

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ДЕЯКИХ ВОДНИХ ОРГАНІЗМІВ З УМОВАМИ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНОГО БІОТЕСТУВАННЯ

О. С. ГОЙСТЕР¹, Г. О. ХМЕЛЬНИЦЬКИЙ²

¹ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

² Національний університет біоресурсів та природокористування, Київ

E-mail: gojsterO@ukr.net

В огляді подано критичний аналіз методології біотестування токсичності водного середовища на основі таких тест-об'єктів, як дафнії та світні бактерії. Розглянуто деякі особливості обміну речовин водних організмів у токсичному середовищі з метою теоретичного обґрунтування закономірностей тісного зв'язку їхньої життєдіяльності з умовами люмінесцентного тестування.

Ключові слова: дафнії, світні бактерії, хемі-, біолюмінесценція, метаболізм, токсиканти.

Сильною стороною розвитку сучасної аналітичної біотехнології в Україні є глибокий аналіз природних явищ із суто наукових позицій та спрямованість на вирішення нагальних потреб сьогодення під час розроблення методів експресного виявлення речовин, токсичних для живих організмів. Одним із перспективних шляхів підвищення інформативності й достовірності аналітичного контролю загального забруднення об'єктів довкілля є біотестування. Аналітичними індикаторами у методах біотестування виступають біологічні об'єкти та їхня реакція на дію хімічних агентів, яка є інтегральною оцінкою дії фізіологічно активних форм досліджуваної речовини.

Вплив хімічних речовин на організм дуже різноманітний і визначається не тільки хімічною природою та концентрацією речовини-забруднювача, а й спрямованістю її дії на ті чи інші системи та функції організму, особливостями метаболізму останнього, рівнем складності організації, резистентністю до токсичних речовин та іншими факторами. Чим складнішим є організм, тим більша кількість його життєвих функцій зазнає впливу токсиканта, причому різні функції мають неоднакові індикаторні характеристики. Реакція організму на дію

токсиканта з огляду на можливість її застосування в аналітичній практиці має бути висококучливою, мати досить чітку інтерпретацію, простий та зручний спосіб реєстрації.

Сьогодні для вирішення проблем аналізу токсичності природних систем гідним уваги виглядає поєднання біологічних та інструментальних методів на основі біо- та хемілюмінесценції. Для того щоб мати можливість чітко інтерпретувати та передбачати результати люмінесцентного аналізу, потрібні дослідження зв'язку «структура речовини — фізико-хімічні властивості — механізми впливу на біологічні системи — біологічний ефект — біотестування».

Успішне вирішення цього завдання дасть змогу проводити скринінг токсичності середовища з різним ступенем складності організації з використанням модельних ксенобіотиків і дозволить дати рекомендації щодо необхідності проведення подальшого хімічного аналізу для визначення основних забруднювачів та застосування заходів очищення від них середовища.

Метою цього огляду було створити теоретичне підґрунтя для глибокого і різнобічного вивчення метаболічних процесів тест-об'єктів, які використовують у сучасних методах біотестування.

Теоретичні аспекти токсикологічного тестування водних розчинів на основі *Daphnia magna* Straus

Загальні закономірності реагування гідробіонтів (водних організмів) на вплив токсичних речовин

Присутність гідробіонтів сприяє насиченню води вуглекислою, поглинанню кисню, зсуву карбонатної рівноваги та рН середовища. З одного боку, в таких умовах розчинені іони можуть взаємодіяти один з одним з утворенням нерозчинних осадів або нейтральних (нетоксичних або малотоксичних) сполук. А з другого — катіони здатні утворювати з органічними речовинами, що їх виділяють гідробіонти, комплексні сполуки типу хелатів, які нейтралізують і створюють буферність середовища [1].

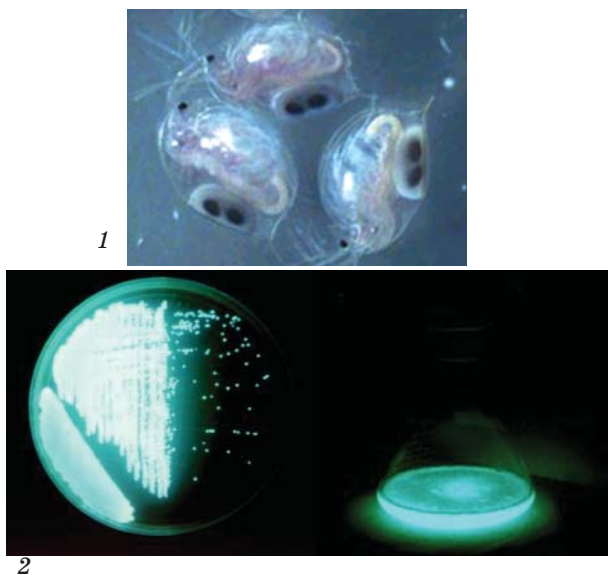


Рис. 1. Морський мешканець *Daphnia magna* Straus (1) та морські світні бактерії (2)

Жива система характеризується множинністю реагування і містить такі компоненти, як гомеостатичне врівноваження, буферизація, системи депонування та зв'язування токсикантів тощо. Кінцева картина, що формується в результаті взаємодії гідробіонтів (та інших живих організмів) з токсикантами, не рівнозначна і зумовлена двома основними факторами: силою впливу токсиканта, яка залежить від його хімічної природи, біологічної активності, концентрації, тривалості й повторності впливу — з одного боку, та особливостями реагування живих організмів на цей вплив — з другого. Без сумніву, будь-яка речовина за достатньо високих концентрацій може впливати на гідробіонтів, виявляючи ушкоджувальний та пригнічувальний вплив. Токсикологічні дослідження на дафніях, проведені

Є. П. Щербань, показали, що небезпека для гідробіонтів зумовлена на перших етапах механічним засміченням фільтраційного апарату, осіданням на тілі та антенах ракоподібних, далі — накопиченням в організмі, що в кінцевому підсумку призводить до осідання на дно, припинення харчування і загибелі [2, 3].

Загальним принципом інтоксикації є різнорівневість ушкоджень та каскадність розвитку патологічного процесу. Встановлено, що для адаптивної відповіді на дію токсикантів характерною є фазність, яка виявляється в існуванні мінімальної і максимальної ушкоджувальної дії їх та розвиткові компенсаторно-адаптивних реакцій [4].

