

**Государственное бюджетное учреждение дополнительного образования  
"Волгоградская станция детского и юношеского туризма и экскурсий"**

**Использование билюминесцентного анализа для определения  
степени загрязненности воды из различных источников  
Красноармейского района Волгоград.**

**Номинация: Экологический мониторинг**

Работу выполнил Василенко Борис,  
обучающийся кружка «Экологический  
следопыт» ГБУ ДО ВСДЮТиЭ

Руководитель: Подгузов Н.А., педагог  
дополнительного образования

**Волгоград**

**2020**

<b>Введение</b>	3
<b>1. Обзор литературы.</b>	3
<b>1.2. Билюминесценция в природе.</b>	4
<b>1.2. Билюминесцентный анализ</b>	6
<b>2. Исследовательская часть.</b>	7
<b>Заключение.</b>	11
<b>Список источников</b>	12
<b>Приложение</b>	13

## **Введение**

Вода для нас является самым обычным и привычным веществом, с одной стороны, и самым невероятным веществом на Земле, с другой стороны. Вода входит в состав организма человека, всех растений и животных. Она играет исключительно важную роль в процессах обмена веществ, составляющих основу жизни. Вода является уникальным веществом, определяющим возможность существования и саму жизнь всех существ на Земле.

Состояние окружающей среды, живых организмов в том числе и здоровье человека напрямую связаны с качеством воды различных водоемов, в том числе и питьевых источников. Огромное количество исследований, проведенных учеными разных стран, доказывает, что существует прямая связь между качеством питьевой воды и продолжительностью жизни людей. Но также степень загрязненности влияет и на другие организмы, и на местные биоценозы в целом.

Многие исследования качества воды проводятся по методу органолептических показателей или же качественного и количественного анализа воды на присутствие возможных опасных веществ. В нашем распоряжении оказался более современный метод с использованием прибора основанного на биолюминесцентном анализе веществ. Это и послужило возможностью проведения исследовательской работы, целью которой стало определение степени загрязненности воды из различных источников Красноармейского района Волгограда.

При этом нами были поставлены следующие задачи:

- ✓ Изучить научную литературу по биологической люминесценции
- ✓ Освоить работу с прибором LumiShot
- ✓ Освоить методики проведения анализа
- ✓ Провести исследования водных источников
- ✓ Проанализировать полученные данные.

Объект исследования: вода из различных источников Красноармейского района

Предмет исследования: степень загрязнения данных источников.

Работа проводилась в марте и сентябре 2020 года.

### **1. Обзор литературы.**

#### **1.2.Биолюминесценция в природе.**

О загадочном свечении морских вод, рыб и некоторых грибов писал еще Аристотель (384–322 гг. до н.э.). Мореплаватели приписывали этому явлению мистические свойства, считая его источником огня из преисподней. Однако если в начале нашей эры свечение моря пытались объяснить эффектом бомбардировки частиц воды солью (по аналогии с искрой из-под кремня, ударяющего о сталь), а свечение рыб — содержащимся в их чешуе фосфором, то сегодня эти предположения могут вызвать лишь снисходительную улыбку.

Научные основы биолюминесценции заложил Роберт Бойль (1627–1691), знаменитый и известный всем со школьной скамьи (закон Бойля—Мариотта) английский физик, один из учредителей Лондонского королевского общества. Он показал абсурдность предрассудков и суеверий, порожденных этим явлением, обнаружив его сходство с

горением — простой химической реакцией, которая прекращается в отсутствие кислорода. Откачивая воздух из сосуда с куском светящегося (из-за грибов) дерева, он наблюдал, как излучение, постепенно ослабевая, исчезает совсем, но возобновляется, когда в сосуд опять попадает кислород. Изучение механизмов органического свечения продолжил Рафаэль Дюбуа (1849–1929). Из экстрактов люминесцирующих жуков *Rugophagus* он выделил две фракции, ответственные за возникновение света в присутствии кислорода. Белковую составляющую, которая теряла активность при нагревании (как ферменты), он назвал люциферазой, а термоустойчивую низкомолекулярную — люциферин [3].

