

Ферментативное биотестирование: научные основы и применение

Е. Н. ЕСИМБЕКОВА^{1, 2,*}, И. Г. ТОРГАШИНА¹, В. П. КАЛЯБИНА^{1, 2}, В. А. КРАТАСЮК^{1, 2}

¹Сибирский федеральный университет
660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

²Институт биофизики СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/50
E-mail: esimbekova@yandex.ru

Статья поступила 29.06.2020

После доработки 03.11.2020

Принята к печати 05.11.2020

АННОТАЦИЯ

В обзоре представлен анализ современного состояния исследований в области биотестирования, обсуждаются проблемы и способы их решения. Рассматриваются основные принципы применения ферментов в биотестировании, приводятся примеры использования ферментов для обнаружения токсикантов в различных образцах. На основе анализа многочисленных литературных данных оцениваются преимущества и ограничения, а также перспективы применения ферментов для выполнения задач биотестирования. Отдельный раздел обзора посвящен биолюминесцентным ферментативным биотестам, разработанным авторами и успешно реализуемым для экологического мониторинга воды, почвы и воздуха. Обосновывается необходимость разработки батареи ферментативных тестов, позволяющей наиболее полно и точно ответить на вопросы о степени загрязнения объектов окружающей среды.

Ключевые слова: биотестирование, ферментативные тесты, биолюминесценция, экологический мониторинг, пестициды, тяжелые металлы.

В настоящее время более 159 миллионов веществ внесены в Химическую реферативную службу (Chemical Abstract Service, CAS), крупнейшую в мире базу данных о химических веществах, причем этот список ежедневно обновляется. Поэтому крайне важным в настоящее время является поиск аналитических систем, пригодных как для экспрессной оценки токсичности новых веществ, так и контроля состояния окружающей среды. Для решения этих проблем используют главным образом два подхода: химический и биологический.

Традиционно для целей экологического мониторинга используется химический анализ, где основным критерием токсичности является превышение содержания токсикантов по сравнению с ПДК. Хотя эти методы отличаются исключительной избирательностью и точностью [Hussain, Keçili, 2020a, b], существует ряд недостатков, ограничивающих их использование, в том числе длительность, высокая стоимость, невозможность идентификации многочисленных токсических веществ, применение токсичных растворителей в про-

боподготовке образцов и, что наиболее важно, отсутствие указаний на биологический эффект [Xu et al., 2014; Wiczerzak et al., 2016; Dopp et al., 2019]. Более того, химический состав любого объекта окружающей среды непрерывно меняется вследствие взаимодействия веществ между собой и компонентами окружающей среды, например, с гуминовыми и фульвокислотами.

Второй подход состоит в определении токсичности среды непосредственно при действии ее на живой организм – это методы биодиагностики. В этом случае изучают ответные реакции биологических систем разных уровней организации на действие природных и антропогенных факторов. По интенсивности ответной реакции проводят оценку состояния биоты и качества среды ее обитания. В зависимости от уровня биологической организации ответов среди биодиагностических методов различают биомаркирование, биоиндикацию и биотестирование. Биомаркирование оценивает степень воздействия природных и антропогенных факторов на живые организмы по изменению ряда морфофункциональных показателей (биомаркеров), регистрируемых на суборганизменном и организменном уровне биологической организации [Sogorb et al., 2014; Lima et al., 2018]. Биоиндикация подразумевает анализ видимых или незаметных повреждений или отклонений от нормы, являющихся признаками стрессового воздействия, у свободноживущих организмов в их естественном окружении [Parmar et al., 2016]. Методы биотестирования позволяют оценить степень воздействия токсических веществ или анализируемых образцов воды, почвы и воздуха на параметры жизнедеятельности тестовых организмов, культивируемых в искусственно поддерживаемых стандартных условиях при лабораторных экспериментах [Blaise, Ferard, 2005; Bosch-Orea et al., 2017; Ekelund, Häder, 2018].

В настоящее время разработано более 200 биотестов для выявления эффектов различных воздействий на состояние природной среды [Есимбекова и др., 2018]. Привлекательность биологического тестирования для исследователей заключается в том, что оно позволяет оценить антропогенное воздействие на среду обитания в показателях, имеющих биологический смысл.