На основі власних та літературних даних Карпевич [5] було визначено категорії концентрацій, які зумовлюють: 1 — забезпечення обміну; 2 — стимуляцію; 3 — адаптивні зміни; 4 — захисну реакцію; 5 — пригнічення; 6 — летальність. Було показано, що токсиканти в розчинах у низьких концентраціях (у межах десятих частин мг/л) справляють стимулювальний вплив на обмінні процеси дафній, а зі збільшенням концентрації на десятки мг/л виявляється захисна реакція особин (категорія 4) з поступовим згасанням генеративної функції (категорія 6). Токсичні речовини, навіть у дуже малих концентраціях, одразу спричиняють захисну реакцію організму (категорія 4) і відбувається вона в дуже вузькому діапазоні змін. Концентрації категорії 5, що призводять до летальності, можуть змінюватися в широкому діапазоні. Токсиканти у ще більших розведеннях, можливо, нейтралізуються нейтральними солями та іншими речовинами, розчиненими у природних водах (входять до складу екзометаболітів), і втрачають свою токсичність.

В основі екологічної витривалості гідробіонтів у присутності токсичних речовин лежить фізіологічна толерантність (пластичність) окремих особин, що сприяє їхньому виживанню [6]. Пластичність цілих організмів базується на більшій пристосованості протеїнів, тканин і ензиматичних систем до зміни умов середовища. Саме за рахунок елімінації найбільш чутливих особин до даного токсиканта розширюється ефективність пристосування популяції. Таким чином, в основі стійкості водних організмів до токсикантів лежить відбір або здійснення генетичної адаптації.

Аналіз методології біологічного тестування на дафніях (гіллястовусих ракоподібних)

Основним видом організмів, який легко культивується в лабораторних умовах

в будь-яку пору року є *Daphnia magna* Straus (Crustacea:Cladocera) (рис. 1). Ще в 1933 р. Е. Науман [7] запропонував використовувати дафнію в ролі тест-об'єкта, або «датчика» сигнальної інформації про токсичність середовища.

D. magna належать до найбільш поширених представників зоопланктону. Популярність цих рачків як тест-об'єктів пов'язана, головним чином, з їхніми фізіологічними властивостями. За характером живлення вони є фільтраторами, чутливими до дії токсичних речовин, легко вводяться в культуру, доволі стійкі в лабораторних умовах (при культивуванні *in vitro*), дають цілий комплекс тест-реакцій і мають короткий життєвий цикл. Останнє дозволяє простежити наслідки токсичного впливу (навіть у малих концентраціях) протягом ряду поколінь [8].

Як критерій токсичності середовища запропоновано використовувати різні еколого-фізіологічні тести їхньої поведінки, такі як іммобілізація, подразливість, частота серцевих скорочень, дихальний ритм, інтенсивність споживання кисню [9]. Відомо також, що дафнії через зяброві мембрани постійно виділяють у навколишнє середовище продукти метаболізму — екзометаболіти, поглинаючи при цьому кисень і поживні речовини.

Біотестування із залученням таких гідробіонтів, як дафнії є загальноприйнятим і широко використовується для дослідження як токсичності різних хімічних речовин, так і якості водного середовища загалом [10,11]. Біологічні тести на *D. magna* стандартизовані в багатьох країнах, у тому числі й в Україні. Вони охоплюють вимоги щодо стану культур та середовища для їх культивування, підготовки проб для біотестування та проведення гострих і хронічних дослідів [12–14].

У цілому біотестування ґрунтується на визначенні змін у виживаності та плодючості водних організмів внаслідок дії токсичних речовин, що містяться у дослідній воді, порівняно із цими показниками в контрольних умовах.

Короткочасне тестування дозволяє визначити гостру токсичну дію води на гіллястотусих ракоподібних за показником їх виживання. Гострий токсичний ефект у дафній може виявлятися комплексом симптомів, що спостерігаються візуально. До них належать: показники летальності (іммобілізація, осідання на дно посуду, судоми, смерть), рефлекторно-поведінкові реакції (непорядковані рухи, обертання нав-

коло своєї осі), сповільнення частоти серцевого ритму, абортів яєць. Критерієм токсичності при цьому є загибель 50% та більше піддослідних тварин протягом певного часу [15,16].

За більш тривалого тестування визначають хронічну дію за показником виживаності та плодючості тест-об'єктів. Критерії токсичності у хронічних біотестах суттєво відрізняються від таких у гострих дослідах. Вони ґрунтуються на морфологічних, гонадотропних, ембріотропних, біопродукційних та мутагенних ефектах, які виявляються тільки за поступового впливу хімічних речовин на організм тест-об'єкта, акумуляції їх *in vivo*. Реалізація методики хронічного біотестування в циклі робіт [2, 3, 17, 18] підтверджує її перспективність і показує, що за безсумнівного кількісного різноманіття відгуків різних видів Cladocera на хронічний вплив малих доз різних за хімічною природою токсикантів суть їх завжди однозначна і призводить до зниження плодючості, порушення ембріогенезу, виникнення мутацій, скорочення тривалості життя. Не викликає сумнівів і той факт, що зниження плодючості дафній у ряду поколінь під впливом малих концентрацій токсикантів є універсальною реакцією і не залежить від хімічної природи речовин, а так само, як і експрес-реакції, є генетично детермінованим відгуком на ушкодження та кумуляцію хімічного впливу.

Слід зазначити, що величезний потенціал плодючості дафній дозволяє природній популяції швидко ліквідувати отримані ушкодження та в разі припинення впливу ушкоджувального фактора швидко повернутися до характерної для неї чисельності. Усі ці обставини належать вже не лише до біотестування як такого, а й до глибокого біологічного дослідження проблеми взаємодії гідробіонтів з токсичними речовинами на популяційному та індивідуальному (фізіолого-біохімічному) рівнях.

Деякі особливості метаболізму дафній у токсичному середовищі

Загалом резистентність водних безхребетних до впливу токсичних речовин залежить від величини депонованих в організмі вуглеводів, здатності переключати аеробний тип обміну на анаеробний в умовах дефіциту кисню, синтезувати нікотинамідні коензими та накопичувати тіамін і АТФ; від пристосованості екскреторного апарату виводити отруйні продукти проміжного обміну або знешкоджувати їх.