С тех пор было сделано множество открытий, связанных с природой биолюминесценции. Однако в 2006 г. нобелевский лауреат Осаму Шимомура [4], посвятивший более 50 лет своей жизни исследованию этого завораживающего явления, с сожалением отметил, что значительный прогресс, достигнутый в этой области, сменился упадком. На сегодняшний день известны структуры только семи природных люциферинов. Если в третьей четверти XX в. были определены пять из них, то в последней четверти — только два. К тому же последняя структура нового люциферина из динофлагеллят (простейших организмов, составляющих значительную часть морского планктона и светящихся от движения водных масс) была охарактеризована уже четверть века назад.

До настоящего времени непонятно, каким образом и для какой биологической цели создан и работает сложный механизм излучения света живыми организмами. Какие селективные преимущества обеспечены в эволюции организмам, способным излучать свет? Все известные или предполагаемые функции биолюминесценции так или иначе связаны со зрительным поведением многоклеточных животных в темноте (привлекающий эффект статического света бактериальных колоний и плодовых тел грибов, пугающее, дезориентирующее или сигнальное назначение вспышек, освещение ближнего пространства, светомаскировка снизу на светлом фоне водной поверхности и т.д.).

Существует большое количество гипотез о происхождении и смысле биолюминесценции, но все эти представления можно свести к двум группам, реализуемым у разных светящихся организмов:

1. Излучение света само является биологической функцией, и энергетические затраты на излучаемый свет оплачиваются некими экологическими преимуществами для светящихся организмов.
2. Люминесцентная система из люциферазы и сопряженных ферментов выполняет какую-то метаболическую функцию, а свечение является ее побочным продуктом и не играет собственной роли [5].

Рассмотрим подробнее гипотезы, принадлежащие к первому классу.

Большинство светящихся существ морские, среди них много глубоководных. Самые известные и хорошо изученные из них: удильщик, медузы и кальмары. К биолюминесценции также способны грибы, отдельные виды земляных червей, улиток, комаров и жуков. Некоторые животные способны испускать свет самостоятельно, но большинство светятся за счёт живущих в них бактерий. Им не менее вряд ли какой-нибудь организм может позволить себе роскошь светиться без надобности. Энергетически это слишком дорогое удовольствие. Большинство биолюминесцентных существ испускают

световые вспышки в ответ на внешнее раздражение или при необходимости. Чаще всего такой свет дезориентирует зрячих хищников, отпугивает быстро движущихся крупных животных, приманивает особей своего вида и т.д.

Например, медуза Акворея (Приложение 2. рис. 1.) реагирует на внешнее раздражение. Чаще всего, такой свет при приближении крупных животных, способных повредить желеобразный организм при случайном столкновении с ним. Поэтому свет появляется, когда медуза чувствует опасность.

Жуки-светляки испускают свет, чтобы найти себе пару. Разные виды этих насекомых испускают свет с различной частотой, поэтому каждый светлячок уверен, что он спаривается с самкой именно своего вида. Но самки некоторых видов, например американского светляка *Photuris versicolor*, сначала подманивают специфичной «световой морзянкой» самцов своего вида и спариваются с ними, а затем начинают генерировать «морзянку» для самцов чужого вида, чтобы пообедать ими [6].

Теперь рассмотрим гипотезы, связанные с участием люминесцентной системы в обмене веществ.

Мозаичное распределение светящихся форм на филогенетическом древе свидетельствует, скорее всего, о многократном и независимом происхождении биолюминесценции как жизненно важной функции. Вот только какой? Сравнение между собой биолюминесцентных систем разных светящихся организмов убедило нас в том, что люциферазы сильно отличаются друг от друга по структуре и свойствам, хотя и выполняют одну и ту же функцию – катализируют реакцию светоизлучения. Из сходных функций проистекает сходство люциферинов — субстратов разных люцифераз. Так, химически идентичные люциферины встречаются среди большого числа филогенетически отдаленных типов, таких как рак-отшельник *Cypridina*, костистые рыбы *Arogon*, *Parapriscantus*, *Porichthys* [3]. Свечение гидромедуз *Aquorea*, *Halistaura* и *Obelia* связано с «фотопротеиновым» комплексом и запускается следовыми количествами  $Ca^{+2}$ , а входящий в «фотопротеин» хромофор имеет ту же структуру, что и природный люциферин из морских анютиных глазок *Renilla*, и функционирует у различных неродственных видов, восстанавливаясь на свету и окисляясь  $O_2$ . Однако известен ряд биолюминесцентных систем, в которых люциферин окисляется не молекулярным кислородом, а его активными формами — перекисью водорода —  $H_2O_2$  или супероксидом ( $O_2^-$ ), причем в первом случае с участием субстрат-специфичной пероксидазы, а во втором, по-видимому, даже без фермента [4].