Данный обзор представляет собой анализ современного состояния сравнительно нового направления биологического тестирования, основанного на использовании ферментативных реакций. Ферментативное биотестирование возникло на стыке биомаркирования и биотестирования. При этом в качестве тест-объектов используют ферменты (сходство с биомаркированием), однако принципы применения ферментативных методов в биодиагностике сходны с принципами экотоксикологической оценки состояния объектов окружающей среды методами биотестирования. В обзоре анализируются проблемы биологического тестирования, обосновывается применимость ферментов в качестве тест-систем, приводятся характеристики ферментных тест-систем, применяемых в биодиагностике состояния окружающей среды, особое внимание отводится биолюминесцентному ферментативному биотестированию.

ПРОБЛЕМЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Биологический контроль состояния окружающей среды поставил много новых вопросов. Они касаются общей методологии этого подхода, непосредственного исполнения контроля состояния среды с помощью биологических объектов, принципов нормирования выбросов и, наконец, медико-биологических проблем биологического контроля.

Существует проблема оценки результатов каждого конкретного исследования и решения вопроса о наличии токсического эффекта. Некоторые авторы, например, считают, что значения ПДК часто необоснованно завышаются, т. е. патологическим считается любое незначительное отклонение от нормы [Воробейчик и др., 1994].

Другая проблема состоит в том, что довольно часто для оценки состояния биоценоза используют один биотест. Экстраполяция результатов одного теста для оценки опасности токсического соединения в целом может быть ошибочной [Lyubenova, Boteva, 2016]. Возможно, какой-то один из биотестов действительно является идеальным для оценки, например, качества воды, но при этом встает вопрос об объекте, для которого определяется качество воды. Если задача состоит в определении безопасности употребления

воды человеком, тогда лучшим биотестом является сам человек, а остальные следует признать лишь приближением к нему [Shanks et al., 2009]. Действительно, из анализа литературных данных понятно, что отсутствие реакции конкретного биотеста говорит не об отсутствии загрязнения, а о недостаточной чувствительности используемого тест-объекта к загрязняющим веществам. Верно и обратное: изменение параметров конкретного биотеста может не означать, что данная среда является токсичной для человека. Даже такой классический тест-объект, как дафнии, не отражает реальной опасности для человека: отсутствие гибели дафний не гарантирует безопасность воды для человека, так же как наличие гибели дафний не является абсолютным показателем непригодности воды для питья [Красовский и др., 1991].

Еще одна проблема состоит в том, что результаты биотестирования могут в значительной степени зависеть от источника получения тест-организмов и используемых в конкретной лаборатории методов [Crane, Maltby, 1991], что свидетельствует о низкой воспроизводимости результатов. Воспроизводимость может быть связана с влиянием условий эксперимента, например, таких ключевых факторов, как температура, пища, наличие стрессовых факторов, на биологические ответы тестируемых организмов в присутствии химического загрязнения [Wang, 2018]. Более того, стандартизированные лабораторные условия при проведении биотестов отличаются от естественной среды обитания организмов и не позволяют учитывать множество косвенных факторов, к примеру, взаимодействий между стрессовыми факторами различной природы [Vighi, Villa, 2013; Lyubenova, Boteva, 2016], а использование только одного теста усугубляет ситуацию.

В настоящее время общепризнанной необходимостью является использование в биодиагностике группы тестовых организмов – батареи тестов [Pandard et al., 2006; Pandey et al., 2019]. Это позволяет уменьшить риск недооценки или переоценки общей токсичности исследуемого образца [Wieczorzak et al., 2016], а принадлежность тест-объектов к различным таксономическим уровням позволяет говорить об осуществлении интегральной оценки экологического состояния [Terekhova et al., 2018].

