

УДК 557.21:579.834.114:616.98-07

И. А. Лавриненко, В. А. Лавриненко

Научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН
ул. Акад. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия
Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: val@fen.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Индустриализация и новые технологии не только сделали жизнь человека удобной и комфортной, но и создали различные угрозы для его здоровья. Для оценки степени негативных воздействий на природу научные и общественные организации осуществляют экологический мониторинг – наблюдение и контроль изменений в экологических системах. Одной из важных проблем, стоящих перед Россией и рядом ведущих стран мира, является загрязнение окружающей среды отходами космической деятельности. Негативное влияние загрязнения почвы, воды и воздуха компонентами ракетного топлива в районах сброса первых ступеней ракетносителей приводит к значительному риску для здоровья людей.

В экологическом мониторинге активно используются различные химические, физико-химические и биологические методы анализа. Необходимо отметить, что аналитические методы, применяемые для измерения уровня экотоксикантов в организме человека и окружающей среде (спектроскопические, нейтронно-активационный, электрохимические методы, газовая хроматография, хроматография высокого давления, ЯМР- и масс-спектрометрия), требуют дорогостоящего оборудования, квалифицированного персонала и не пригодны для рутинного анализа [1; 2]. Они не дают и прямой информации о биологической опасности ксенобиотиков. Более того, химические и физико-химические методы имеют тенденцию переоценивать «биодоступность» экотоксикантов, так как многие металлы и ксенобиотики находятся в окружающей среде в нерастворимой форме, а такие со-

единения представляют только потенциальный риск для здоровья человека [3].

Совершенно очевидно, что ответ на вопрос об опасности экотоксикантов для организма могут дать только биологические методы. Поэтому в последние годы целью многих исследований является разработка простых и адекватных биосенсорных методов для оценки токсического воздействия химических и физических факторов окружающей среды на живую клетку.

В последние годы, наряду с биосенсорами электродного типа, для оценки токсических свойств образцов из окружающей среды широкое распространение получили так называемые цельноклеточные биосенсорные тест-системы. Они представляют собой живые клетки (микро- или высших организмов) и дают измеряемый продукт своей геномной деятельности в присутствии исследуемых соединений. Микробные биосенсоры имеют многочисленные преимущества в экологическом тестировании. Культивирование микроорганизмов дешевле по сравнению с культурами высших организмов, они могут быть получены в больших количествах, подвергнуты более строгому контролю, чем клетки высших организмов и сравнительно легко сохраняются. Биосенсоры (микробные клетки) трансформированы плазмидами, которые искусственно созданы генно-инженерными методами. Такие плазмиды имеют в своем составе промотор, отвечающий на воздействие экотоксиканта, и ген, находящийся под контролем этого промотора. При индукции промотора экотоксикантом включается транскрипция гена, на котором синте-

зируется РНК, и кодируемый этой РНК репортерный белок, который должен легко детектироваться [4]. Оказалось, что цельноклеточные биосенсоры быстро отвечают на наличие экотоксикантов и в этом качестве превосходят физико-химические и аналитические процедуры. Так, использование цельноклеточных биосенсоров не ограничивается только анализом экотоксикантов, но и дает метод изучения экспрессии генов и анализ микробной экологии в комплексном окружении различных токсических соединений и микробных сообществ [5]. Такие тест-системы позволяют, например, проводить как мониторинг окружающей среды в районах проведения пусков ракет и хранения компонентов ракетного топлива (КРТ), так и устанавливать новые критерии для изучения прямого повреждающего воздействия на геном клетки физических и химических факторов, сопровождающих такие запуски.