С окислением активными формами кислорода разных органических соединений связано и сверхслабое свечение. Однако его квантовый выход несравненно ниже, чем у специализированной биолюминесценции. Даже для фотопротеинов постулировано, что они содержат стабилизированное кислород-содержащее соединение, в связи с чем для завершения реакции не требуются дополнительные количества кислорода, а нужен только  $Ca^{+2}$ . [4].

Из всех гипотез наиболее вероятна та, согласно которой биолюминесценция возникла независимо у разных организмов как способ защиты от окисления клеточных субстратов свободным кислородом в момент его первичного накопления в атмосфере и сохранилась у некоторых видов живых организмов до настоящего времени, так как давала им какие-то селективные преимущества перед другими несветящимися организмами. Существует еще ряд гипотез о происхождении биолюминесценции

Таким образом, скорее всего, биолюминесценция возникла как система, выполняющая какую-то важную для организма функцию. Вторично она была использована некоторыми организмами для выполнения разнообразных поведенческих реакций. Каков будет окончательный ответ на вопрос о происхождении и биологическом смысле биолюминесценции, покажут дальнейшие исследования ферментов светящихся организмов.

## 1.2. Биолюминесцентный анализ

*Качество окружающей среды* — это степень соответствия природных условий физиологическим возможностям человека. Различают окружающую природную среду *здоровую*, или *комфортную*, при которой здоровье у человека находится в норме, и *нездоровую*, при которой оно нарушается. Когда при взаимодействии человека со средой наблюдаются необратимые изменения состояния здоровья, то такая среда называется *экстремальной*. Отсюда следует, что для сохранения здоровья населения необходимо следить за качеством ОС. Для этого разработаны научные оценки качества ОС, которые называются *стандартами качества окружающей среды*. Они подразделяются на экологические и производственно-хозяйственные. [2]/

В окружающем нас мире находится огромное количество веществ, токсичных для всего живого. Современный человек сталкивается с вредными веществами в своей среде обитания (почва, воздух, природные водоёмы), в условиях производства (газовые выбросы и сточные воды предприятия), при питании (пищевые продукты и питьевая вода). Поэтому крайне важным является поиск методов анализа для быстрой оценки токсичности. В этом отношении весьма перспективен биолюминесцентный анализ, основанный на способности разных видов живых организмов излучать видимый свет. Однако чаще всего для анализа используют светящихся бактерий и светляков [1].

Для изучения токсичности к светящимся бактериям добавляют исследуемое вещество, а затем регистрируют изменение интенсивности свечения. Различные вещества ведут себя в ходе реакции по-разному. Это напрямую влияет на интенсивность свечения: загрязнители и токсины уменьшают способность излучать свет. Так, свечение уменьшается при добавлении наркотиков, отравляющих и лекарственных средств. Если сравнивать интенсивность свечения системы с участием загрязнителя и без него, то в первом случае излучаемый свет будет слабее. К веществам, стимулирующим свечение бактерий, относятся компоненты питательных сред, например, такие как жирные кислоты [6].

Интенсивность свечения измеряют с помощью специального прибора — биолюминометра. Результат работы прибора представляет собой интенсивность свечения, зарегистрированную через определенные промежутки времени. Этот результат удобно рассматривать в виде графика, где по оси X отложено время, а по оси Y — интенсивность свечения.

Кривая на рис. 1 имеет максимум, который соответствует самому сильному испусканию света. Для того чтобы оценить влияние загрязнителя, нужно сначала получить значения интенсивности свечения в отсутствие токсичных веществ, а затем в их присутствии. Проанализировав спад силы свечения, можно судить о загрязняющих свойствах исследуемого вещества. Таким же образом можно сравнивать между собой токсичность разных веществ [1].