Дафнії належать до оксифільних гідробіонтів і мають низьку резистентність до токсикантів. Найбільші біохімічні зсуви в їхньому організмі спостерігаються в перший період отруєння, коли мобілізуються захисні механізми організму, спрямовані на відновлення порушеного гомеостазу. Ця фаза супроводжується підвищеним споживанням кисню і синтезом гемоглобіну, збільшенням вмісту нікотинамідних коензимів, вітамінів та активності холінестерази, завдяки чому підтримується гомеостаз в організмі навіть в умовах тривалого впливу токсичних агентів. У разі хронічного отруєння в організмі створюються умови кисневої нестачі та асфіксії, які супроводжуються порушенням нейрогуморальної регуляції. Тварини стають нерухомими, сильно набухають, відбувається зміна іонного складу. Всі біохімічні реакції змінюють спрямованість у протилежний бік. Поступово депо глікогену, АТФ, тіаміну і т. д. вичерпуються, а накопичення токсичних для них продуктів проміжного і кінцевого обміну та акумуляція токсикантів зумовлюють перехід фізіологічних змін у патологічні, і ракоподібні гинуть.

Великий внесок в осмислення біохімічних процесів, які характеризують стан водних безхребетних на клітинному рівні, зробив Т. І. Біргер [19] ще в 70-х роках ХХ ст. Значна роль у вивченні метаболізму гідробіонтів у токсичному середовищі належить Н. С. Строганову [20], Б. А. Флерову [6], Л. П. Брагінському [15]; структури енергетичного балансу — Г. Є. Шульману [21], В. П. Гандзюрі [22]. Стійкість ліпідів і жирних кислот біомембран гідробіонтів до екстремальних факторів зовнішнього середовища дослідив Т. І. Рegerанд [23].

Сукупність усіх літературних даних, що є на сьогодні, свідчить про те, що специфіка метаболітів, які тварини виділяють у середовище, визначається специфікою їхнього обміну речовин, який, у свою чергу, зумовлюється загальними властивостями генотипу. Це уможливило припущення, що й характер впливу екзометаболітів принципово подібний до впливу метаболітів, які циркулюють у внутрішньому середовищі організму. Метаболіти створюють той хімічний фон, який визначає хід росту та розвиток організму і є основою для здійснення хімічної комунікації організмів у середовищі. Скинуті хітинові покриви (карапакси) містять велику кількість органічних і неорганічних речовин — продуктів метаболізму. В кінцевому підсумку вони також збагачують

хімічний фон водного середовища гідробіонтів [24, 25].

На думку С. С. Шварца [26], безперервне надходження води в організм гідробіонта призводить до того, що екзометаболіти сприймаються організмом як свої і виявляють такий самий морфологічний ефект, що й внутрішньотканинні метаболіти. Ракоподібним, окрім того, очевидно, не притаманна здатність виводити токсичні продукти проміжного обміну. Привертає увагу той факт, що під впливом токсикантів у них спостерігаються помітно виражені симптоми гіповітамінозу В₁, збільшення вмісту тіамінази, зменшення суми нікотинамідних коензимів і накопичення піровиноградної кислоти як проміжного продукту вуглеводного обміну, яка може справляти на організм токсичний вплив.

Як відомо, прижиттєві й постлетальні метаболіти водних організмів відіграють не тільки трофічну роль, але й мають значну біологічну активність. Токсичні речовини гідробіонтів здатні суттєво знижувати вміст кисню та величину рН. Тому вплив цих речовин на ракоподібних пов'язаний як з порушенням фізіолого-біохімічних процесів, так і з умовами їхнього існування [27].

Експерименти з прісноводним рачком *Polyphemus pediculus* [28] свідчать, що речовини, виділені цими рачками у воду, впливають на обмінні процеси, ріст і розвиток, розмноження і поведінку окремих особин. Автором показано, що на всі відхилення у водному середовищі рачки реагують передусім зміною швидкості руху і, відповідно, швидкості обміну.

Хемілюмінесценція у живих системах

Процеси життєдіяльності організмів завжди супроводжуються дуже слабкою (спонтанною) хемілюмінесценцією (ХЛ). Це пов'язано з тим, що в результаті реакцій окиснення у біологічних системах формуються електронно-збуджені стани молекул продуктів. Малий квантовий вихід ХЛ в живих об'єктах пов'язаний з ефективною безвипромінювальною конверсією збудження [29]. Встановлено [30], що власне світіння тканин може бути зумовлено реакціями трьох типів:

1) реакцією так званих активних форм кисню (АФК): пероксиду водню (H₂O₂), гіпохлориду (ClO⁻) та кисневих радикалів: супероксиду (O₂⁻) і радикалу гідроксилу (HO[•]). Головним джерелом АФК в організмі є клітини-фагоцити;

2) реакціями ланцюгового (пероксидно-го) окиснення ліпідів у мембранних структурах клітин та ліпопротеїнах крові, які проходять за участю вільних радикалів ліпідів L^{\cdot} та ліпопероксидів LOO^{\cdot} ;

3) реакціями за участю оксиду азоту та супероксиду, в яких утворюється пероксинітрил, який, у свою чергу, взаємодіючи з білком, зумовлює світіння.

Першим, хто виявив існування власного слабкого світіння клітин тварин і рослин, був російський учений О. Г. Гурвіч. Дуже слабе ультрафіолетове випромінювання клітин, яке індукує поділ навколишніх клітин, Гурвіч назвав мітогенетичними променями [31].

На сьогодні відомо багато хімічних реакцій, що супроводжуються світінням. Молекулярний механізм ХЛ було досліджено детально й описано в літературі [30, 32]. Для реєстрації власного слабкого світіння (ХЛ) клітин та тканин рослин і тварин використовують високочутливі прилади — хемілюмінометри. У них світло ХЛ вимірюють за допомогою фотопомножувача, електричний сигнал від якого підсилюється, а потім обробляється і записується на ПК (рис. 2).