Репортерные гены, используемые в конструкциях биосенсоров. В настоящее время в биосенсорах используется несколько типов репортерных генов. Среди них, ген *lac Z E. coli*, кодирующий β -галактозидазу, которая превращает ряд субстратов в различные цветные продукты, которые легко могут быть измерены. Анализ β -галактозидазы достоверен, дает количественные результаты. Создано значительное количество биосенсоров на основе гена *lac Z* [6–14]. К определенным неудобствам этой системы, однако, следует отнести то, что оценка β -галактозидазы требует экстракции этого фермента из клетки и проведения последующего анализа [10]. Поэтому в настоящее время более популярны биосенсорные тест-системы на основе генов, обеспечивающих люминесценцию при проведении анализа. Примером применения генов, ответственных за люминесценцию, является использование люциферазных генов *lux* (из морских бактерий *Vibrio fischeri*) и *luc* (из светлячка *Photinus pyralis*). Эти гены были выбраны потому, что существует прямая связь между метаболической активностью клеток и их флуоресценцией. Следовательно, биолюминесценция – быстрый показатель метаболической активности клеток. Измерение биолюминесценции может быть применено для измерения широкого круга экотокси-

кантов. Свет легко измерять в реальном времени и даже в автоматическом режиме, что позволяет тестировать множество образцов. Более того, можно проводить продолжительное тестирование, что делает реальную оценку как острой, так и хронической токсичности. Системы для оценки флуоресценции люциферазной активности, как правило, включали *lux CDABE* оперон из *Vibrio fischeri* или оперон *lux CDABFE* из *Photobacterium leiognathi* и ген *lux AB* из *Vibrio harveyi*, кодирующий люциферазу [15–31]. В отличие от β -галактозидазы, измерение света производится *in situ* с помощью люминометра или сцинтилляционного счетчика. Недавно чрезвычайно широкое распространение в качестве репортерного гена получил зеленый флуоресцирующий белок (*GFP*) из медузы *Aequorea victoria*, обитающей в северо-западной части Тихого океана [32–34]. Оптимальным оказалось то, что *GFP* является долгоживущим (48 часов) и не токсичным для клеток белком. Это является важным обстоятельством при проведении биосенсорного анализа, так как позволяет накопить в бактериальной клетке значительное количество люминесцирующего белка даже при использовании слабых промоторов и низкой метаболической активности клеток. После возбуждения флуоресценции путем освещения синим светом (395–488 нм) клеток, содержащих белок *GFP*, происходит эмиссия в зеленой области спектра (510–520 нм). Белок *GFP* не нуждается в субстратах, кофакторах, АТФ, дает высокий квантовый выход. При этом хромофор белка *GFP*, формируется в течение 1,5–2 часов из трех аминокислот: серина, тирозина, глицина. Бактерии, содержащие белок *GFP*, могут детектироваться как обычным флуорометром, так и на уровне одной клетки, например, методами эпифлуоресцентной микроскопии [35; 36] и проточной цитофлуорометрии [37].

Другими генами, дающими флуоресцирующие продукты, является *cobA* ген из *Propionibacterium freudorenchii* и *DSRed* ген из коралла *Discosoma sp.* Первый ген кодирует уропорфириноген III метилтрансферазу, при синтезе которой в значительных количествах происходит аккумуляция триметилированных компонентов, которые дают сильную красную эмиссию при освещении

ультрафиолетом или синим светом [38], а *DSRed* ген кодирует флуоресцентный белок *DSRed* с 30 % гомологией с *GFP*. Зрелый белок *DSRed* дает красную эмиссию [39]. Использование красного флуоресцирующего белка ограничено тем, что его хромофор имеет период созревания от нескольких часов до нескольких дней. Оба гена могут быть использованы в *E. coli* вместе с *GFP*. Это обеспечивает более детальную информацию об экспрессии различных генов одновременно, и поэтому эти белки являются хорошими кандидатами на роль репортерных генов.

Неспецифические цельноклеточные биосенсоры. Все эти биосенсоры можно условно разделить на 3 класса: неспецифические, полуспецифические (реагирующие на стресс) и специфические биосенсоры. Независимо от типа применяемого репортерного белка, неспецифические биосенсоры включают генетическую конструкцию, которая в случае ее «поломки» реагирует путем понижения синтеза репортерного белка (отрицательная регуляция). Хотя данная система может реагировать на повреждение ДНК клетки экотоксикантами, она не дает сведений о характере генетических повреждений. Во многих исследованиях, для того чтобы оценить присутствие в среде токсических компонентов, использованы бактерии, конститутивно экспрессирующие гены *lux* *CDABE* оперона. Эти подходы реализованы в системе Microtox [40], в которой используются морские флуоресцирующие бактерии *Vibrio fischeri*, которые не подвергаются токсическому воздействию компонентов окружающей среды в обычных условиях своего существования. Мера падения световой эмиссии из этих клеток отражает ингибиторный эффект соединений или образцов окружающей среды, добавленных к бактериям. Впоследствии подобные тест-системы были созданы на основе бактерий *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* [28]. Такие измерения неспецифичны, поскольку любые условия, понижающие метаболическую активность биосенсорной линии, будут приводить к подавлению образования света (например, pH, ионная сила, металлы и ксенобиотики). Это делает очень затруднительной оценку природы экотоксикантов и, в целом, тяжести эколо-