Именно мониторинг токсического воздействия на группу взаимосвязанных организмов разных трофических уровней или на искусственно созданную экосистему с ключевыми представителями (модельные экосистемы, микрокосмы, мезокосмы) представляется наиболее реалистичным подходом, приближенным к достоверным экологическим эффектам [Lyubenova, Boteva, 2016]. Сформулированы требования к биотестам, претендующим на включение в экспертную батарею тестов: 1) доступность и простота культивирования тест-объектов, 2) возможность четкой регистрации эффектов, 3) простота техники выполнения биотеста, 4) экспрессность, 5) точность, воспроизводимость и достоверность результатов, 6) достаточно высокая чувствительность, 7) экономичность [Weyandt, 1990].

Также следует учитывать, что в настоящее время под давлением общественности в некоторых странах запрещается использовать в качестве тест-объектов позвоночных на незембриональных стадиях жизненного цикла. Поэтому активно обсуждаются альтернативные подходы к тестированию на животных, изначально формулируемые как “3Rs” (Reduce, Refine, Replace) и рассматриваемые только для биотестов, основанных на использовании млекопитающих. В дальнейшем такой подход распространился и на других животных, при этом “3Rs” стратегия преобразовалась в “6Rs” (Reduce, Refine, Replace, Reproducible and Reliable, Relevant, Regulatory accepted), означающую, что альтернативные тесты должны быть также воспроизводимыми, надежными, экологически значимыми и закреплены на законодательном уровне [Lillicrap et al., 2016]. Конкретные меры и альтернативные стратегии, в частности, “лаборатория-на-чипе”, *in silico* методы (например, модели QSAR), базы экспериментальных данных, нацелены на реализацию стратегии “6Rs”. Тем не менее этот подход должен преодолеть множество барьеров для повсеместного принятия в качестве процедуры оценки рисков [Schiffelers et al., 2014; Dang et al., 2017].

Таким образом, выводы, сделанные на основе экстраполяции результатов с использованием модельных животных в токсикологии, не всегда полностью релевантны для человека, результаты любого биотеста говорят лишь о реакциях конкретного тест-объекта на ис-

следуемую среду. Крайне важным при проведении тестов на экотоксичность является учет косвенных факторов. Воспроизводимость и сходимость результатов анализов наряду с доказанной чувствительностью к воздействию токсических веществ определяют возможность применения тест-объекта для биодиагностики состояния объектов окружающей среды. Для надежной оценки риска загрязнения окружающей среды необходимы знания о воздействии на разных уровнях биологической организации. Наблюдается тенденция перехода к новым *in vitro* и *in silico* стратегиям тестирования, что увеличивает перспективы использования ферментативных методов анализа для решения задач биодиагностики состояния окружающей среды.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ БИОМАРКЕРОВ В БИОДИАГНОСТИКЕ

Изменение активности ферментов у водных и почвенных организмов используется в качестве биомаркеров загрязнения воды или почвы достаточно давно. Среди факторов, определяющих выбор ферментов – биомаркеров загрязнения, первостепенное значение имеют достаточно высокий уровень их активности в клетке, чувствительность к различным внешним токсическим воздействиям, а также простота и надежность методов определения их активности. Так, например, оценку загрязнения водных экосистем проводят по активности фосфатаз у моллюсков. Показано, что бензин и дизельное топливо оказывают ингибирующее действие на ферменты улитки *Tympanotonus fuscatus* [Edori et al., 2014], медь ингибирует активности кислот и щелочной фосфатаз морского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* [Istomina et al., 2019]. В работе [Seitkalieva et al., 2016] оценку общего загрязнения естественной морской экосистемы проводили по изменению активности кислотных и щелочных фосфатаз мидии *Crenomytilus grayanus*.

Помимо фосфатаз в качестве биомаркеров загрязнения активно используются пищеварительные ферменты [Li et al., 2010; Caruso et al., 2016]. Например, известно, что длительное воздействие оловоорганического соединения трибутиллолова ведет к значительному ингибированию активностей амилазы, липа-

зы и трипсина у мальков обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* [Li et al., 2014]. В работе [Hani et al., 2018] показано снижение активностей трипсина, амилазы и кишечной щелочной фосфатазы у трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* при воздействии кадмия.