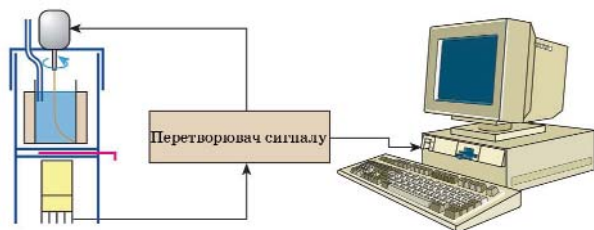


Рис. 2. Хемілюмінометр, приєднаний до комп'ютера для реєстрування та оброблення кривих хемілюмінесценції (on line) [30]

Спонтанний ХЛ притаманна низька інтенсивність, що є головною перешкодою для її широкого використання в аналітичних цілях. Однак у присутності певних сполук, які називаються «активаторами», світіння клітин і тканин можна підсилити на кілька порядків [33]. У біохімічних аналізах найчастіше вимірюють інтенсивність підсиленої люмінолом ХЛ. У літературі [34] є дані щодо ХЛ люмінолу за дії багатьох оксидантів. Окиснювальне перетворення люмінолу є багатостадійним, і початкові реакції різних оксидантів з ним неоднакові. Однак шлях перетворення гідропероксидного ключового продукту до електронно-збудженої амінофталевої кислоти один і той самий під час дії багатьох оксидантів [35]. Так, у разі стимуляції фагоцитів у процесі так званого респіраторного вибуху синтезуються сильні

окисники — супероксид-аніон-радикал, гідроксильний радикал, пероксид водню, а також сполуки з активним хлором, до яких належать гіпохлорид та органічні хлораміни. У випадку поліморфноядерних лейкоцитів (нейтрофілів) ХЛ зумовлена більшою мірою прямою початковою реакцією гіпохлориту з люмінолом; інтенсивність світіння збільшується внаслідок окиснення пероксидом водню продуктів перетворення люмінолу [36].

Високою інтенсивністю відзначається ХЛ, яка супроводжує реакцію окиснення люмінолу пероксидом водню у присутності каталізатора. Такими каталізаторами можуть бути іони металів змінної валентності (залізо, мідь, марганець), а також деякі комплекси, наприклад похідні гему, які також розкладають пероксид водню з утворенням радикалів (гідроксилу і супероксиду). У результаті люмінол перетворюється на продукт реакції — 3-амінофталаат, що перебуває в електронно-збудженому стані [37].

Цікавою видається оцінка антиокиснювальної активності води у скопиченнях гідробіонтів під час вимірювання ХЛ, що виникає в системі пероксид водню — люмінол-каталізатор. Пероксид водню розкладається на воду і молекулярний кисень, а звільнена при цьому енергія використовується для збудження люмінолу. Якщо в досліджуваній воді присутні речовини, які гальмують вільнорадикальний процес (інгібітори), то світловипускання знижується або зовсім припиняється. Ініціатори вільнорадикального процесу підсилюють інтенсивність світіння, що свідчить про збільшення швидкості хімічного окиснювального процесу. Люмінесценція водного середовища тісно пов'язана з присутністю у воді складного органічного субстрату — носія люмінесценції. Було показано, що світіння зоопланктону зумовлено речовинами, з яких складаються їхня оболонка та внутрішнє середовище. Незабарвлені тканини тварин, які перебувають на стадії розкладання, також здатні світитися. Однією з причин світіння вод вважають розкладання залишків загинув тварин [38,39].

Велику увагу сьогодні зосереджено на пошукові нових сполук, яким притаманна здатність вступати в хімічні реакції, які супроводжуються світінням, з хімічно активними продуктами життєдіяльності живих клітин, такими як вільні радикали і пероксиди — хімічні активатори ХЛ.

Розглянуті літературні дані можуть бути підставою для вивчення якісного й кількісного

складу екзометаболітів водних організмів та їхньої здатності каталізувати розщеплення пероксиду водню з метою визначення токсичних речовин хемілюмінесцентним тестуванням. Перші спроби токсикологічного біотестування на основі активованої хемілюмінесценції екзометаболітів дафній здійснені під час визначення поверхнево-активних речовин, пестицидів та мікотоксинів [40, 41].

Використання біоломінесцентних бактерій у методах екотоксикологічного біотестування

Зв'язок люмінесценції світних бактерій з метаболічною активністю

Зручність використання морських світних бактерій у процесі дослідження впливу факторів середовища зумовлена тим, що за відповіддю біоломінесцентного сигналу на зовнішній вплив можна оцінити не тільки виживаність мікробних клітин, але і вплив того чи іншого чинника на їхню метаболічну активність.

Люмінесцентна реакція, пов'язана з метаболізмом переносників водню, жирних кислот і вуглеводів, може вважатися інтегральним показником метаболічної активності бактеріальної клітини. Наявність у клітинах світних бактерій достатньої концентрації всіх необхідних метаболітів (субстратів та індукторів) забезпечує високий рівень люмінесценції у вузькій ділянці спектра. Водночас накопичення у клітинах інгібіторів та репресорів у процесі життєдіяльності, а також вплив ряду зовнішніх факторів може призводити, поряд із загальним пригніченням метаболічних процесів, і до затухання світіння [42].

Вивчення внутрішньоклітинної організації світних бактерій, а також взаємозв'язок люмінесцентної реакції з клітинним метаболізмом триває. Передусім дослідження вчених було спрямовано на вивчення зв'язку біологічної люмінесценції з нормальним перебігом процесів у живому організмі [43–45]. Саме таким шляхом визначено ті ланцюги у клітинному метаболізмі, які є точками відгалужень реакцій, що спричинюють світіння.

На сьогодні відомо, що біоломінесцентна система бактерій тісно пов'язана з окиснювальними процесами у клітині через ланцюг дихальних ферментів (дегідрогеназ, флавінових ферментів і цитохромів). На рівні дегідрогеназ і флавінів люмінесцентна реакція бактерій іде одним шляхом з диханням, конкуруючи за відновлені еквіваленти,

що їх постачає НАДН-дегідрогеназа. При цьому на люмінесценцію витрачається постійна частка енергії ($10^{-4}\%$) з окиснювального каналу. Самостійною і специфічною люмінесцентна реакція стає тільки після відгалуження від флавінової ланки дихального ланцюга.