гической проблемы. Тем не менее неспецифические сенсоры использовались на практике для оценки токсичности таких различных токсических соединений, как окись азота [41], металлы [42], ксенобиотики [42] и тетрациклины [43].

Цельноклеточные биосенсоры для оценки стрессовых воздействий на клетку. Большой интерес представляют полуспецифические, индуцируемые стрессовыми воздействиями цельноклеточные биосенсорные тест-системы. Среди тест-систем данного типа наиболее интересными оказались бактериальные биосенсоры, основанные на принципе оценки повреждения ДНК, происходящего под действием генотоксических соединений. Например, такие репарирующие ДНК системы, как *SOS*-репарирующая система, *umu*-система, *ada*-система могут индуцироваться повреждениями ДНК, влияющими на ее структуру (сшивки цепей, делециями и инсерциями оснований, метилированием нуклеотидов и сахаро-фосфатного остова ДНК). При нормальных условиях гены *SOS*-ответа репрессированы *lexA* протеином. После повреждения ДНК клетки синтезируется и активируется *recA* протеин. Активированный *recA* белок приводит к саморасщеплению *lexA* репрессора и активирует несколько генов *SOS*-репарационного ответа, что исправляет повреждение ДНК. Активация репарирующей системы является показателем мутагенного действия на ДНК клетки различных химических и физических факторов. Поскольку многие из продуктов активации репарирующей системы трудно количественно оценить, необходим недорогой и экспрессный метод оценки действия мутагенов, повреждающего ДНК клетки. Несколько исследований было направлено на создание конструкций репортерных генов и промоторов, отвечающих на различные стрессорные воздействия: антимикробные препараты [44], γ - и УФ-излучение [45], генотоксины [1; 46–48], окислительный стресс [46; 48]. В репортерных генетических конструкциях использовались такие промоторы, как *recA*, *umuC*, *sulA*, *uvrA*, *cda* ген плазмиды *ColD*. Эти тесты дают прямой ответ о влиянии генотоксинов на живой организм (положительная регуляция). К таким системам относятся также разработанные в нашей лабо-

ратории биосенсоры, в которые включен промотор *recA*, входящий в систему SOS-репарации клетки и флуоресцирующий белок *GFP* [1]. Использование промоторов, отвечающих на стресс, осложняется тем фактом, что стрессовый ответ может сопровождаться запуском каскада ряда регуляторных метаболических циклов. Поэтому гены-химеры под управлением таких промоторов отвечают на стресс в широком диапазоне. Например, *katG::lux* биосенсор будет отвечать на все стрессовые воздействия, которые регулируются *oxyR* протеином (позитивным регулятором как минимум 9 различных генов). При этом воздействия могут быть такими различными, как пероксиды, спирты, табачный дым [46].

Вместе с тем применение стресс-чувствительных промоторных конструкций полезно при оценке известных экотоксикантов, детекции антимикробных и новых лекарственных препаратов. Некоторые стресс-индуцируемые биосенсоры пригодны для прогноза генотоксичности различных соединений. Как известно, главным экотоксикантом ракетного топлива является 1,1-диметилгидразин и КРТ, проявляющие ряд мутагенных и канцерогенных свойств [1]. КРТ, преодолевая «первый эшелон защиты» организма – гомеостатические механизмы детоксикации, вызывают поражение ряда органов, ингибируют основные биохимические реакции клеток, изменяют показатели системы крови и липидного обмена. Биотрансформация гидразинов в микросомах печени приводит к образованию супероксидных радикалов, оказывающих токсическое воздействие на клетки организма. Сравнительно немного, однако, известно о воздействии гидразинов непосредственно на геном клетки, что может быть ключевым звеном влияния КРТ на организм человека, в том числе и вызываемого ими канцерогенеза. В работе нашей лаборатории использовали клетки *E. coli* штамм *BL-21(DE3, recA⁺)*, которые трансформировали сконструированной плазмидой *pRTGFP2*. В данную плазмиду клонировали структурную область гена флуоресцирующего белка *GFP* под *recA* промотор из *Proteus mirabilis*. Мы изучили влияние некоторых мутагенов и компонентов ракетного топлива на индукцию синтеза белка *GFP*. Из этих данных

