BMC Biotechnology.* 2009, 9:41
- Johnson B. T.* Microtox acute toxicity test // *Small-scale freshwater toxicity investigations toxicity test methods.* 2005, 1:69–105.
- Kaiser K.L.E.* Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // *Environmental Health Perspectives.* 1998, 106(2):583–591.
- Lee H.J., Youn C.H., Kim B.C., Gu M.B.* An oxidative stress-specific bacterial cell array chip for toxicity analysis // *Biosensors and Bioelectronics.* 2007, 22(9–10):2223–2229.
- Medvedeva S.E., Tyulkova N.A., Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K.* Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria // *Journal of Siberian Federal University. Biology.* 2009, 4(2):418–452.
- Meighen E.A.* Molecular biology of bacterial bioluminescence // *Microbiol. Rev.* 1991, 55(1):123–142.
- Selifonova O., Burlage R., Barkay T.* Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59(9):3083–3090.
- Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N.* A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity // *Environmental Toxicology.* 2002, 17(3):291–296.