Живі організми, загалом, витрачають на біоломінесценцію до 5–7% загальної кількості спожитого ними кисню. Енергія біоломінесценції не використовується організмом і необоротно губиться ним. Тому відкритими на сьогодні залишаються питання біологічної доцільності та причини виникнення біоломінесценції в живих організмах.

Вивчення кореляції між біологічною люмінесценцією і станом клітини — одна з основних проблем біоломінесценції. Адже інтенсивність і спектр її можуть слугувати критерієм стану або ступенем ураження окремих структур і функцій клітини.

Механізми впливу різних токсинів на конкретні ферментативні процеси або структури у світних бактерій, насамперед енергетичні, вивчено вкрай фрагментарно. Достатня увага приділяється в літературі механізму електронного збудження в біоломінесцентній реакції бактерій. Адже аналіз біофізичних механізмів транспорту (перенесення) енергії, електронів, протонів у біоломінесцентних реакціях є основою для розроблення ферментативних біотестів [46, 47]. Важливу роль у поліпшенні умов внутрішньомолекулярного транспорту електронів відіграють тіолові сполуки. Було показано [48], що спирти (ацетон, етанол, метанол, ДМСО, ацетонітрил і формамід) у невеликих концентраціях збільшують інтенсивність бактеріальної люмінесценції, а за високих концентрацій пригнічують її.

На сьогодні встановлено, що кінетика інактивації біоломінесценції відрізняється у різних груп токсинів. Однак для більшості токсинів, зокрема фенолів [49], характерним є необоротне гасіння світіння, при цьому суттєву роль відіграє гідрофобність молекули токсину (характерна також для Т-2 мікотоксину). Доведено, що люцифераза і НАДН-дегідрогеназа мають гідрофобні зони, в яких можуть зв'язуватися ліпофільні ксенобіотики різної хімічної природи [50]. Більшість ліпофільних агентів діють безпосередньо на люциферазу, інгібуючи світіння через конкуренцію з її альдегідним субстратом. Пригнічення НАДН-дегідрогеназної активності багатьма гідрофобними сполуками здійснюється, як правило, за більш високих концентрацій речовин і може мати неспецифічну природу.

Загалом, як можливі параметри, на які передусім може бути спрямований вплив токсикантів, розглядаються такі: порушення бар'єрних властивостей мембрани, пряме інгібування люциферази або НАДН-дегідрогенази, що забезпечує відновлення флавінового субстрату люциферази і цитохромів дихального ланцюга.

Перехід до безклітинних систем дозволяє внести ясність у питання про первинні мішені впливу токсикантів і відокремити мембранні ефекти від прямих взаємодій з ензиматичними системами, безпосередньо залученими у процес люмінесценції.

Дослідження в галузі механізму біологічної люмінесценції та структурно-функціональної організації люмінесцентної системи мікроорганізмів свідчать про тісний зв'язок закономірностей люмінесценції і життєдіяльності бактерій. Це дозволяє сподіватися, що біоломінесценція стане з часом тонким та ефективним фізичним методом вивчення біологічних процесів.

Бактеріальні біоломінесцентні біотести

Біотести з використанням живих бактерій відрізняються від сучасних біотестів, які використовують інфузорії, дафнії, водорості та риб, лише тим, що як параметр життєдіяльності вимірюється біоломінесценція.

До світних належить небагато видів бактерій. Це 12 видів, які належать до чотирьох родів: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, *Xenorhabdus*. Більшість представників цієї групи є морськими видами, серед яких трапляються як вільноживучі, так і симбіотичні форми. Питання про шляхи інфікування люмінесцентними бактеріями морських тварин, що мають світлові органи, й досі є дискусійним. Усі світні бактерії виявляють характерну для грамположитивних видів ультраструктурну організацію [43–45].

Біотести на світних бактеріях відображають кількісну міру токсичності і часто перевершують відомі біотести за швидкодією, точністю, чутливістю і простотою, дозволяють контролювати одночасно значну кількість токсикантів [51].

Розроблення біоломінесцентних біотестів відбувається у три етапи: підготовка тестової культури бактерій; власне вимірювання світіння бактерій у присутності або за відсутності аналізованих речовин; встановлення зв'язку між параметрами світіння і кількісними характеристиками токсичності середовища. Кожен з етапів має свої особливості, пов'язані з тим, яка культура бактерій використовується для аналізу. То-

му всі відомі на цей час біотести зручно класифікувати за способом приготування тестової культури (періодичної чи неперервної) або реагентів на основі бактерій. На прикладі поверхнево-активних речовин, фенолу та мікотоксину Т-2 [52–54] було показано, як виконують вимірювання в біотестах з використанням світних бактерій. Із тестової культури відбирають проби і в кюветі люмінометра реєструють світіння бактерій за відсутності аналізованої речовини — I_0 . Далі будують концентраційну криву: додають у кювету розчин токсину різних концентрацій та реєструють гасіння люмінесценції бактерій (I). Інгібуючий ефект визначається за величиною (I/I_0) ,%. У разі збільшення концентрації токсину величина цього параметра зростає. За кривою розведення можна знайти концентрацію токсину, яка пригнічує світіння на 50%. Слід зазначити, що у випадку використання малорозчинних у воді речовин (зокрема мікотоксинів), застосовують розчини їх в етанолі чи інших органічних розчинниках, і контролем слугує інтенсивність світіння у присутності розчинника.

Деякі недоліки, притаманні як періодичній культурі світних бактерій, так і неперервній, усуваються отриманням реагента на основі ліофільно висушених бактерій. Препарати ліофілізованих бактерій виробляють в Інституті біофізики СО РАН, Інституті біоколоїдної хімії НАНУ та деяких зарубіжних фірмах [55]. Beckman Instruments продає ліофільно висушені світні бактерії у комплекті з біоломінометром. Бактерії, відновлені в розчині NaCl, зберігають чутливість до мікотоксинів упродовж 5 год і для деяких токсинів вона вища, ніж у свіжій суспензії клітин.