Различные семейства рыб (пираньевых, лососевых, тресковых, прохилодонтовых) обладают высокой чувствительностью холинэстераз и трансминаз к хлорорганическим и фосфорорганическим пестицидам [Narra et al., 2011; Lopes et al., 2014; Greer et al., 2019]. Авторы [Khare et al., 2019] на примере пестицидов карбарила и метилпаратиона показали перспективность применения ферментов каталазы и глутатионредуктазы в качестве биомаркеров окислительного стресса для изучения синергетического действия пестицидов.

В меньшей степени ферментативные методы используются для проведения токсикологического анализа почв, хотя имеются многочисленные данные, указывающие на высокую чувствительность почвенных ферментов к различным загрязнениям, в том числе тяжелыми металлами и фунгицидами [Bartkowiak et al., 2017; Wang et al., 2017; Jaworska, Lemanowicz, 2019; Zhang et al., 2019]. Например, в работе [Bartkowiak et al., 2017] отмечается, что в качестве индикаторов загрязнения почвы тяжелыми металлами может быть использована активность таких ферментов, как каталазы, дегидрогеназы и фосфатазы. В работе по исследованию изменения биологической активности почвы в ответ на загрязнение фунгицидом азоксистробинном показано, что азоксистробин оказывает ингибирующее влияние на активность дегидрогеназ, каталазы, уреазы, кислотной и щелочной фосфатаз, но вместе с тем отмечается, что дегидрогеназы более устойчивы к действию фунгицида [Bacmaga et al., 2015].

Таким образом, использование ферментов в качестве биомаркеров продемонстрировало их высокую чувствительность и специфичность к действию целого ряда загрязнителей и подтвердило, что в основе изменений общебиологических показателей (выживаемость, рост, размножение, поведение и т. д.) лежат биохимические изменения в живых клетках. Однако биохимические маркеры не всегда более чувствительны, чем реакции всего организма [Jemec et al., 2010]. Их чув-

ствительность зависит от способа действия, продолжительности воздействия и тестируемых видов. Следует отметить, что существует ряд ограничений и недостатков при использовании ферментативных тестов *in situ*: нестабильность измеряемых контрольных биохимических характеристик живых организмов, необходимость выделения ферментов из тест-организма для измерения его активности, что увеличивает время и усложняет процедуру проведения анализа. Кроме того, ограничено число ферментов, активность которых можно определить в живом организме.

Несомненными преимуществами перед ферментативными тестами *in situ* обладают ферментативные тесты *in vitro*. Действительно, работа с выделенными ферментами позволяет изучить механизмы воздействия токсикантов на функционирование отдельных звеньев метаболической цепи, упростить и ускорить процедуру проведения анализа, варьировать чувствительность методов путем изменения условий проведения анализа (например, изменяя соотношение компонентов реакционной смеси), увеличить сходимость и воспроизводимость анализа за счет перехода от живого организма к реактиву. В настоящее время использование ферментов *in vitro* позволило разработать принципиально новые экспрессные регулируемые биодатчики для экологического мониторинга объектов окружающей среды.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ МЕТОДОВ В БИОТЕСТИРОВАНИИ

Ферментативные методы, применяемые в биотестировании, основаны на эффектах активации или ингибирования ферментов токсическими веществами, пропорциональных количеству токсикантов в пробе.

На использовании эффекта активации ферментов основаны специфические методы обнаружения аналита, который является субстратом или, реже, кофактором конкретного фермента. Таким образом, его наличие в пробе приводит не к ингибированию активности фермента, а к повышению скорости ферментативной реакции пропорционально концентрации субстрата или кофактора. Примером подобных тестов является использование органофосфатгидролазы для анализа содержа-

ния фосфоорганических пестицидов в продуктах питания, речных и сточных водах, а также кислой органофосфатгидролазы для анализа газов нервно-паралитического действия [Aubert et al., 2004; McDaniel, 2004; Simonian et al., 2004]. Предложен метод детекции ионов марганца и кобальта, основанный на оценке активности аргиназы после специфического связывания апофермента с Mn^{2+} или Co^{2+} . Количество продукта гидролиза L-аргинина – мочевины – пропорционально концентрациям ионов данных металлов, пределы обнаружения составляют 1 и 2,5 пМ для Mn^{2+} и Co^{2+} соответственно [Stasyuk et al., 2018].

