

ФГБОУ ДО «Федеральный центр дополнительного образования и организации отдыха и оздоровления детей»,

Молодёжные образовательные экспедиции,

МФТИ, Лаборатория молекулярной генетики

**Исследование эффективности  
штамма *Bacillus subtilis* 168 pNKdinC  
для детекции генотоксичных веществ в почве.**

**Исследование почв о. Оленевский  
на содержание генотоксичных веществ.**

Выполнила:

**Степанова Е. А.,**

9 класс, МБОУ «СОШ №11» г. Обнинск.

Научные руководители:

**Манухов И. В.**

- заведующий лабораторией молекулярной генетики МФТИ,

доктор биологических наук;

**Новоятлова У. С.**

- сотрудница лаборатории молекулярной генетики МФТИ;

**Рассказова М. М.**

- кандидат биологический наук,

доцент отделения биотехнологий ИАТЭ НИЯУ МИФИ.

## Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ .....	3
1.1. Актуальность.....	3
1.2. Цель.....	4
1.3. Задачи: .....	4
1.4. Гипотеза:.....	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
2.1. История изучения биосенсоров.....	6
2.2. Морские люминесцентные фотобактерии и механизм их биолюминесценции .....	6
2.3. Основные типы биотестов на основе люминесцентных бактерий .....	8
2.4. Биосенсорный штамм <i>Bacillus subtilis</i> 168 pNKdinC.....	8
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	11
3.1. Штамм: <i>Bacillus subtilis</i> 168.....	11
3.2. Плазмида: pNKdinC.....	11
3.3. Реактивы и питательные среды.....	11
3.4. Оборудование и условия проведения .....	11
3.5. Пробы для исследования.....	12
3.6. Методика .....	13
4. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	15
4.1. Исследование работы биосенсора с надосадочными жидкостями от почв .....	15
4.2. Исследование работы биосенсора с почвами, внесёнными напрямую в образец .....	16
4.3. Обсуждение .....	19
5. ВЫВОДЫ .....	20
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	20
7. ЛИТЕРАТУРА .....	22

# 1. ВВЕДЕНИЕ

## 1.1. Актуальность

Оценка качества среды является важной задачей при планировании и при осуществлении любых мероприятий по природопользованию, охране природы и обеспечению экологической безопасности. Проведение мониторинга среды, ее благоприятности для человека необходимо для определения состояния природных ресурсов и формирования системы природоохранных мероприятий [1,2].

Значение почвы для биосферы многогранно. Обладая плодородием, она снабжает влагой и минеральными компонентами растения, которые в свою очередь обеспечивают людей и животных пищей, регулирует газообмен в атмосфере, фильтрует природные воды в процессе их круговорота.

Почва — это мощный барьер на пути в организм человека многих загрязняющих веществ, в том числе, радионуклидов и тяжелых металлов.

Почва считается основным ресурсом пищи, воды и формирования минеральных источников. Почва - основа производства, поскольку в случае ее уничтожения, страны и даже планета не смогут ничего предложить для продолжения существования. Почва считается коммуникационным мостом между устойчивым развитием, обеспечением здоровья человека и экосистемой.

Почва является незаменимым, исчерпаемым, относительно возобновимым природным ресурсом. Но в результате несоблюдения правил рационального использования почвенных ресурсов почва теряет свое плодородие быстрее, чем оно успевает восстанавливаться [2].

Изучение почвенного покрова направлено на оценку способности почвы выполнять функции, обеспечивающие стабильность отдельных биоценозов и биосферы в целом. Для наиболее полного исследования состояния загрязненных почв [3,4] необходимо определить следующие показатели:

- прямые показатели загрязнения почв: общее (валовое) содержание поллютантов, мощность загрязненного слоя и др.;

- показатели изменения свойств почв под действием загрязнителей: активность почвенных ферментов, скорость основных микробиологических процессов, численность почвенных микроорганизмов и структура микробиоценоза, содержание подвижных соединений азота и фосфора, фитотоксичность и др.;
- показатели устойчивости почв к загрязнению: емкость почвенного поглощающего комплекса, содержание и запасы гумуса, щелочно-кислотные условия, окислительно-восстановительные условия и др.

Определение всего комплекса показателей загрязнения является очень трудоемким и дорогостоящим. Целесообразным представляется определить узкий набор показателей, достаточно объективно отражающих последствия загрязнения. С помощью биосенсоров можно проводить качественные исследования за короткий срок и низкую стоимость. Подобные *lux*-биосенсоры применяются в областях генетической инженерии и биотехнологии, пищевой промышленности, а также в качестве детектора токсических агентов (мониторинг окружающей среды) [5-8].

## 1.2. Цель

Целью данной работы является проверка эффективности биосенсорного штамма *Bacillus subtilis* 168 pNKdinC при измерении токсикантов в почве в полевых условиях и мониторинг почвенных субстратов о. Оленевский (Чернореченская губа, Кандалакшский залив, Белое море) на выявление генотоксичных веществ.

## 1.3. Задачи:

- ❖ Провести забор проб для дальнейших исследований на о. Оленевский (Чернореченская губа, Кандалакшский залив, Белое море) в июле 2021;
- ❖ Осуществить измерение люминесценции (определить зависимость скорости синтеза аутоиндуктора и уровня люминесценции клеток) исследуемых образцов с биосенсорными клетками *B. subtilis* 168 pNKdinC для детекции генотоксичных веществ;
- ❖ Определение уровня загрязнённости генотоксичными веществами почв о. Оленевский.