Снижение интенсивности свечения при добавлении токсичных веществ может происходить по разным причинам. Рассмотрим основные из них.

### 1. Инактивация фермента

Ферменты могут работать только при особых условиях. Для их активности нужна определённая температура, кислотность и др. Инактивировать («выключить») фермент способны также и некоторые токсичные вещества, они нарушают структуру фермента, и он больше не может выполнять свою функцию. Чем больше концентрация токсичных веществ, тем большее количество ферментов «сломается», а следовательно, не смогут участвовать в биoluminesцентной реакции. В результате интенсивность свечения падает[6].

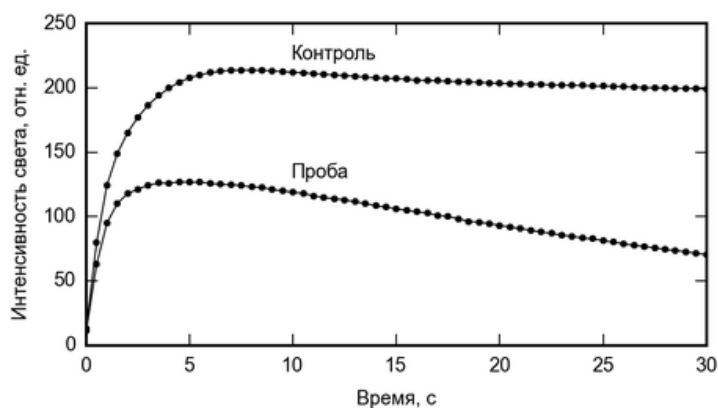


Рис. 1.. График интенсивности свечения

Конкуренция между люциферазой и токсичным веществом, присутствующим в системе, за право соединения с люциферинном.

Некоторые вещества способны реагировать с люциферинном, но такие реакции не будут протекать. При добавлении этих веществ в систему, они будут конкурировать с люциферазой за право взаимодействовать с люциферинном. Какая-то часть люциферина всё-таки вступит в реакцию с люциферазой, поэтому свечение будет, но его интенсивность уменьшится [1].

Разрушение промежуточных люциферин-люциферазных комплексов.

Когда люциферин и люцифераза соединяются, они превращаются в очень нестабильный короткоживущий комплекс. Этот комплекс может или прореагировать дальше, испустив свет, или просто распасться. Токсичные вещества провоцируют распад части таких комплексов, поэтому не все люциферины и люциферазы вступят в биoluminesцентную реакцию, а значит, снизится интенсивность свечения [1].

### 2. Исследовательская часть.

Для работы с использованием метода биoluminesцентного тестирования мы пользовались прибором **Экспресс-лаборатория измерения токсичности Энзимолум LumiShot** (Приложение 3)

Прибор LumiShot является портативным люминометром, устройством для измерения малых потоков светового излучения. Прибор предназначен для проведения лабораторных работ по биотестированию в школах и университетах. Также он подходит для проведения серьезных люминесцентных исследований в научных лабораториях.

Портативная биолюминесцентная экспресс-лаборатория «Энзимолум» для экологического и медицинского мониторинга токсичности состоит из прибора LumiShot, двух дозаторов и набора реагентов Энзимолум. Люминометры LumiShot на сегодняшний день являются самыми недорогими и компактными приборами для измерения света в режиме счета одиночных фотонов. Реагент Энзимолум содержит в своем составе ферменты светящихся бактерий, активность которых чувствительна к наличию широкого класса загрязняющих веществ.

Прибор подключается к компьютеру и результаты тестирования на загрязнения сразу же выводятся на экран монитора в виде графиков и цифровых показателей. Что значительно ускоряет и облегчает работу.

Для проведения исследований нами были взяты пробы воды из 5 источников:

- № 1 ручей в Чапурниковской балке
- № 2 Шенбрунский родник
- № 3 Запруженный водоем у автовокзала Южный
- № 4 Водоем между 1 и 2 шлюзом Волго-донского канала
- № 5 Волга у набережной Красноармейского района (Приложение 4).