Ферментативные методы специфического анализа могут быть основаны также на необратимом и обратимом ингибировании активности ферментов. При ферментативном тестировании проводят анализ активности ферментов в отсутствие (A_0) и в присутствии (A_1) ингибитора, затем рассчитывают степень ингибирования активности фермента по формуле $((A_0 - A_1)/A_0) \cdot 100\%$ (рис. 1). Кроме того, используют параметр IC_{50} , представляющий собой концентрацию ингибитора, вызывающую уменьшение активности фермента на 50 %, и константу ингибирования K_i , которая характеризует сродство фермента и ингибитора.

Помимо специфических методов ферментативного анализа применяются интегральные методы, основанные на ингибировании активности ферментов совокупностью токсических веществ, содержащихся в анализируемом образце. Далее мы подробно остановимся на применении специфических и интегральных ферментативных методов.

Ферментативные методы на основе моноферментных реакций

В настоящее время ферменты в основном используют в качестве распознающего элемента биосенсоров для контроля содержания в различных объектах окружающей среды токсических веществ, чаще всего пестицидов и тяжелых металлов. Несомненным лидером (две третьих всех существующих биосенсоров) являются биосенсоры на основе ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, отличающиеся высокой чувствительностью к фосфоорганическим и карбаматным пестицидам [Amine

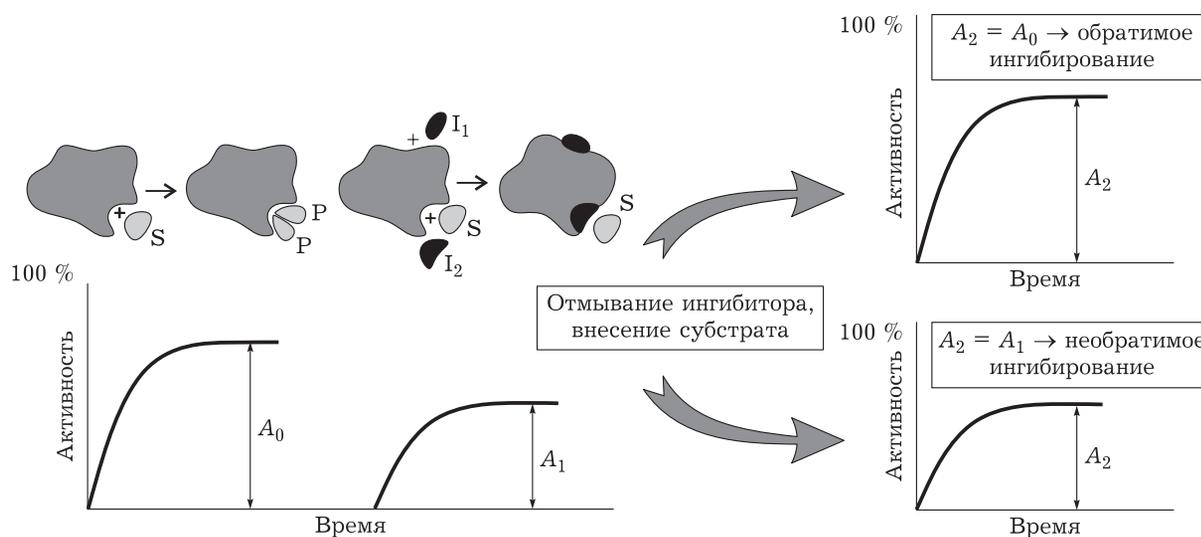


Рис. 1. Принципы детекции обратимых и необратимых ингибиторов с использованием методов, основанных на ингибировании ферментов.

I_1 и I_2 – неконкурентный и конкурентный ингибиторы соответственно

et al., 2016]. Для анализа пестицидов используют и другие гидролазы, например, щелочную фосфатазу, липазу, а также оксидоредуктазы – тирозиназу и лакказы. Наиболее востребованными для обнаружения тяжелых металлов являются биосенсоры на основе уреазы, пероксидазы и глюкозооксидазы (таблица).