#### **1.4. Гипотеза:**

Так как *B. subtilis* 168 – почвенная бактерия, можно предположить, что с помощью биосенсорного штамма *B. subtilis* 168 pNKdinC, почвенные субстраты могут быть исследованы на содержание генотоксичных веществ.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. История конструирования биосенсоров

Начало создания биосенсоров относится ко времени появления полярографического метода определения кислорода с помощью электрода Кларка в 1960 г., а также создания ферментного биосенсора (Кларк и Лионс) и биосенсора Исао Карубе [9]. Так началось развитие принципиально нового направления – биосенсоров, основанных на генетически модифицированных организмах.

В 1982 г. были опубликованы работы по клонированию генов люминесценции из *Vibrio harveyi* и *Aliivibrio fischeri* в бактериальную клетку *Escherichia coli* (Baldwin, Engebrecht) [10].

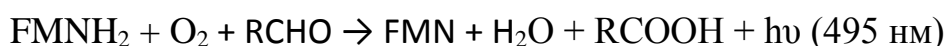
С начала 1990-х годов эти научные открытия позволили изучать бактерии, которые реагируют на присутствие определённых органических и металлоорганических веществ или материалов (металлов). Реакция проявляется в свечении благодаря ферменту люциферазе, который обеспечивает образование квантов света при окислении восстановленных соединений. Преимущество таких биосенсоров перед различными методами химического анализа заключается в том, что удельные концентрации генотоксичного вещества можно определить дифференциально. Таким образом, можно говорить о большой эффективности этих методов при комплексном подходе [11].

В настоящее время эта область является перспективной благодаря тому, что биосенсоры имеют широкую область практического применения – генетическая инженерия и биотехнологии, пищевая промышленность, детекция токсических агентов (мониторинг окружающей среды).

### 2.2. Морские люминесцентные фотобактерии и механизм их биолюминесценции

Существует 4 рода люминесцирующих бактерий: *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio* и *Shewanella*, а также наземным родом *Photorhabdus* [12]. Уникальной особенностью данных микроорганизмов является их способность к

биолюминесценции [13]. Это явление представляет собой ферментативный процесс, сопровождающийся потреблением кислорода и высвобождением квантов света в сине-зелёной части спектра. В общем виде реакция свечения сводится к окислению восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>) (субстрат реакции биолюминесценции) до FMN с одновременным окислением длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) (субстрат реакции биолюминесценции) до соответствующей жирной кислоты (RCOOH):



Представленные схемы реакций свидетельствуют о сложности процесса бактериального свечения, обеспечиваемого не только люциферазой (фермент биолюминесцентной реакции), но и многокомпонентными ферментными системами, ответственными за субстраты [14].

За синтез белков и других веществ, которые необходимы для биолюминесценции в бактериях, ответственны «*lux*-гены». Их количество превышает два десятка, а перечень названий варьирует от *luxA* до *luxZ*. Среди них выделяют структурные или кодирующие белки, которые участвуют в светоизлучении, и регуляторные – ответственные за позитивный и негативный контроль этого процесса. Как правило, они собраны в последовательности, называемые *lux*-операми. Достигая некоторого порогового значения, автоиндукторы (низкомолекулярные вещества, которые образуются и выделяются клетками на всех фазах роста, и поэтому их концентрация в среде пропорциональна плотности бактериальной культуры) ведут к активизации свечения бактерий. Таким образом, свечение возможно только при высокой плотности бактериальной популяции, именно поэтому описанное явление получило название «quorum sensing» (QS) [15].

Введение *lux*-генов позволяет создавать высокочувствительные, избирательные биосенсоры. Например, были сконструированы бактерии, которые под действием конкретных токсичных веществ начинают светиться ярче [16].

### 2.3. Основные типы биотестов на основе люминесцентных бактерий

Реализован коммерческий выпуск тестсистем: «Microtox» (США) на основе бактерий *P. phosphoreum*. Наиболее популярны биотесты на основе морских светящихся бактерий *A. fischeri* «Mutatox» [17] и «Microtox» (США), «LUMISTox» (Великобритания) [18]. В России используются технологии экологического контроля с использованием высокочувствительных сенсоров «Эколюм», разработанных на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, а также используется ферментативный препарат «Комплект реактивов для биолюминесцентного анализа» (КРАБ), выпускаемый ИБСО РАН [20].

Впервые биосенсор с биологическим чувствительным элементом – клетками бактерий *A. fischeri* и *V. harveyi* был использован для определения токсичности воды [12]. В дальнейшем был произведён целый ряд клеточных биосенсоров с целью мониторинга качества питьевых, поверхностных, минеральных, грунтовых и сточных вод [20,21,14–16].

Биосенсоры на основе люминесцирующих бактерий становятся чрезвычайно важными биоаналитическими приборами в различных областях экологии, медицины и фармации и являются потенциальными кандидатами для мониторинга состояния окружающей среды в режиме on-line [22-25].

Перспективы развития биосенсоров на основе бактериальной биолюминесценции позволяют прогнозировать их успешное внедрение в практику экологических, производственных, санитарно-гигиенических и научно-исследовательских лабораторий для определения токсичности различного рода веществ.

### 2.4. Биосенсорный штамм *B. subtilis* 168 pNKdinC

В данной работе использовался цельноклеточный lux-биосенсор на основе типовой грамположительной бактерии *B. subtilis* 168.

*B. subtilis* (сенная палочка) — вид грамположительных спорообразующих аэробных бактерий, представителей рода *Bacillus*. *B. subtilis* имеет вид бесцветной прямой палочки, размером примерно 0,7 мкм в толщину и 2—8 мкм в длину. Часто



штаммы этих бактерий применяются в качестве действующего компонента лекарственных препаратов, входят в состав пищевых добавок (пробиотиков), используются в растениеводстве для борьбы с грибковыми и бактериальными болезнями растений [26].

Цельноклеточным биосенсором называется генномодифицированная бактерия с репортерным геном под контролем регуляторного элемента.