становится очевидно, что 1,1-диметилгидразин, налидиксовая кислота и митомицин С усиливают синтез белка *GFP*, что говорит о повреждении структуры или механизмов репликации ДНК под влиянием этих агентов (положительная регуляция)*. Биосенсорная тест-система для детекции повреждений геномной ДНК под влиянием КРТ может быть полезна для практического применения, так как дает возможность изучения непосредственного воздействия гидразинов на геном клетки [1].

Специфические цельноклеточные биосенсоры. Созданы биосенсоры, которые обеспечивают строго специфический ответ на экотоксиканты. Такие специфические биосенсоры основаны на транскрипционном слиянии между индуцируемыми промоторами (включая регуляторные гены, кодирующие репрессорный или активаторный протеин, отвечающие на определенные соединения) и различные репортерные гены. Ограничение в распространении таких биосенсоров определяются только наличием соответствующих промоторов, отвечающих на токсиканты. Известно, что гены, вовлекаемые в метаболические пути деградации определенных соединений из окружающей среды, – чаще всего регулируемые гены. В качестве промоторов ряда генов, вовлекаемых в деградацию ксенобиотиков, применяют промоторы, отвечающие на такие соединения, как фенолы [49], производные толуола [15], алканы [3], салицилаты [50]. Такие соединения обычны при загрязнении почвы и представляют риск при попадании в резервуары питьевой воды, водоносные слои воды и почву. Биосенсорная конструкция для контроля за производными толуола включала ген *luc*, соединенный с промотором *p_u* под контролем *XylR* активатора. Этот активатор связывает толуол и его производные и соответственно активирует *p_u* промотор. Исследования показали хорошую корреляцию между данными, полученными методами газовой хроматографии и биолюминесцентным анализом при таких определениях. Распространены промоторы, регулирующие ответ на различные металлы. Как

* См. результаты исследования И. А. Лавриненко и соавт. в данном выпуске журнала, с. 95–99.

известно, многие металлы токсичны для микроорганизмов даже в низких концентрациях. Чтобы уменьшить такую токсичность, в природе бактерии выработали различные гены устойчивости к металлам, которые строго регулируются и поэтому удобны в качестве биосенсоров. Цельноклеточные биосенсоры разработаны для оценки наличия в среде алюминия, арсенита сурьмы, кадмия, хрома, меди, железа, свинца, никеля, ртути и цинка. Мониторинг содержания в окружающей среде тяжелых металлов чрезвычайно важен, так как многие тяжелые металлы высоко токсичны, накапливаются в пищевых цепях и плохо элиминируются из организма. Так, например, проверен уровень биодоступности металлов и влияния на микробиоценоз в почве и воде [26; 29; 31]. Конструкция биосенсора, созданного для этой цели, содержала в плазмиде химерную конструкцию *luxCDABE* гена и промотора p_{mer} в комбинации с регуляторным геном *merR*. Чувствительность биосенсорной конструкции была на пикомолярном уровне ионов Hg^{2+} . Кодированные продукты люминесцирующих генов широко использовались в качестве биосенсоров, когда изучались индуцибельные гены устойчивости к металлам. Применены и другие свойства специфических биосенсоров. Недавно разработаны биосенсоры для слежения за бактериальными коммуникационными молекулами бактерий N-ацилгомосерин лактонами. Это очень интересная новая область для изучения с помощью биосенсоров микробных биоценозов.