Пробы отбирались дважды в марте и в сентябре 2020 года.

Перед определением проб запускали пробное измерение, чтобы прибор вышел в рабочий режим термостатирования детектора.

Далее готовили модельные растворы на основе кинетики излучения света в ходе биолюминесцентной реакции компонентов реагента «Энзимолум», 300 мкл дистиллированной воды и 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN . В результате аналитической работы прибора получался график аналогичный рис 2. Это был контрольный график – модельный раствор воды без загрязнений.

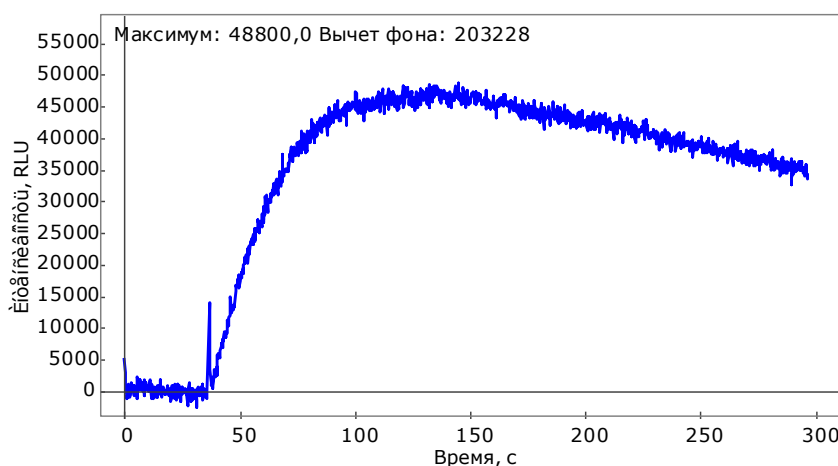


Рис.2. Показания с дистиллированной водой.

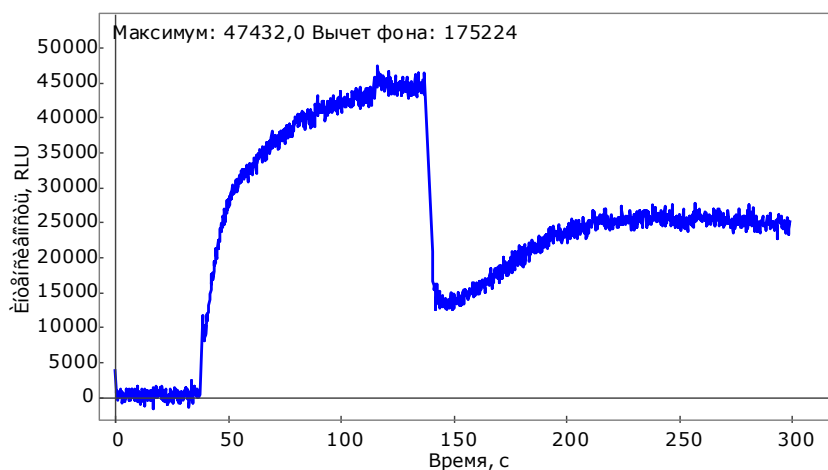


Рис 4. Показания пробы из родника (проба2)

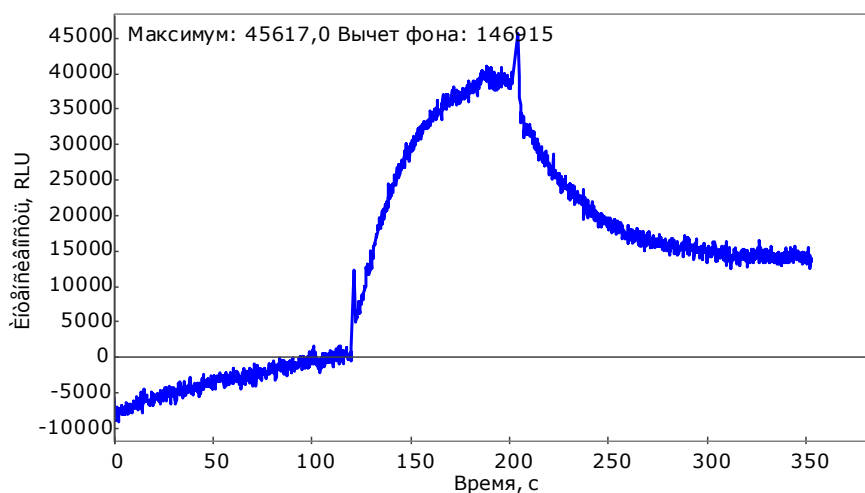


Рис.5. Показания пробы из ручья (проба №1)