В данном исследовании использовался биосенсорный штамм *B. subtilis* 168 pNKdinC, содержащий в себе плазмиду (рис. 1) с генами люминесценции *luxABCDE* из *Photorhabdus luminescens* с измененной последовательностью генов под контролем промотора к гену *dinC* из *B. subtilis*, индуцирующегося при повреждениях ДНК и являющегося частью SOB-регулона (аналог SOS-регулона у *E. coli*), гены резистентности к хлорамфениколу, ампициллину, триметоприму и 2 ориджина репликации из *E. coli* и *B. subtilis* [27].

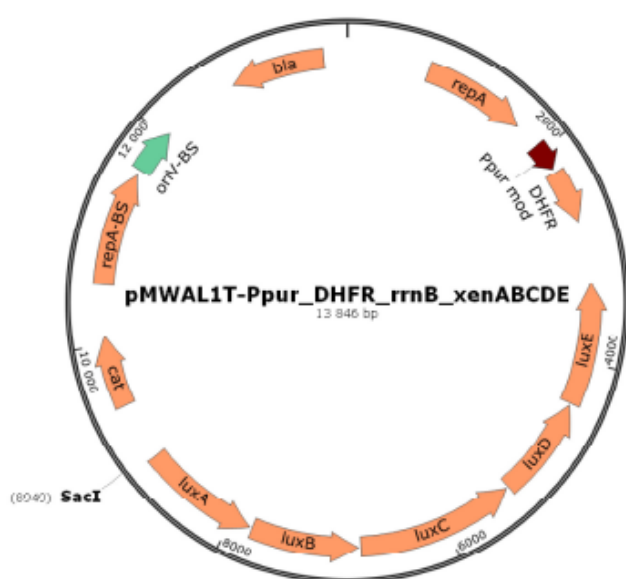


Рис. 1. Карта плзмиды pPL\_ABCDExen.

Цельноклеточные биосенсоры с генами бактериальных *lux*-оперонов широко применяются для исследования токсических свойств различных сред и отдельных химических компонентов. Разработка аналогичных технологий для экспресс-детектирования присутствия бактерий, обладающих QS («quorum sensing»)

регуляцией, (например, *A. salmonicida*) может быть актуальна для сельскохозяйственной промышленности [12].

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Штамм: *B. subtilis* 168 *trp*-

#### 3.2. Плазмида: pNKdinC

#### 3.3. Реактивы и питательные среды

В качестве контрольного генотоксичного вещества использовался Mitomycin C (sigma, США), который приводит к образованию внутринитевых и межнитевых сшивок ДНК (рис. 2).

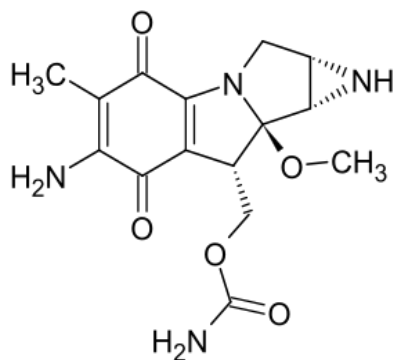


Рисунок 2. Структурное строение Mitomycin C.

Использовалась питательная среда ВНИ (brain heart infusion) и антибиотик хлорамфеникол в концентрации 12 мкг/мл.

#### 3.4. Оборудование и условия проведения

Измерения люминесценции проводились на люминометре БИОТОКС-7 (ООО «БиоФизТех»).

Исследования проводились на базе научно-исследовательской экспедиции «Полярный круг 2021» на о. Оленевский (Карелия) проекта «Молодёжные образовательные экспедиции» [28]. Экспедиция проводилась с 3 по 29 июля 2021 на необитаемом острове Оленевский, Чернореченской губы, Кандалакшского залива, Белого моря (рис. 3).

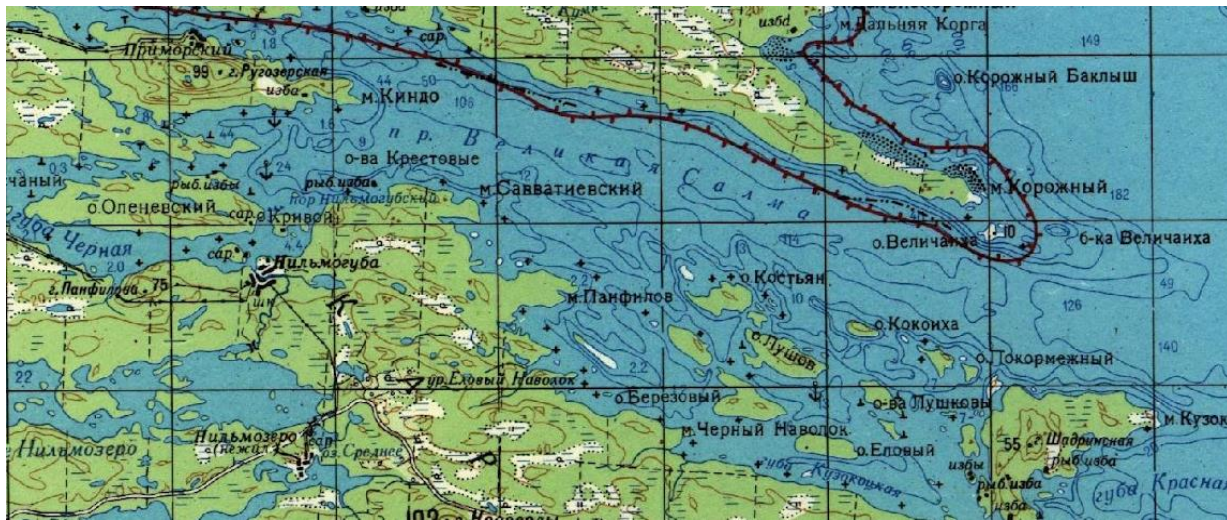


Рисунок 3. о. Оленевский, Чернореченской губы, Кандалакшского залива, Белого моря (Карелия).