Применение биосенсоров для изучения бактериальной физиологии in situ. Биосенсоры пригодны для исследования экспрессии генов в микроорганизмах в их комплексном окружении, например таком, как почва [9]. В последнее время стало очевидно, что бактерии координируют взаимодействие с высшими организмами и между собой с помощью химического агента межклеточной коммуникации N-ацилгомосеринлактона. Когда концентрация этой сигнальной молекулы достигает пороговой величины, они взаимодействуют с транскрипционным активатором «R»-протеином и в таком комплексе активируют экспрессию генов-мишеней. Такая регуляторная система действует по принципу кворума,

что позволяет бактериям включать и экспрессировать гены-мишени в зависимости от «плотности» бактерий. Ген *luxI* кодирует белок, отвечающий за синтез N-(3-оксогексаноил)-L-лактон А гомосерина (3-ОГЛГ), а гены *luxA, B, C, D, E, G* – кодируют компоненты люциферазы (биолюминесценция). Другой ген *luxR* кодирует белок *luxR*, который связывает 3-ОГЛГ. Комплекс *luxR-3-ОГЛГ* взаимодействует с промоторным участком оперона *luxICDABEG* и активирует его транскрипцию. При отсутствии 3-ОГЛГ оперон функционирует на базовом, низком уровне. По мере повышения концентрации 3-ОГЛГ начинается лавинообразное возрастание синтеза люциферазы. Визуализация света от люциферазы может быть произведена без разрушения бактериальных клеток. Контаминированная ртутью вода не только дает с помощью биосенсоров сведения о наличии ртути, но и приводит к экспрессии генов *mer*, определяющих устойчивость микроорганизмов к ртути. Биодоступность ртути (биосенсор *merR-P_{mer}-luxCDABE*) измерялась в почвенном микрочосме, контаминированном различными количествами токсичных тяжелых металлов [29]. Исследование показало каскад эффектов, происходящих вследствие контаминации. Прежде всего это подъем числа устойчивых к ртути бактерий и падение разнообразия в содержащихся микроорганизмах. Это приводит к потере биодоступности ртути вследствие восстановления Hg^{2+} до металла, который, в свою очередь, испаряется из почвы. Такое восстановление – обычная судьба ионов ртути, определяемое действием в микроорганизмах генов устойчивости к ртути, таких как *merTCPA* из *Tn21*. Когда биодоступность ртути исчезает, число устойчивых к ртути бактерий и их разнообразие возвращается к нормальному уровню.

Биодоступность. Все биосенсоры являются потенциальными детекторами биодоступности различных химических компонентов или мониторинга специфических экологических условий. Общая концентрация различных химических соединений может значительно отличаться от биодоступных количеств контаминантов [29; 31]. Критическим параметром в определении токсичности является биоаккумулятивный потен-

циал и биоосвобождение (bioremediation) от металлов и других контаминантов. Степень биодegradации токсических компонентов напрямую зависит от биодоступности этих соединений для микроорганизмов и их дeградационных систем. Чем сложнее экологическое окружение, тем большее различие может существовать между доступной концентрацией контаминирующих соединений и действительной концентрацией химических препаратов. Использовано определение биодоступности ртути в почве как пропорции ионов металла в воде [29].

Определение биодоступности соединений в воде может быть проведено без изменения состояния растворимости этих соединений *in situ*. Многие исследования были проведены с биосенсорами в воде. Тем не менее если исследуется содержание контаминантов в почве, то необходимо разбавление и экстракция компонентов [17]. Эти процедуры могут изменить растворимость и поэтому биодоступность токсических соединений или металлов. Один из путей преодоления такого осложнения продемонстрирован в работе А. М. Chaudí и соавт. [19]: авторы использовали бактерию *Pseudomonas putida* с клонированным конститутивно экспрессируемым опероном *luxCDABE*, чтобы оценить острую токсичность растворимого в воде (содержащейся в порах почвы) цинка. Это исследование показало, что биодоступная фракция цинка составляет 1,3–4,4 % в зависимости от количества добавленного цинка. Биодоступность остается неопределенным параметром, который зависит от используемого микроорганизма и примененных экспериментальных подходов. Найдено, что различные линии оказываются неодинаково чувствительными к металлам [27; 28]. Выбор репортерной линии должен поэтому отражать цель исследования и окружающую среду, в которой это исследование проводится. Так как *E. coli* не является природным микроорганизмом ни для почвы, ни для морской среды обитания; использование этого микроорганизма для целей экологического мониторинга проблематично, и, по-видимому, необходима разработка биосенсоров на основе природных микроорганизмов.