Следует отметить, что в некоторых случаях ферментативные биосенсоры позволяют определять наличие токсиканта с чувствительностью, сходной или даже превышающей чувствительность аналитических методов. Исследователями [Law, Higson, 2005] разработан биосенсор на основе ацетилхолинэстеразы, позволяющий обнаруживать 10 аМ дихлофоса, 0,1 фМ паратиона и азинфос-метил. Другой пример – анализ содержания карбарила и монокротофоса с пределом обнаружения 5,3 и 46 фМ соответственно [Zheng et al., 2015]. Однако высокая чувствительность, на порядки превышающая ПДК токсичных соединений, может рассматриваться не только как преимущество, но и как недостаток данных сенсоров, поскольку может привести к ложноположительному результату тестирования.

Помимо обширной группы ферментативных датчиков для обнаружения пестицидов и тяжелых металлов существуют также биосенсоры для анализа прочих загрязнителей. Так, для обнаружения фенольных соединений в пище и окружающей среде предложены биосенсоры на основе лакказы (предел обнару-

жения гидрохинона составляет 15 нМ) и тирозиназы (предел обнаружения фенола 40 нМ), [Zhang et al., 2007; Gul et al., 2017]. Другая группа ферментативных биосенсоров направлена на определение фармацевтических загрязнителей в сточных водах [Camraña et al., 2019]. Существуют также примеры применения ферментов для разработки биосенсоров на микотоксины, например, на основе ацетилхолинэстеразы с пределом обнаружения афлотоксина 0,1 нг/мл [Chrouda et al., 2020] и на основе пероксидазы хрена для детекции охратоксина А в концентрации 27 нМ [Alonso-Lomillo et al., 2011].

Совершенствование технологий и избирательная чувствительность ферментов к различным токсическим соединениям позволяют проводить комплексный анализ при совмещении на одном носителе нескольких ферментативных реакций. Так, амперометрический биосенсор с иммобилизованными ацетил- и бутирилхолинэстеразой, тирозиназой, а также двумя типами пероксидаз и целлобиозодегидрогеназой был успешно применен для одновременной детекции фосфорорганических пестицидов, карбаматов и фенолов [Solná et al., 2005]. Пределы обнаружения карбарила, гептенофоса, фенилтротиона, *n*-хлорфенола, *n*-аминофенола составили 0,8 нМ, 2,8 нМ, 6,9 нМ, 0,19 мкМ и 0,60 мкМ соответственно.

Потребность в новых ферментативных методах анализа, растущая вместе с антропо-

Применение ферментов для анализа содержания в образцах пестицидов и тяжелых металлов