### 3.5. Пробы для исследования

Проба №1 – песок с литорали;

Проба №2 – песок, предположительно загрязненный бензином;

Проба №3 – песок с содержанием золы;

Проба №4 – гумусная почва из леса;

Проба №5 – песок, потенциально загрязнённый горюче-смазочными веществами;

Проба №6 – песок с места сжигания мусора;

Проба №7 – гумусная почва с песком.

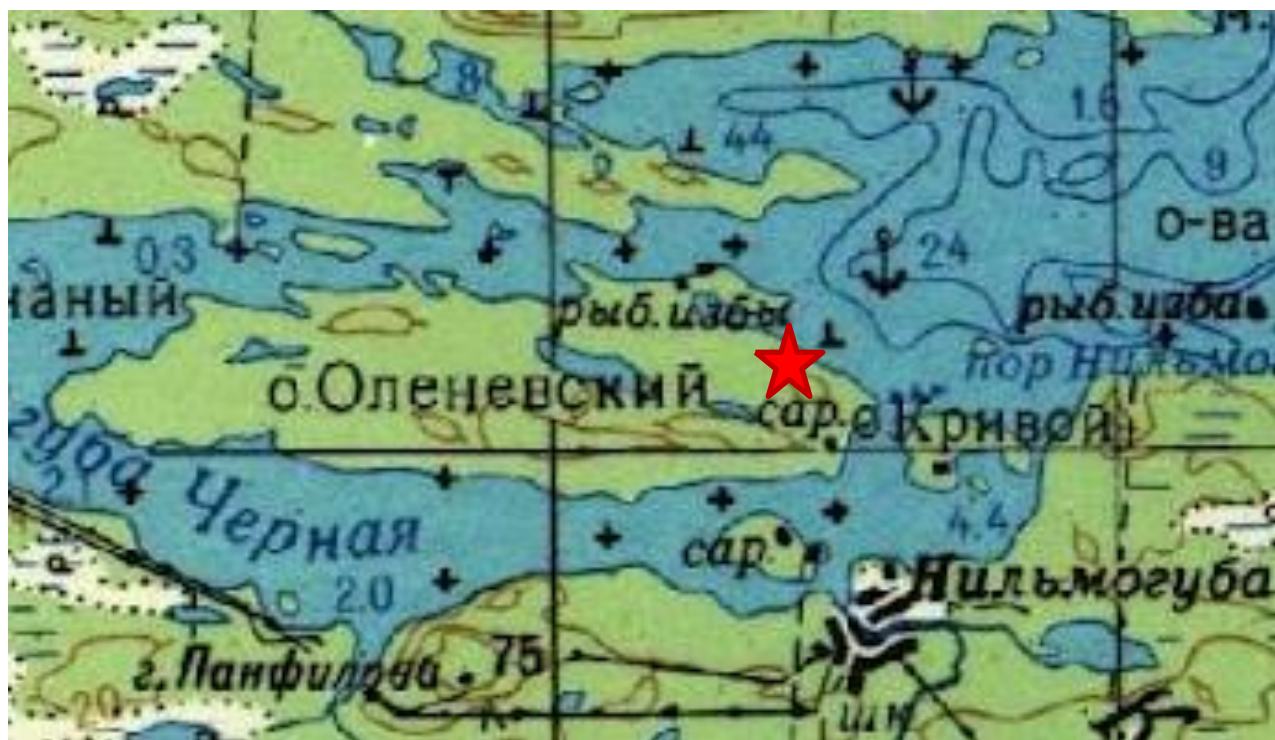


Рисунок 4. Место сбора исследуемых образцов.

### 3.6. Методика

Биосенсорные клетки выращивались в жидкой среде на протяжении ВНИ с добавлением антибиотика хлорамфеникола в концентрации 12 мкг/мл 18-30 часов при температуре +16-+20 °С до оптической плотности ~0,3-0,6.

В эксперименте с надосадочными жидкостями от почв, измерения ставились с объёмом клеток 200 мкл. К образцам почвы добавлялась вода и к клеткам добавлялась надосадочная в объёме 20 мкл. Измерения люминесценции проводились на люминометре каждые 40 минут.

В эксперименте с почвами, внесёнными напрямую в пробирку с биосенсором.

1. В пробирки на 1,5 мл внести по 200 мкл клеток;
2. Внести ~100 мг образца почвы (на каждый образец почвы по 2 таких пробирки);
3. Для каждого образца почвы в одну пробирку из двух вносится Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М.

Эксперимент проводился при температуре +25 – +30°C. Измерения люминесценции проводились на люминометре каждые 40 минут.

Для исследования работы биосенсора с надосадочными жидкостями от почв взяты пробы №1, №2, №3, №4. Биосенсорная культура выращивалась при 20°C в жидкой среде ВНИ без аэрации до оптической плотности ~0,3.

Для исследования работы биосенсора с почвами, внесёнными напрямую в пробирку с биосенсорными клетками был поставлен эксперимент с пробами №1, №2, №4, №5, №6, №7, проба №3 не участвовала, так как представляет собой смесь почвы и золы. Биосенсорная культура выращивалась при 30°C в жидкой среде ВНИ без аэрации до оптической плотности ~0,6.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проделанных исследований были составлены графики и гистограмма, приведённые ниже.

### 4.1. Исследование работы биосенсора с надосадочными жидкостями от почв

Из рисунка 5 видно, что индукцию биосенсора вызывают образцы с добавлением контрольного токсиканта. Исследуемые биосенсорные клетки с добавлением почвенных субстратов индукцию не вызвали. Среднее время ответа 50 минут.