После этого проводили анализы воды из различных источников. В кювету помещали также диск «Энзимоллом»+300мкл пробы анализируемой воды. Пробы из источников №1 и 2 и полученные графики анализа были аналогичными модельному раствору без загрязнений на основе дистиллированной воды. (рис 4-5)

А вот пробы из источника №4 и 5 (рис.6) показали наличие загрязнений. На графике видно, что на 40 секунде поместили кювету с контрольной пробой (диск «Энзимоллом», 300 мкл дистиллированной воды, 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN).

На 140 секунде поместили кювету с пробой, и максимум интенсивности излучения стал примерно в два раза меньше, чем у контрольного измерения, что свидетельствует о нарушении каталитической функции ферментов

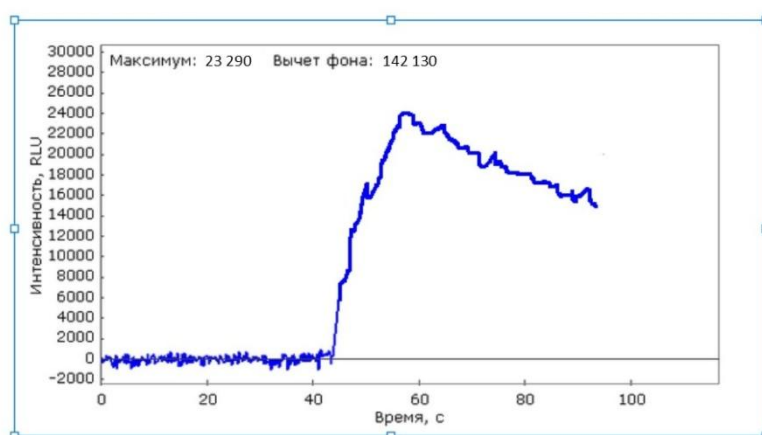
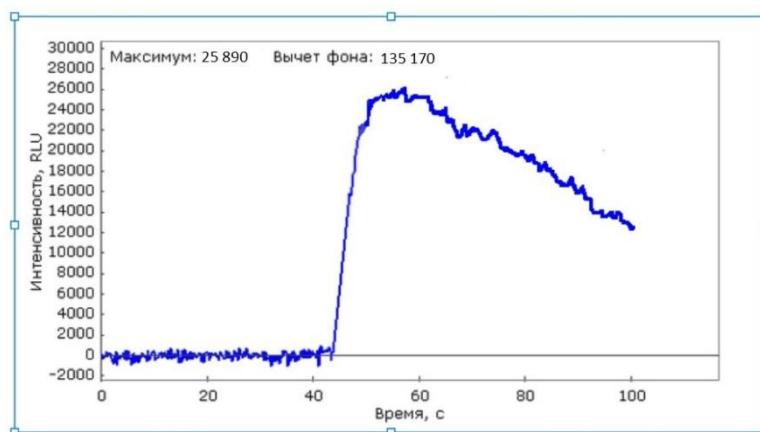


Рис 6-7. Показания проб из пруда (проба №3) и канала (проба №4)

Пробы же из источника 4 (рис 6-7) показывает еще большее загрязнение. На графике видно, что на 45 секунде поместили кювету с контрольной пробой (диск «Энзимолум»), 300 мкл дистиллированной воды, 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN). А на 55-сек добавили в эту кювету воду из пробы из источника № 4. что привело к полному тушению реакции по экспоненциальному закону. Схожие показания дали и пробы из источника № 3.