Научные перспективы. Многие разработки используются в технологии биосенсоров, например генетически модифициро-

ванных транскрипционных активаторов *DmpR*. Генетическая инженерия может изменить субстратную специфичность и увеличить чувствительность многих эффекторных молекул, таких как *MerR*, *TetR*, *XylR*, *ArsR*, *ScrR*. Вероятно, возможно изменение области промотор-операторного региона, чтобы РНК-полимераза и эффекторные протеины связывались независимо друг от друга, изменяя биосенсорный ответ. Тем не менее с экологической точки зрения нежелательно использовать измененные промотор-операторные районы и применять новые эффекторные белки. Одним из главных преимуществ цельноклеточных биосенсоров является то, что они отражают транскрипцию природных генов и поэтому характеризуют физиологию, транскрипцию, метаболизм бактерии *in situ*. Если область промотора изменяется, то его ответ не соответствует природному ответу. Тем не менее этот путь – единственный способ увеличения чувствительности промотора и соответственно усиления транскрипции и увеличения количества синтезируемого белка. Это приводит к необходимости создания более совершенных рибосом-связывающих участков, введение энхансеров и мест инициации транскрипции, а также другие подходы [29]. Биосенсоры могут быть полезны для изучения взаимодействия между членами микробиологического сообщества, например таких, как *S. rimosus* (продуцирующего тетрациклин), экскреции питательных веществ из корневых вершин растений, доступности различных веществ из пищеварительного тракта животных. Кажется очевидным, что будущее бактериальных сенсоров лежит не только в области определения количества токсических компонентов и разработки наборов для анализа, но и изучения микробной экологии *in situ*.

Заключение. В последние годы биосенсоры стали доступным методом детекции присутствия и определения биодоступных концентраций различных компонентов в природных образцах. В сравнении с соответствующими аналитическими методами, они имеют несколько преимуществ.

1. Биосенсоры определяют только биодоступную фракцию химических соединений, давая более точный ответ о токсичности этих соединений в природных условиях.

Биодоступность также является определяющим параметром при проведении биоремедиации окружающей среды. Если химические соединения биодоступны, они потенциально биодеградируемы.

2. Биосенсоры обеспечивают недорогой и простой путь определения загрязнений окружающей среды.

3. Использование интактных микроорганизмов обеспечивает стабильные условия определения.

4. Так как биосенсоры представляют собой живые клетки, они дают информацию о реальной токсичности различных соединений.

5. Некоторые стресс-индуцируемые биосенсоры дают информацию о мутагенном эффекте образцов экотоксикантов с большой чувствительностью.

6. Биосенсоры полезны в изучении генной экспрессии и физиологии бактерий в комплексном окружении.