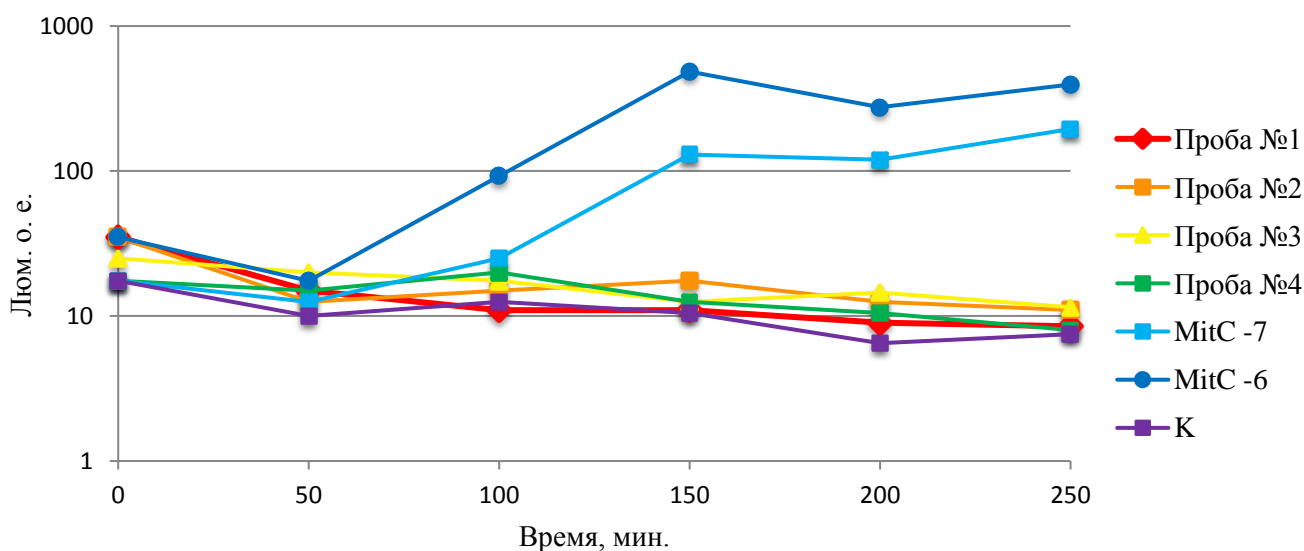


Рисунок 5. График зависимости люминесценции от времени.

Проба №1 – биосенсорные клетки с добавлением песка с литорали; проба №2 – биосенсорные клетки с добавлением песка, предположительно загрязненного бензином; проба №3 – биосенсорные клетки с добавлением песка с содержанием золы; проба №4 – биосенсорные клетки с добавлением гумусной почвы из леса; MitC -7 – биосенсорные клетки с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-7}$  М; MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; К – отрицательный контроль, т. е. биосенсорные клетки. Фоновая люминесценция: 2-6 о. е.



## 4.2. Исследование работы биосенсора с почвами, внесёнными напрямую в образец

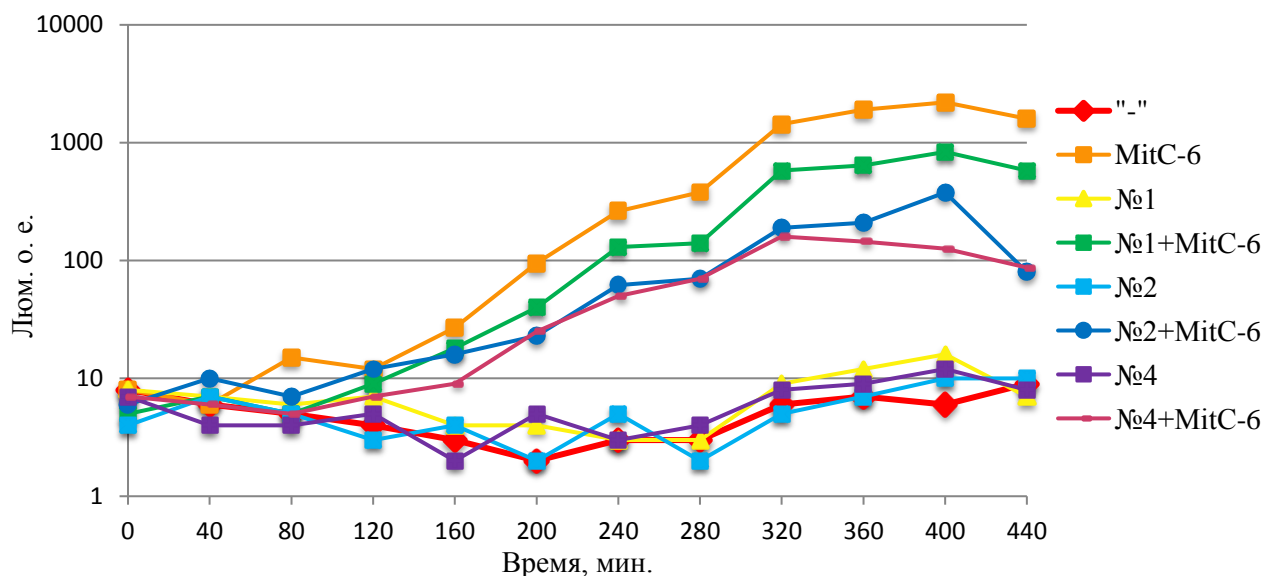


Рисунок 6. График зависимости люминесценции от времени.

«-» - отрицательный контроль, т. е. биосенсорные клетки; MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; №1 – биосенсорные клетки с добавлением песка с литорали; №1+MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением песка с литорали и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; №2 – биосенсорные клетки с добавлением песка, предположительно загрязненного бензином; №2+MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением песка, предположительно загрязненного бензином, и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; №4 – биосенсорные клетки с добавлением гумусной почвы из леса; №4+MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением гумусной почвы из леса и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М. Фоновая люминесценция: 1-3 о. е.