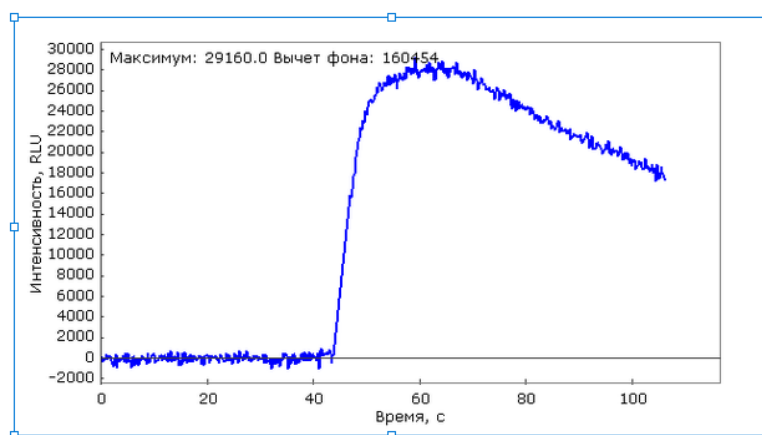


Рис.8 Показания пробы из Волги (№5)

Пользуясь данной схемой, проводили по 5 измерений интенсивности биолюминесценции в дистиллированной воде. Записывали величины максимальной интенсивности свечения и посчитали их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех величин к их количеству (в нашем случае 5).

Обозначим полученное среднее значение  $L_k$ . Это будет контрольное эталонное значение, соответствующее чистой воде без каких-либо примесей.

Также проводили по 5 измерений для каждой пробы воды. Полученные средние значения обозначим  $L_1, L_2 \dots L_5$ .

Вычисляли люциферазный индекс токсичности (ЛИТ) для каждой из проб по формуле:

$$\text{ЛИТ} = \frac{L_k - L_n}{L_k} * 100\%,$$

где  $n=1, 2, 3, 4, 5$  номера проб

Если ЛИТ > 50%, то пробу считается загрязненной, если ЛИТ < 50% - незагрязненной.

На основе полученных значений ЛИТ сделайте вывод о том, загрязнены проанализированные пробы или нет.

Результаты рас показаний ЛИТ в таблице №1

*Таблица №1 . Показатели люциферазного индекса токсичности водных источников Красноармейского района*

Дата отбора проб	Показатели ЛИТ				
	№1	№2	№3	№4	№5
Март 2020	6.5	2.8	46.9	52,27	40.24
Сентябрь 2020	12.8	4.2	57.6	59.1	46.6

## **Заключение**

Результаты нашего исследования показали эффективность работы прибора LumiShot для определения загрязнений водоемов. Во-первых это было очень наглядно, быстро. Во-вторых результаты использования прибора позволяют быть уверенными в точности определения загрязнений, в отличии, например органлептических методов, когда человек ориентируется на восприимчивость собственных органов чувств (зрение, обоняние, вкус).

По итогам исследований можно сделать следующие выводы:

- Вода в ручье на дне Чапурниковской балки и в Шенбуннском роднике чистая;
- Вода в водоемах а) меду 1-2 шлюзом Волго-донского канала и пруда у автовокзала Южный загрязнена
- Вода в Волге занимает промежуточное положение и находится на границе, когда мы можем сказать, что вода тоже загрязнена.

- В весенний период (март) по сравнению с началом осени вода во всех источниках более чистая.

Использование прибора LumiShot позволяет проводить дальнейшие исследования. Например по загрязнению почв, снега, загрязнения листового покрова, продуктов питания, поверхностей овощей и фруктов и более сложные: влияния токсических веществ на активные биологические вещества: белки, ферменты и т.п.

В дальнейшем мы планируем реализовать эти возможности.

Единственное, что может оказаться препятствием, это наличие веществ используемых для приготовления используемых растворов: диск и «Энзимолум» и раствора реагента FMN, которые первоначально входят в комплект прибора. Хранятся они в холодильнике, но при начале использования их срок годности ограничен. Придется заказывать их у изобретателей данного прибора компании ООО «НПП «Прикладные биосистемы» реализует коммерческие продукты кафедры биофизики Сибирского федерального университета.