Список литературы

1. *Development* of a biosensor test-system with *GFP* reporter protein for detection of DNA damages // I. A. Lavrinenko, V. A. Lavrinenko, A. V. Ryabchenko et al. // Bull. Exper. Biol. Med. 2006. Vol. 141. P. 33–35.
2. *VanHamme J. D. et al.* Recent advances in petroleum Microbiology / J. D. VanHamme, I. Singh, O. P. Ward // Microbiol. Mol. Biology Rev. 2003. P. 503–509.
3. *Sticher P. et al.* Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples / P. Sticher, M. Jaspers, K. Stemmler // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 4053–4060.
4. *Goh Y. Y. et al.* A novel fluorescent protein-based biosensor for gram negative bacteria / Y. Y. Goh, B. Ho, J. L. Ding // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 6343–6352.
5. *Application* of a *mer-lux* biosensor for estimating bioavailable mercury in soil / L. D. Rasmussen, S. J. Sorensen, R. R. Turner et al. // Soil. Biol. Biochem. 2000. Vol. 32. P. 639–646.
6. *Sensitive* biological detection method for tetracyclines using a *tetA-lacZ* fusion system / I. Chopra, K. Hacker, Z. Misulovin et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 1990. Vol. 34. P. 111–116.
7. *D'Haese E. et al.* Inhibition of beta-galactosidase biosynthesis in *Escherichia coli* by tetracycline residues in milk / E. D'Haese, H. J. Nelis, W. Reybroeck // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 4116–4119.
8. *Hansen L. H., Sorensen S. J.* Versatile biosensorvectors for detection and quantification of mercury // FEMS Microbiol. Lett. 2000. Vol. 193. P. 123–127.
9. *Hansen L. H., Sorensen S. J.* Detection and quantification of tetracyclines by whole-cell biosensors // FEMS Microbiol. Lett. 2000. Vol. 190. P. 273–278.
10. *Oxygen-sensing* reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil / O. Hojberg, U. Schnider, H. V. Winteler et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 4085–4093.
11. *Matz M. V. et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa species* / M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas // Nature Biotechnol. 1999. Vol. 7. P. 969–973.
12. *SOS-inducing* activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535 / pSK1002: Examination with 151 chemicals / S. I. Nakamura, Y. Oda, T. Shimada et al. // Mut. Res. 1987. Vol. 192. P. 239–246.
13. *SOS-chromotest* a direct assay of induction of an *SOS*-function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity / P. Quillardet, O. Huisman, R. D'Ari et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79. P. 5971–5975.
14. *Rouch D. A. et al.* Induction of bacterial mercury- and copper-responsive promoters-functional differences between inducible systems and implications for their use in gene-fusions for in vivo metal biosensors / D. A. Rouch, J. Parkhill, N. L. Brown // J. Ind. Microbiol. 1995. Vol. 14. P. 349–353.
15. *A chromo-somally based tod-lux-CDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) sensing / B. M. Applegate, S. R. Kehrmeyer, G. S. Saylor // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 2730–2735.
16. *Oxidative* stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG':lux* fusion / S. Belkin, D. R. Smulski, A. C. Vollmer et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62. P. 2252–2256.

17. Bundy J. G. et al. Application of bioluminescence-based microbial biosensors to the ecotoxicity assessment of organotins / J. G. Bundy, J. L. Wardell, C. D. Campbell // Lett. Appl. Microbiol. 1997. Vol. 25. P. 353–358.
18. Cai J., DuBow M. S. Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA) // Biodegradation. 1997. Vol. 8. P. 105–111.
19. Determination of acute Zn toxicity in pore water from soils previously treated with sewage sludge using bioluminescence assays / A. M. Chaudri, B. P. Knight, V. L. Barbosa-Jefferson et al. // Environ. Sci. Technol. 1999. Vol. 33. P. 1880–1885.
20. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples / P. Corbisier, D. Van der Lelie, B. Borremans et al. // Anal. Chim. Acta. 1999. Vol. 387. P. 235–244.
21. Use of luciferase genes as biosensors to study bacterial physiology in the digestive tract / G. Corthier, C. Delorme, S. D. Ehrlich et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 2721–2722.
22. Guzzo A., Dubow M. A *luxAB* transcriptional fusion to the cryptic *celF* gene of *Escherichia coli* displays increased luminescence in the presence of nickel // Mol. Gen. Genet. 1994. Vol. 242. P. 455–460.
23. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation / J. M. H. King, P. M. DiGrazia, B. Applegate et al. // Science. Vol. 249. P. 778–781.
24. Loper J. E., Lindow S. E. A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces // Appl. Environ. Microbiol. 1994. Vol. 60. P. 1934–1941.
25. Matrubutham U. et al. Bioluminescence induction response and survival of the bioreporter bacterium *Pseudomonas fluorescens* Hk44 in nutrient-deprived conditions / U. Matrubutham, J. E. Thonnard, G. S. Saylor // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. Vol. 47. P. 604–609.
26. Use of *lux*-based biosensors for rapid diagnosis of Pollutants in arable soils / G. Palmer, R. McFadzean, K. Killham et al. // Chemosphere. 1998. Vol. 36. P. 2683–2697.
27. Assessment of bioavailability of heavy metals using *lux* modified constructs of *Pseudomonas fluorescens* / G. I. Paton, C. D. Campbell, L. A. Glover et al. // Lett. Appl. Microbiol. 1995. Vol. 20. P. 52–56.
28. Development of an acute and chronic ecotoxicity assay using *lux*-marked *Rhizobium leguminosarum* Biovar *trifolii* / G. I. Paton, G. Palmer, M. Burton et al. // Lett. Appl. Microbiol. 1997. Vol. 24. P. 296–300.
29. Rasmussen L. D. et al. Cell-density-dependent sensitivity of a *mer-lux* bioassay / L. D. Rasmussen, R. R. Turner, T. Barkay // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 3291–3293.
30. Feasibility of using prokaryote biosensors to assess acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons / B. J. Reid, K. T. Semple, C. J. Macleod et al. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. Vol. 169. P. 227–233.
31. Selifonova O. et al. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment / O. Selifonova, R. Burlage, T. Barkay // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59. P. 3083–3090.
32. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria / J. B. Andersen, C. Sternberg, L. K. Poulsen et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. P. 2240–2246.
33. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms / D. Errampalli, K. Leung, M. B. Cassidy et al. // J. Microbiol. Methods. 1999. Vol. 35. P. 187–199.
34. Rational design of *gfp* mutants as biosensor for bacterial endotoxins / Y. Y. Go, V. Freser, B. How et al. // Protein engineering. 2002. Vol. 15. P. 493–502.
35. Stretton S. et al. Use of green fluorescent protein to tag and investigate gene expression in marine bacteria / S. Stretton, S. Techakarnjanaruk, A. M. McLennan // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 4. P. 2554–2559.
36. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein / R. Tombolini, D. J. Van der Gaag, B. Gerhardson et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 3674–3680.
37. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria / R. Tombolini, A. Unge, M. E. Davey et al. // FEMS Microbiol. Ecol. 1997. Vol. 22. P. 17–28.
38. Wildt S., Deuschle U. *cobA*, a red fluorescent transcriptional reporter for *Escherichia*