На рисунке 6 видно, что индукцию вызвали клетки с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М и все биосенсорные клетки с добавлением почвенных образцов и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М. Таким образом, самые высокие показатели наблюдались у образца биосенсорных клеток с добавлением Mitomycin C без почвенного образца в концентрации  $10^{-6}$  М и составляли 2200 о. е. Среднее время ответа 120 минут.



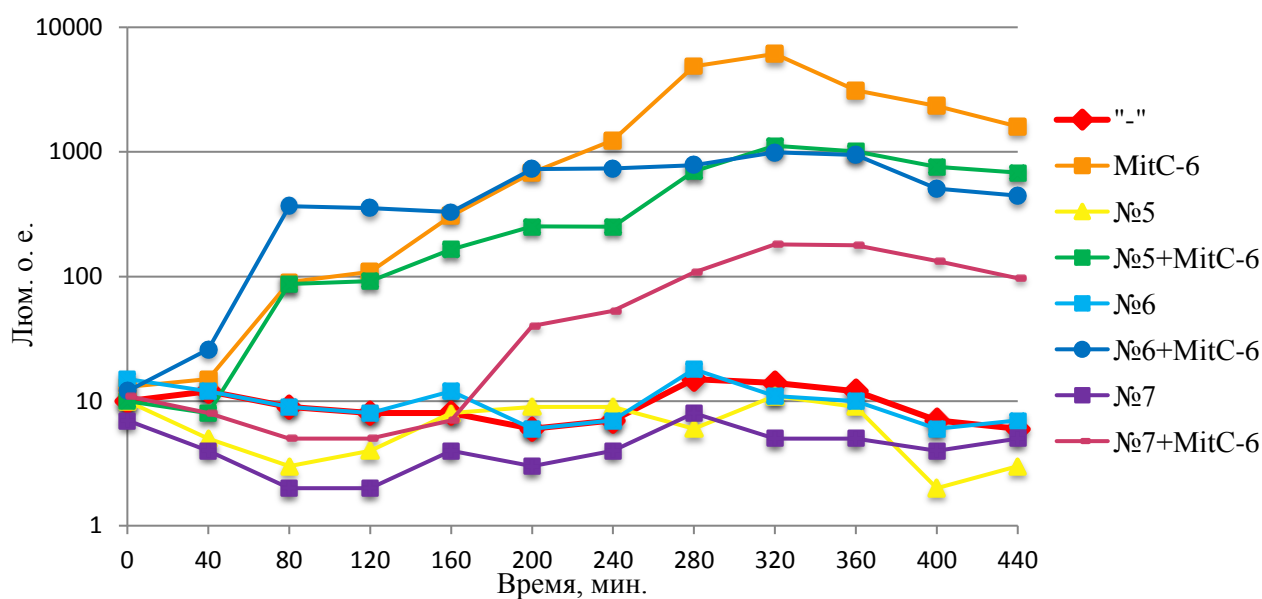


Рисунок 7. График зависимости люминесценции от времени.

«-» - отрицательный контроль, т. е. биосенсорные клетки; MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; №5 – биосенсорные клетки с добавлением песка, потенциально загрязнённого горюче-смазочными веществами; №5+MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением песка, потенциально загрязнённого горюче-смазочными веществами, и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; №6 – биосенсорные клетки с добавлением песка с места сжигания мусора; №6+MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением песка с места сжигания мусора и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; №7 – биосенсорные клетки с добавлением гумусной почвы с песком; №7+MitC -6 – биосенсорные клетки с добавлением гумусной почвы с песком и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М. Фоновая люминесценция: 2-6 о. е.

Из рисунка 7 видно, что индукцию вызвали клетки с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М и все биосенсорные клетки с добавлением почвенных образцов и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М. Таким образом, самые высокие показатели наблюдались у образца биосенсорных клеток с добавлением Mitomycin C без почвенного образца в концентрации  $10^{-6}$  М и составляли 6113 о. е. Среднее время ответа 40 минут.

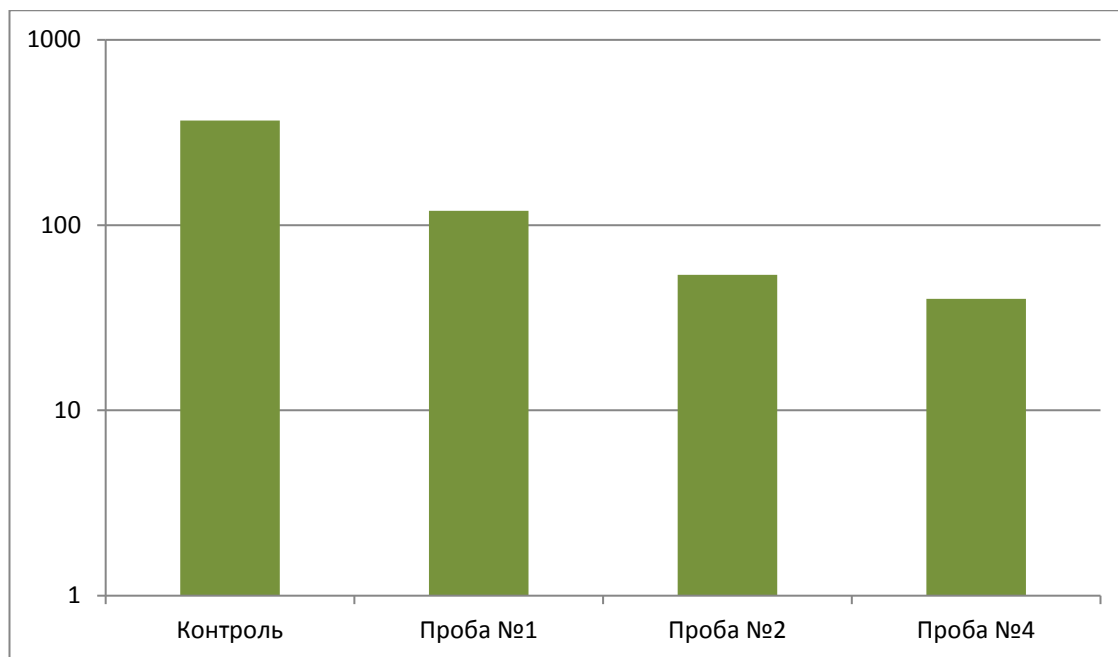


Рисунок 8. Гистограмма, показывающая амплитуду ответа исследуемых проб. Логарифмическая шкала.