Фермент	Класс	Представители	Предел обнаружения*	Литература
Пестициды				
Ацетилхолинэстераза	ФОС**	Параоксон	1,4 нг/мл	Jia et al., 2020
		Малатион	0,1 нМ	Chauhan, Pundir, 2011
		Хлорпирифос	0,1 нМ	Law, Higson, 2005
		Эндосульфан	10 нМ	Zheng et al., 2015
		Паратион	0,1 фМ	
		Монокротофос	46 фМ	
Бутирилхолинэстераза	Карбаматы	Карбарил	5,3 фМ	Zheng et al., 2015
	ФОС	Малатион	6 млрд ⁻¹	Edwards et al., 2019
Тирозиназа	ФОС	Дихлофос	60 нМ	Pundir et al., 2019
		Параоксон	0,6 мкМ	
Фосфорорганическая гидролаза	Карбаматы	Карбарил	0,008 млрд ⁻¹	Bucur et al., 2018
	Триазины	Атразин	10 млрд ⁻¹	Bucur et al., 2018
	ФОС	Параоксон	3 нМ	Pachapur et al., 2019
Щелочная фосфатаза	ФОС	Паратион	1 нМ	Jain et al., 2019
		Метилпаратион	1 нМ	
		Малатион	0,001 млрд ⁻¹	Pundir et al., 2019
Эстераза растений	ХОС***	Тетрадифон	4,1 мкМ	Bucur et al., 2018
	ФОС	Метилпаратион	0,19 нМ	Bao et al., 2015
Глюкозооксидаза	Триазины	Малатион	1,51 нМ	
		Атразин	39 нмоль/л	Bachan Upadhyay, Verma, 2013
Переоксидаза	ФОС	Глифосат	28 мкг/л	Muenchen et al., 2018
Хлоропероксидаза	ФОС	Паратион	0,2 мкМ	Pachapur et al., 2019
		Хлорпирифос	0,2 мкМ	
		Карбофуран	22 мкг/кг	Bucur et al., 2018
Лакказы	Карбаматы	Карбарил	20 мкг/кг	
		Метомил	0,235 мкМ	
		Атразин	0,12 мкМ	Bucur et al., 2018
Уреаза	Триазины	Атразин	0,12 мкМ	Bucur et al., 2018
Липаза	ФОС	Метилпаратион	0,28 мкмоль/л	Pohanka, 2019
		Параоксон-этил	37 нмоль/л	
		Диазинон	10 нмоль/л	
Тяжелые металлы				
Глюкозооксидаза	Ag ⁺ , Hg ²⁺ Pb ²⁺ Cu ²⁺ , Cd ²⁺		1,0 мкМ	Ashrafi et al., 2019
			0,01 мкМ	Syshchyk et al., 2015
Пероксидаза	Ag ⁺ Pb ²⁺ Cu ²⁺		0,53 мкМ	Shtenberg et al., 2015
			0,60 мкМ	
			1,63 мкМ	
Лакказы	Cu ²⁺		1,30 мкМ	Shtenberg et al., 2015
Уреаза	Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺		0,01 мкМ	Syshchyk et al., 2015
Каталаза	Hg ²⁺		18 пМ	Elsebai et al., 2017
Нитратредуктаза	Cu ²⁺ Zn ²⁺		0,05 мкмоль/л	Bachan Upadhyay, Verma, 2013
			0,5 мкмоль/л	
Инвертаза	Hg ²⁺		0,5 нмоль/л	Bachan Upadhyay, Verma, 2013
β-галактозидаза	Hg ²⁺ Ag ⁺ Cu ²⁺ Cd ²⁺		0,001 ppm	Hossain, Brennan, 2011
			0,002 ppm	
			0,020 ppm	
			0,020 ppm	
Фосфатаза	Cd ²⁺ , Hg ²⁺		0,01 аМ	Tekaya et al., 2014

* Указаны самые низкие пределы обнаружения среди рассмотренных ферментативных биосенсоров в соответствии с первоисточником.

** ФОС – фосфорорганические соединения.

*** ХОС – хлорорганические соединения.

генным давлением на окружающую среду, приводит к расширению списка используемых ферментов. Так, в качестве более дешевой и удобной альтернативы ацетилхолинэстеразе для детектирования фосфорорганических соединений используются эстеразы растений. Спектрофотометрический метод на основе α -нафтилацетатэстеразы продемонстрировал чувствительность к метамидофосу, дихлофосу, фоксиму, диметоату и малатиону на уровне ПДК этих соединений в пище [Wang et al., 2012]. Карбоксилэстераза фасоли показала высокую чувствительность к карбаматам и фосфорорганическим пестицидам [Yang et al., 2018]. Большим потенциалом для мониторинга окружающей среды обладают и другие родственные эстеразы растений.

Ферментативные методы на основе цепей сопряжения ферментативных реакций

Помимо моноферментных реакций в качестве ферментативных тест-объектов используют полиферментные реакции, представляющие собой цепь сопряженных ферментативных реакций. Таким способом пытаются решать несколько задач. В некоторых случаях это позволяет разработать тест, обладающий большей специфичностью к какому-то классу токсических соединений. В других случаях замена моноферментных реакций на полиферментные позволяет увеличить чувствительность метода и определять наличие токсических соединений на уровнях, близких к их ПДК.