coli, yeast, and mammalian cells // Nature Biotechnol. 1999. Vol. 17. P. 1175–1178.

39. *The structure of the chromophore within DsRed, protein from coral* / L. A. Gross, G. S. Baird, R. C. Hoffman et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 7. P. 11990–11995.

40. *Bulich A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples* // Process Biochem. 1982. Vol. 17. P. 45–47.

41. *Bacterium-based NO₂ biosensor environmental application* / N. Nielsen, L. H. Larsen, M. Jetton et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. Vol. 70. P. 6551–6558.

42. *Biosensing 2,4-dichlorophenol toxicity during biodegradation by Burkholderia sp. RASC c2 in soil* / Y. Beaton, L. J. Shaw, L. A. Glover et al. // Environ. Sci. Technol. 1999. Vol. 33. P. 4086–4091.

43. *Gfeller K. et al. Rapid biosensor for detection of antibiotic-selective growth* / K. Gfeller, N. Nugaeva, M. Hagner M. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. P. 2626–2631.

44. *Bianchi A. A., Baneyx F. Stress responses as a tool to detect and characterize the mode of action of antibacterial agents* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 5023–5027.

45. *Detection of radiation effects using recombinant bioluminescent Escherichia coli*

strains / J. Min, C. W. Lee, S. Moon et al. // Radiat. Environ. Biophys. 2000. Vol. 39. P. 41–45.

46. *A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants* / S. Belkin, D. R. Smulski, S. Dadon et al. // Water Res. 1997. Vol. 31. P. 3009–3016.

47. *A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant Escherichia coli cells* / L. R. Ptitsyn, G. Horneck, O. Komova et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 4377–4384.

48. *Detection of DNA damage by use of Escherichia coli carrying recA':lux, uvrA':lux or alkA':lux reporter plasmids* / A. C. Vollmer, S. Belkin, D. R. Smulski et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 2566–2571.

49. *Shingler V., Moore T. Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing Pseudomonas sp. strain CF600* // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176. P. 1555–1560.

50. *Neilson J. W. et al. Factors influencing expression of luxCDABE and nah genes in Pseudomonas putida RB1353 (NAH7, pUTK9) in dynamic systems* / J. W. Neilson, S. A. Pierce, R. M. Maier // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 3473–3482.

Материал принят в печать 18.10.2006