Під час створення тест-системи на основі світних бактерій часто постає завдання підвищити чутливість бактеріальних клітин до низьких концентрацій тестованих сполук. Цього можна досягти зміною умов культивування, способу оброблення токсикантом, використанням специфічних чутливих мутантних штамів. Усі ці підходи застосовували у процесі створення тест-системи на різні феноли та їхні похідні, сульфопохідні янтарної кислоти та гексахлоранциклогексану (ГХЦГ) [56]. Біотести на основі мутантів застосовували також для з'ясування вуглеводної специфічності лектинів світних бактерій [57].

Припускають, що серед великої різноманітності мутантів можна вибрати штами, вибірково чутливі до певних речовин. Однак

успішних робіт у цьому напрямі поки що мало. Проте з'явилися праці, виконані з використанням рекомбінантних світних бактерій, де успішно експлуатується ідея про те, що випромінювальні ензими — люциферази та їхні гени є вартими уваги та придатними для використання як маркери у моніторингу навколишнього середовища, а також для біохімічної діагностики в медицині.

Літературні джерела наповнені даними про розроблення нових напрямів біотестування і одним з них є застосування як тест-об'єкта люмінесцентних рекомбінантних штамів різних бактерій (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Rysobium* та ін.) У роботі [58] описали клонування та експресію генів люмінесцентної системи світних бактерій *Vibrio harveyi*, *V. fischeri*, *Photobacterium leiognati* в плазмідному векторі клітин різних мікроорганізмів. Було встановлено принципову можливість визначення мікотоксинів з допомогою біолюмінесцентного методу. В наступних дослідженнях було розроблено люциферазний біотест для виявлення зерна, ураженого фузаріозом [59]. Варто зазначити, що в люциферазних біотестах вплив токсичних речовин відбувається безпосередньо на люциферазу — ключовий ензим метаболізму світних бактерій. У випадку цілих бактеріальних клітин прямий вплив токсикантів на люциферазу обмежений клітинною стінкою і мембраною бактерій, які перешкоджають вільному проникненню сторонніх речовин у клітини [60, 61], однак відбувається вплив на інші важливі процеси життєдіяльності клітини, так чи інакше пов'язані з біолюмінесценцією. Сумісне використання біолюмінесцентних біотестів *in vivo* та *in vitro* одночасно зможе гарантувати повне обстеження об'єктів довкілля на токсичність, незалежно від структури та фізико-хімічних властивостей речовин, токсичних як для цілого організму, так і для клітин і ензимів. А створення і розроблення високочутливих біолюмінесцентних сенсорів з іммобілізованими бак-

теріями та введенням *lux*-генів підвищить чутливість аналізу та можливість визначення токсичних речовин в експресному режимі [62–68].

На сьогодні найширше застосування за кордоном має білюмінесцентна тест-система, розроблена фірмою Microbics Operations of Beckman Instruments, Inc. (США), відома під торговою маркою Microtox. Цей прилад використовують у лабораторних і польових дослідженнях для контролю якості промислових і природних вод, визначення рівня токсичності новостворених хімічних сполук та фармацевтичних препаратів. У Росії (Інститут біофізики, Красноярськ) розроблено аналогічну тест-систему (на основі світних ліофілізованих бактерій *Photobacterium phosphoreum*), яка отримала фірмовий знак Мікробіосенсор. Інший варіант люмінесцентної тест-системи на основі світних ліофілізованих бактерій *V. Fischeri* та генетично модифікованого штаму *E. coli* розроблено в Московському державному університеті під назвою Еколюм. Порівняно з Мікротоксом біотест-система Еколюм не має такого обмеження, як проведення вимірювань за зниженої (15 °С) температури; окрім того зменшено кількість підготовчих операцій, що дозволяє економити час і кошти.

Викладений вище критичний аналіз даних літератури ще раз наголошує на важливості подальшого пошуку шляхів вдосконалення відомих аналітичних систем для експресної оцінки токсичності середовища. Зроблено перші кроки у з'ясуванні питання про взаємозв'язок метаболічних процесів водних організмів (як тест-об'єктів) з умовами люмінесцентного біотестування. Використання в екології біо- та хемілюмінесцентних сенсорів, які відповідають таким вимогам практики, як чутливість аналізу та простота виконання, продемонстровано під час контролю рівня мікотоксинів, зокрема Т-2 токсину, що свідчить про перспективність застосування їх на практиці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Брагинский Л. П., Величко М. М., Щербань Э. П. Пресноводный планктон в токсической среде. — К.: Наук. думка, 1987. — 179 с.
2. Щербань Э. П., Платонов Н. А. Биотестирование токсичности регулятора роста растеный тримана-1 на ветвистоусых ракообразных // Гидробиол. журн. — 2001. — Т. 37, №4. — С. 39–45.
3. Мельничук С. Д., Щербань Э. П., Лохановская В. И. Оценка токсичности гербицидов на основе глифосфата методом биотестирования на ветвистоусых рачках // Там же. — 2007. — Т. 43, №1. — С. 84–96.
4. Грубінко В. В. Інтегральна оцінка токсичного ураження у біологічних системах // Наук. записки Тернопільськ. пед. ін-ту, 2005. — Т. 26, №3. — С. 111–114.
5. Карневич А. Ф. Избранные труды. — К., 1998. — Т. 1. — С. 616–620.

6. Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных / Под ред. Б. А. Флерова. — Л.: Наука, 1990. — 144 с.
7. *Nauman E.* *Daphnia magna* Straus als Versuchstiere // Kgl. Fysiog. Saliskap, Lund forhunde. — 1933. — V. 3, N2. — P. 25–34.
8. *Романенко В. Д., Крот Ю. Г., Сиренко А. А., Соломатина В. Д.* Биотехнология культивирования гидробионтов. — К., 1999. — С. 95–117.
9. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / За ред. В. Д. Романенко. — К.: Логос, 2006. — С. 340–364.
10. *Крайнюкова А. Н.* Использование биотестирования при оценке состояния компонентов окружающей среды и контроля источников их загрязнения в условиях Украины // Актуальные проблемы водной токсикологии. — Борок, 2004. — С. 61–79.
11. *Rand G. V., Wells P. G., McCarty L. S.* Introduction to Aquatic Toxicology // Fundamentals of Aquatic Toxicology, sec. ed. — 2003. — P. 3–67.
12. КНД 211.14.054-97. Методика визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних *Daphnia magna* Straus.
13. ISO 10706:2000. Water quality — determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus.
14. *Исакова Е. Ф., Колоскова Л. В.* Метод биотестирования с использованием дафний // Методы биотестирования вод. — Черноголовка, 1988. — С. 50–57.
15. *Брагинский Л. П.* Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* Straus и других ветвистоусых ракообразных // Гидробиол. журн. — 2000. — Т. 36, №5. — С. 50–70.
16. *Брагинский Л. П., Игнатюк А. А.* Визуально фиксируемые реакции пресноводных гидробионтов как экспресс-индикаторы токсичности водной среды // Там же. — 2005. — Т. 41, №4. — С. 89–116.
17. *Brita T. A., Muysen J. T.* Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus // Environm. Pollution. — 2004. — V. 130, Issue 3. — P. 309–316.
18. *Vesela S., Ondruska V., Kuca K., Patocka J.* Freshwater microcrustacean *Daphnia magna* Straus as an early screen model to compare toxicity of acetylcholinesterase inhibitors // J. Appl. Biomed. — 2006. — N4. — P. 105–110.
19. *Биргер Т. И.* Метаболизм водных беспозвоночных в токсической среде. — К.: Наук. думка, 1979. — 189 с.
20. Реакции гидробионтов на загрязнение / Под ред. Н. С. Строганова — М.: Наука, 1983. — 247 с.
21. Биоэнергетика гидробионтов / Под ред. Г. Е. Шульмана, Г. А. Финенко. — К.: Наук. думка, 1990. — 248 с.
22. *Гандзюра В. П.* Структура энергетического баланса гидробионтов в токсической среде // Гидробиол. журн. — 2004. — Т. 40, №1. — С. 108–115.
23. *Регеранд Т. И., Нефедова З. А.* Метаболизм липидов водных беспозвоночных под воздействием солей алюминия и железа // Прикл. биохим и микробиол. — 2005. — Т. 41, №2. — С. 220–227.
24. *Новиков М. А., Харламова М. Н.* Трансабиотические факторы в водной среде // Журн. общей биологии. — 2000. — Т. 61, №1. — С. 22–46.
25. *Задержев Е. С.* Химические взаимодействия среди планктонных ракообразных // Там же. — 2002. — Т. 63, №2. — С. 159–167.
26. *Шварц С. С., Пястолова О. А.* Влияние экзометаболитов на рост и развитие природных организмов // Взаимодействие между водой и живым веществом. — М.: Наука, 1979. — С. 42–47.
27. *Кирпенко Н. А., Курейшевич А. В., Медведь В. А.* К вопросу о метаболитных взаимоотношениях гидробионтов // Материалы междунар. конф. «Озерные экосистемы», Минск, 17–22 сентября 2007. — С. 19–20.
28. *Буторина Л. Г.* Об особенностях химической коммуникации пресноводного ракообразного *Polyphemus pediculus* (L) Cladocera / Проблемы химической коммуникации животных. — М.: Наука, 1991. — С. 31–44.
29. *Кудряшева Н. С.* Механизм формирования электронно-возбужденных состояний в бактериальной биолюминесценции. Автореф. дис. ... д-ра физ.-мат. наук / Ин-т биофизики РАН. — 2004. — 40 с.
30. *Владимиров Ю. А.* Свечение, сопровождающее биохимические реакции // Соросовский образовательный журн. — 1999. — №6. — С. 25–32.
31. *Гурвич А. Г.* Митогенетическое излучение. — М.: Госмедиздат, 1934. — 124 с.
32. *Part B, De Luca M., Erlou W.* Bioluminescence and Chemiluminescence. — Acad. Press: New York, 1986. — 659 p.
33. *Владимиров Ю. А.* Активированная хемилуминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях // Соросовский образовательный журн. — 2001. — №1. — С. 16–23.
34. *Carlson R., Lewis S. W., Lim K. F.* Seeing the light: using chrmiluminescence to demonstrate chemical fundamentals // Aust. J. Chem. — 1999. — V. 14. — P. 51–53.
35. *Merény G., Lind J., Ericson T. E.* Oxidation potential of luminol: is the autoxidation of singlet organic molecules an outhere-sphere electron transfer // J. Phys. Chem. — 1990, 94. — P. 743–753.
36. *Рощупкин Д. И., Белакина Н. С., Мурина М. А.* Усиленная люминолом хемилуминесцен-