Контроль – амплитуда ответа отрицательного контроля, т. е. биосенсорных клеток, и биосенсорных клеток с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; Проба №1 – амплитуда ответа биосенсорных клеток с добавлением песка с литорали и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; Проба №2 – амплитуда ответа биосенсорных клеток с добавлением песка, предположительно загрязнённого бензином, и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; Проба №4 – амплитуда ответа биосенсорных клеток с добавлением гумусной почвы из леса и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М.

Из приведённой выше гистограммы (рис. 8) видно, что максимальная амплитуда ответа составила 370 раз, которая наблюдалась у биосенсорных клеток с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М. Минимальная амплитуда ответа наблюдалась у биосенсорных клеток с добавлением гумусной почвы из леса и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М и составила 40 раз.

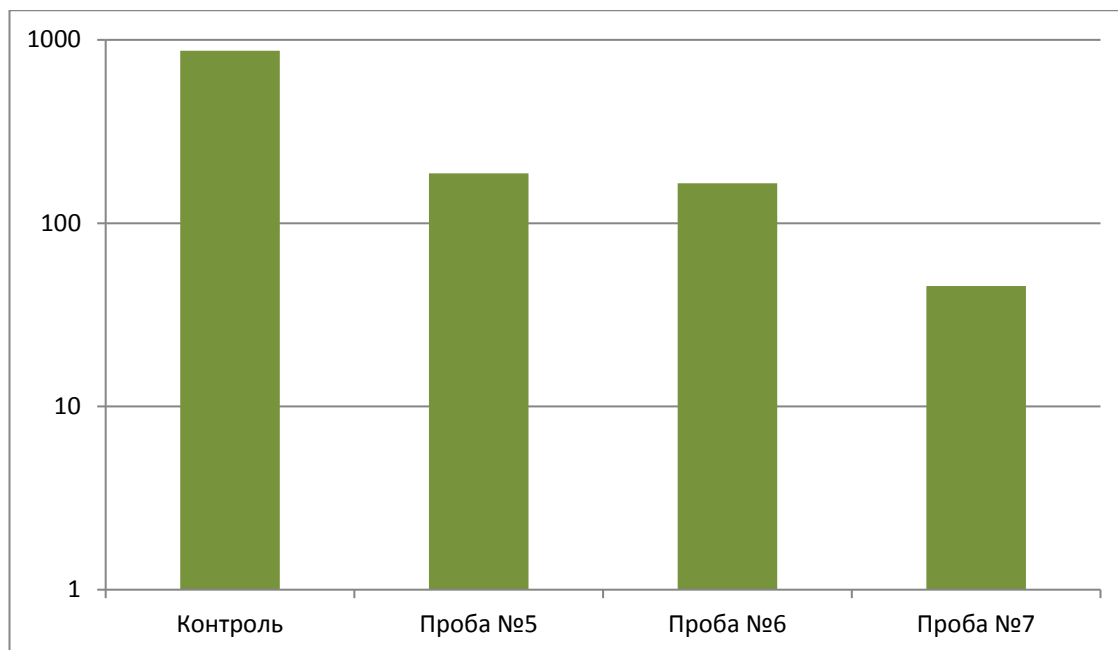


Рисунок 9. Гистограмма, показывающая амплитуду ответа исследуемых проб. Логарифмическая шкала.

Контроль – амплитуда ответа отрицательного контроля, т. е. биосенсорных клеток, и биосенсорных клеток с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; Проба №5 – амплитуда ответа биосенсорных клеток с добавлением песка, потенциально загрязнённого горюче-смазочными веществами, и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; Проба №6 – амплитуда ответа биосенсорных клеток с добавлением песка с места сжигания мусора и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М; Проба №7 – амплитуда ответа биосенсорных клеток с добавлением гумусной почвы с песком и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М.

Из приведённой выше гистограммы (рис. 9) видно, что максимальная амплитуда ответа составила 870 раз, которая наблюдалась у биосенсорных клеток с добавлением Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М. Минимальная амплитуда ответа наблюдалась у биосенсорных клеток с добавлением гумусной почвы из леса и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М и составила 45 раз.

### 4.3. Обсуждение

Исследования показали, что биосенсорный штамм *B. subtilis* 168 pNKdinC можно эффективно использовать для исследований почвы с поправкой на рассеивание и поглощение света частицами почвы. Так, например, мы можем

наблюдать, что показатели у биосенсорных клеток с добавлением гумусной почвы из леса и Mitomycin C в концентрации  $10^{-6}$  М сравнительно ниже показателей других образцов, так как частицы гумусной почвы больше и темнее, следовательно, их светопоглощающая способность выше. Подобные различия биосенсорных клеток с добавлением разных почв объясняется разницей в количестве и размере почвенных частиц в исследуемых пробах. Следует отметить, что несмотря на экранирование люминесценции почвенными частичками, амплитуда ответа биосенсора составляет как минимум 40 раз, что является достаточным для определения генотоксичных соединений непосредственно в почве. Таким образом, гипотеза о том, что с помощью биосенсорного штамма *B. subtilis* 168 pNKdinC почвенные субстраты могут быть исследованы на содержание генотоксичных веществ, подтвердилась.