Выражаем благодарность учащимся кружка, участвовавшим в работе: отбора проб - Решетникову Семену, Дугиной Варваре, Скопенку Ярославу; консультации по подключению прибора к ноутбуку и загрузке программы - Коновалову Илье, в помощи при проведении исследований Чеботареву Кириллу, Соловьеву Матвеем.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алешина, Е.С. Методы билюминесцентного тестирования: методические указания к лабораторному практикуму / Е.С. Алешина, И.Ф. Каримов, Д.Г. Дерябин; Оренбургский гос. ун-т. –Оренбург: ОГУ, 2011. – 56 с.
2. Иванцова, Е. А. Методы оценки загрязнений окружающей среды [Текст] : учеб.-метод. пособие для бакалавров и магистрантов направлений подготовки «Экология и природопользование», «Техносферная безопасность» / Е. А. Иванцова, Н. В. Герман, А. А. Тихонова; Федер. гос. авт. образоват. учреждение высш. образования «Волгогр. гос. ун-т», Ин-т естеств. наук, Каф. экологии и природопользования. – Волгоград : Изд-во ВолГУ, 2018. – 86 с.
3. Лабас Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф. (2003). Флуоресцирующие и цветные белки. «Природа». 3;
4. Флуоресцирующая Нобелевская премия по химии  
<https://biomolecula.ru/articles/fluorestsiruiushchaia-nobelevskaia-premiia-po-khimii>
5. Ямпольский И.В. (2014). Восьмая формула света. ИБХ.  
<http://www.ibch.ru/press/news/science/904>
6. Ямпольский И.В., Царькова А.С., Дубинный М.А., Петушков В.Н., Родионова Н.С. (2014). Билюминесценция: возрождение. «Природа». 7, 10–16;

# ПРИЛОЖЕНИЯ

## Приложение 1.



Рис.1 Явление биолюминесценции у живых организмов.

## Приложение 2

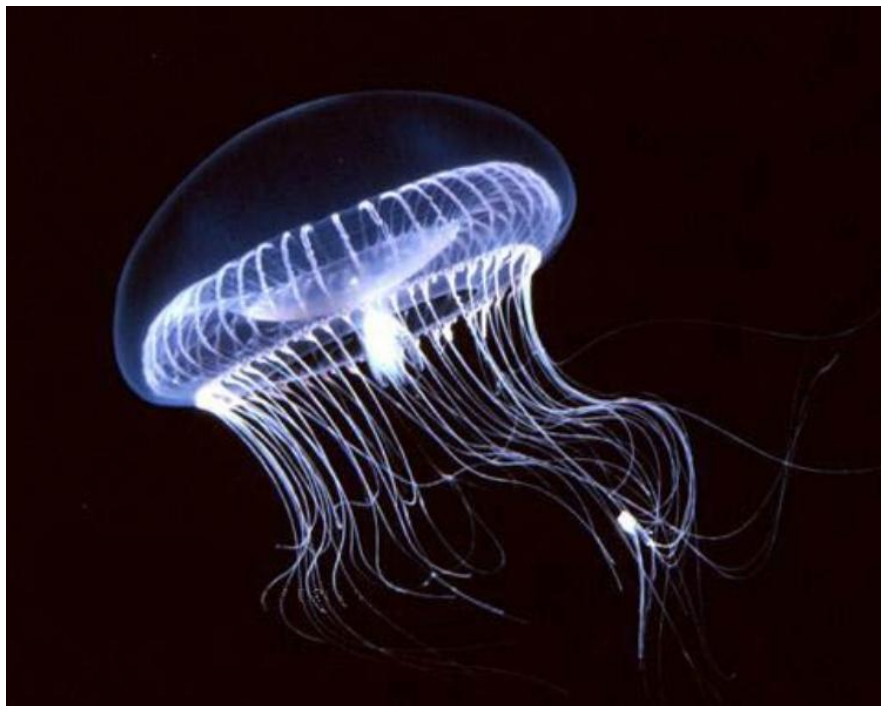


Рис. 1 Светящаяся медуза Акворея

## Приложение 3.



Фото 1-3 Прибор Экспресс-лаборатория измерения токсичности Энзимолум LumiShot