- ция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола // Биофизика. — 2006. — Т. 51, №1. — С. 99–106.
37. Фархутдинов Р. Р., Бикмухаметова Х. С., Фахитов Р. Г. Метод регистрации хемилюминесценции крови в клинической практике // Сов. медицина. — 1986. — №3. — С. 86–89.
 38. Синельников В. Е. Люминесцентный анализ природных и загрязненных вод. — Обнинск, 1968. — С. 67–69.
 39. Алексеева В. М. Люминесцентно-микроскопические исследования жировых и липоидных веществ гидробионтов. — Изд-во АН СССР, Сер. биол. — 1967. — №4. — С. 56–60.
 40. Левковець І. А., Івашкевич С. П., Назаренко В. І., Стародуб М. Ф. Застосування хемілюмінесцентного методу для визначення чутливості *Daphnia magna* Straus до різних типів токсичних речовин // Укр. біохім. журн. — 2002. — Т. 74, №6. — С. 120–124.
 41. Гойстер О. С., Стародуб Н. Ф., Хмельницький Г. О. Оценка токсичности Т-2 микотоксина для *Daphnia magna* Straus методом возбужденной хемилюминесценции // Гидробиол. журн. — 2003. — №5. — С. 85–91.
 42. Лесняк Д. В., Попова Л. Ю. Конфликт: индукция-ингибирование люминесценции трансгенных бактерий в изучении экспрессии lux-генов // Биофизика. — 2002. — Т. 47, №6. — С. 1059–1063.
 43. Чумакова Г. И., Гительзон И. И. Светящиеся бактерии. — М.: Наука, 1975. — 108 с.
 44. Гительзон И. И., Родичева Э. К., Медведева С. Е. Светящиеся бактерии. — Новосибирск: Наука, 1984. — 278 с.
 45. Данилов В. С., Егоров Н. С. Бактериальная биолюминесценция. — М.: Изд-во МГУ, 1990. — 152 с.
 46. Кудряшева Н. С., Кратасюк В. А., Есимбекова Е. Н. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа. — Красноярск, 2002. — 154 с.
 47. Немцева Е. В., Кудряшева Н. С. Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий // Успехи химии. — 2007. — Т. 76, №1. — С. 101–112.
 48. Суковатая И. Е. Каталитическая активность бактериальной люциферазы из *Photobacterium leiognathi* в водно-органических смесях // Матер. XXXVI междунар. науч. конф. «Студент и научно-техн. прогресс»: Биология. — Новосибирск, 1999. — 125 с.
 49. Исмаилов А. Д., Погосян С. И., Митрофанова Т. И. и др. Ингибирование бактериальной биолюминесценции хлорфенолами // Прикл. биохим. и микробиол. — 2000. — Т. 36, №4. — С. 469–473.
 50. Jablonski E., Deluca M. Studies of the control of luminescence in *Beneckeia harveyi*: properties of the NADH and NADH:FMN oxidoreductases // Biochemistry. — 1978. — V. 17, N4. — P. 672–678.
 51. Кацев А. М. Использование светящихся бактерий для биотестирования в экологии и медицине // Матер. IX Укр. біохім. з'їзду, Харків. — Укр. біохім. журн. — 2006. — Т. 77, №2. — С. 150–151.
 52. Кацев А. М. Черноморские светящиеся бактерии и их прикладное значение // Прикл. биохим. и микробиол. — 2002. — Т. 38, №2. — С. 217–220.
 53. Кацев А. М., Стародуб Н. Ф. Влияние поверхностно-активных веществ на интенсивность люминесценции бактерий // Укр. біохім. журн. — 2003. — Т. 75, №2. — С. 94–98.
 54. Кацев А. М., Гойстер О. А., Стародуб Н. Ф. Изучение влияния микотоксина Т-2 на интенсивность биолюминесценции светящихся бактерий // Там же. — 2003. — Т. 75, №3. — С. 99–103.
 55. Родичева Э. К., Кузнецов А. М., Медведева С. Г. Биолюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга // Вестник ОХОГУ ONLINE, 14 марта 2008.
 56. Масленникова И. Л., Голястая Н. В. Исследование общетоксических и мутагенных свойств поллютантов микробиолюминесцентным методом // Прикл. биохим. и микробиол. — 2007. — Т. 43, №4. — С. 455–461.
 57. Выдрякова Г. А. Углеводная специфичность лектинов светящихся бактерий // Там же. — 2006. — Т. 42, №4. — С. 413–417.
 58. Кратасюк В. А., Егорова О. И., Кудряшева Н. С., Львова Л. С. Влияние фузариотоксинов на бактериальную биолюминесцентную систему *in vitro* // Там же. — 1998. — Т. 34, №2. — С. 207–209.
 59. Кратасюк В. А., Егорова О. И., Есимбекова Е. Н. и др. Люциферазный биотест для определения степени поражения фузариозом зерна пшеницы // Там же. — 1998. — Т. 34, №6. — С. 688–691.
 60. Nicaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // Microbiol. Mol. Rev. — 2003. — V. 67, N4. — P. 593–656.
 61. Воробьева Е. В., Красикова Н. Н. Некоторые особенности состава наружной мембраны морской грамотрицательной бактерии *Chryscobacterium indoltheticum* CIP 103168^T // Биол. мембраны. — 2007. — Т. 24, №2. — С. 132–141.
 62. Choi S. H., Gu M. B. A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant luminescent bacteria // Biosens. and Bioelectron. — 2002. — V. 17, N5. — P. 433–440.

63. *Kim B. C., Gu M. B.* A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification // *Biosens. and Bioelectron.* — 2003. — V. 18, N8. — P. 1015–1021.
64. *Пузырь А. П., Позднякова И. О., Бондарь В. С.* Создание люминесцентного биочипа с использованием наноалмазов и бактериальной люциферазы // *Физика твердого тела.* — 2004. — Т. 46, №4. — С. 740–742.
65. *Immonen I., Karp M.* Bioluminescence-based bioassays for rapid detection of nisin in food // *Biosens. and Bioelectron.* — 2007. — V. 22, N9–10. — P. 1982–1987.
66. *Yoo S. K., Lee J. H., Yun S. S. et al.* Fabrication of a bio-MEMS based cell-chip for toxicity monitoring // *Ibid.* — 2007. — V. 22. — P. 1586–1592.
67. *Esimbecova E. N., Kratasyuk V. A.* Disk-shaped immobilized multicomponent reagent for bioluminescent analyses: correlation between activity and composition // *Enz. and Microb. Technol.* — 2007. — V. 40. — P. 343–346.
68. *Деребин Д. Г., Алешина Е. С.* Влияние солей на свечение биосенсора на основе природного и рекомбинантного штамма люминесцирующих бактерий. // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2008. — Т. 44, №3. — С. 324–329.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ С УСЛОВИЯМИ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

О. С. Гойстер¹, Г. А. Хмельницкий²

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

²Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

E-mail: gojsterO@ukr.net

В обзоре дан критический анализ методологии биотестирования токсичности водной среды с использованием таких тест-объектов, как дафнии и светящиеся бактерии. Рассмотрены некоторые особенности обмена веществ водных организмов в токсичной среде с целью теоретического обоснования закономерностей тесной связи их жизнедеятельности с условиями люминесцентного биотестирования.

Ключевые слова: метаболизм, дафнии, светящиеся бактерии, хими-, биолуминесценция, токсиканты.

CORRELATION BETWEEN METABOLIC ACTIVITY OF SOME AQUEOUS ORGANISMS AND CONDITIONS OF LUMINESCENT ECOTOXICOLOGICAL BIOTESTING

O. S. Gojster¹, G. O. Khmelnytsky²

¹Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National University of bioresources and
exploitation of natural resources of Ukraine, Kyiv

E-mail: gojsterO@ukr.net

A critical review of methodology for biotesting of environmental toxicity based on water fleas and luminescent bacteria was carried out. Some peculiar properties of aqueous organisms' metabolism in toxic environment were shown to establish a theoretical dependence of their activity on luminescent testing conditions.

Key words: metabolism, *Daphnia magna*, luminous bacteria, chemi-, bioluminescence, toxins.