В ходе исследования почвы о. Оленевский было проведено два эксперимента, в результате чего генотоксичные вещества не были обнаружены.

## **5. ВЫВОДЫ**

1. Биосенсорный штамм *B. subtilis* 168 pNKdinC можно потенциально использовать для детекции генотоксичных веществ в почве с поправкой на экранирование люминесценции более темными почвенными частицами;
2. По результатам применения штамма *B. subtilis* 168 pNKdinC генотоксичных веществ в почве на о. Оленевский не обнаружено.

## **6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Личный вклад участника заключается в отборе исследуемых почвенных образцов, пробоподготовке, проведении всех экспериментов, перечисленных в работе, оформлении рукописи. Все эти работы проводились под контролем научных руководителей.

Материалы данной работы уже опубликованы в статье «Constructing of *B. subtilis*-Based Lux-Biosensors with the Use of Stress-Inducible Promoters» международного журнала International Journal of Molecular Science [14].

В данный момент продолжается работа по изучению эффективности *lux*-биосенсоров, сконструированных на основе генетически модифицированных бактерий *B. subtilis* и *E. coli*, в качестве детекторов генотоксичных веществ в почве и иле. Уже идёт исследование проб, отобранных в районе выбросов очистных сооружений и свалок Калужской области, где, предположительно, могут быть обнаружены генотоксичные вещества.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Vollmer C. A., Van Dyk T. K. Stress responsive bacteria: biosensors as environmental monitors // *Adv. Microb. Physiol.* — 2004;
2. Патент США № 5683868, C12Q1/68;
3. Koyun A., Ahlatcioğlu E., İpek Y.K. Biosensors and their principles / A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones / Ed. Kara S. InTech, 2012;
4. Thouand G. Microorganisms for analysis Конституция РФ. - <http://www.constitution.ru/>;
5. Jouanneau S., Durand M.J., Thouand G. Online detection of metals in environmental samples: Comparing two concepts of bioluminescent bacterial biosensors // *Environ. Sci. Technol.*, 2012;
6. Leitgib L., Kalman J., Gruiz K. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites // *Chemosphere*, 2007;
7. Проект «Молодёжные образовательные экспедиции» - <https://www.expeditions.ru/>;
8. Galluzzi L., Karp M. Whole cell strategies based on lux genes for high throughput applications toward new antimicrobials // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* — 2006;
9. Gu M. B., Mitchell R. J., Kim B. C. Whole cell-based biosensors for environmental biomonitoring and application // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* — 2004;
10. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;
11. Ю. В. Плеханова, А. Н. Решетилов, “Микробные биосенсоры для определения пестицидов”, ИКЦ “Академкнига”, 2019 г.;
12. Звягинцев Д. Г., Умаров М. М., Чернов И. Ю. «Микробные сообщества и их функционирование в процессах деградации и самовосстановления почв // Деградация и охрана почв», Наука, 2002;

13. Орлов Д. С., Садовником Л. К., Лозановская И. Н. «Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении», Высшая школа, 2001;
14. A. G. Kessenikh, U. S. Novoyatlova, S. V. Bazhenov, E. A. Stepanova, S. A. Khrulnova, E. Yu. Gnuchikh, V. Yu. Kotova, A. A. Kudryavtseva, M. V. Bermeshev, I. V. Manukhov «Constructing of Bacillus subtilis-Based Lux-Biosensors with the Use of Stress-Inducible Promoters», International Journal of Molecular Sciences, 2021;
15. Deryabin D.G. «Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects». Moskva: Nauka, 2009;
16. Abbas M., Adil M., Ehtisham-Ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G.A., Tahir M. A., Iqbal M. Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review // Science of the Total Environment, 2018;
17. Deryabin D.G., Aleshina E.S. Effect of salts on luminescence of natural and recombinant luminescent bacterial biosensors // Applied Biochemistry and Microbiology, 2008;
18. Mangwani N., Dash H.R., Chauhan A., Das S. Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology // J. Mol. Microbiol. Biotechnol, 2012;
19. Deryabin D.G., Aleshina E.S. Natural and recombinant luminescent microorganisms in biotoxicity testing of mineral waters // Applied Biochemistry and Microbiology, 2008;
20. Ismailov A D., Aleskerova L.E. Photobiosensors containing luminescent bacteria review // Biochemistry (Moscow), 2015;
21. Danilov V.S., Zarubina A.P., Iroshnikov G.E. Sensor bioluminescent system based on lux-operons of different types of luminescent bacteria // Vestnik MGU seriya Biologiya, 2002;
22. Kokkali V., Delft W. Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples // TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014;
23. Eltzov E., Marks R.S. Whole-cell aquatic biosensors // Anal Bioanal Chem, 2011;
24. Affi M., Sollic C., Legentilhomme P., Comiti J., Legrand J., Jouanneau S., Thouand G. Numerical modeling of the dynamic response of a bioluminescent bacterial biosensor // Anal Bioanal Chem, 2016;

25. Erzinger G.S., Schmoeller F., Pinto L.H., Américo L., Hemmersbach R., Hauslage J., Häder D-P. 12-Bioluminescence systems in environmental biosensors // *Bioassays Advanced Methods and Applications*, 2018;
26. Исток-система Гастроскан, «*Bacillus subtilis* (сенная палочка)» -  
<https://www.gastroscan.ru>
27. Хазиев Ф. Х., Тишкина Е. М., Киреева Н. А., Кузяхметов Г. Г. «Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты агроэкосистемы», *Агрохимия*, 1988;
28. Polakovič M., Švitel J., Bučko M., Filip J., Neděla V., Ansorge-Schumacher M.B., Gemeine P. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications // *Biotechnology Letters*, 2017;