Для анализа содержания параоксона и хлорпирифоса с пределом обнаружения 5,2

и 0,56 мкг/л соответственно предлагается к использованию биферментная система ацетилхолинэстераза + тирозиназа [Andreescu et al., 2002a]. Биферментная система – кислая фосфатаза и D-глюкозо-1-оксидаза – применялась для анализа содержания малатиона (1,5 мкг/л), метилпаратиона (0,5 мкг/л) и параоксона (1,5 мкг/л) [Mazzei et al., 1996]. Значительно меньшей чувствительностью к малатиону (0,5 мг/л) обладает триферментная система ацетилхолинэстераза + ацетил-КоА-синтетаза + светляковая люцифераза [Marques, Esteves da Silva, 2014]. Триферментная система ацетилхолинэстераза + холиноксидаза + пероксидаза показала высокую чувствительность к карбарилу (3 ppm) и дихлофосу (1 ppm) [Karousos et al., 2002].

Оригинальный способ анализа продуктов трансформации пестицидов, а именно нитро- и галогенированных фенолов предложен в работе [Watthaisong et al., 2019]. Авторы разработали методику, основанную на сопряжении четырех ферментативных реакций: в результате последовательных реакций, катализируемых флаavin-зависимой монооксидазой, флавинредуктазой и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и при внесении D-цистеина, фенолы последовательно трансформируются в бензохинон, а затем в D-люциферин, являющийся субстратом люциферазы светляков. Результатом является испускание света, интенсивность которого зависит от концентрации исходных фенолов (рис. 2).

Для обнаружения тяжелых металлов разработан биосенсор, основанный на сопряжении трех ферментативных реакций, катализируемых инвертазой, мутаротазой

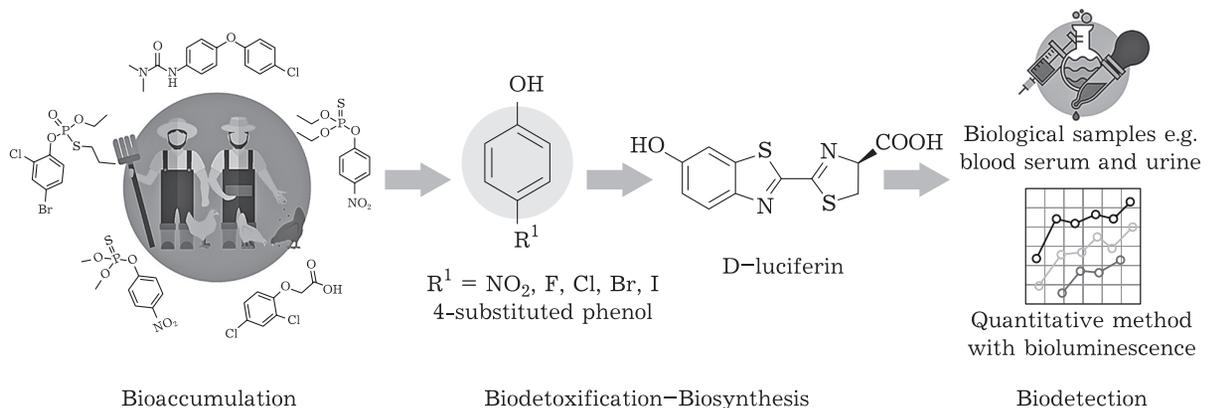


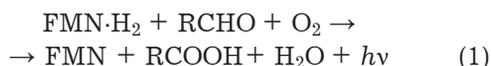
Рис. 2. Концепция ферментативного анализа для обнаружения галогенированных фенолов и нитрофенолов. Воспроизведено из [Watthaisong et al., 2019] с разрешения издательства Wiley

и глюкозооксидазой, пределы обнаружения ионов ртути и серебра составили 25 и 100 нМ соответственно [Soldatkin et al., 2012]. В работе [Cosnier et al., 2006] путем сопряжения кислот фосфатазы с полифенолоксидазой удалось повысить предел обнаружения мышьяка (V) до 2 нМ. Еще один интересный пример – это биосенсор на основе пероксидазы хрена и каталазы. В присутствии специфического ингибитора каталазы – нитрита – пероксид водорода под действием пероксидазы восстанавливается до H_2O , что вызывает изменение сигнала датчика. Предел обнаружения нитрита составляет 4 мкМ [Chen et al., 2008].

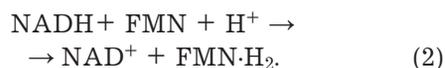
Для интегрального анализа токсичности среды активно применяют ферментативные тесты, основанные на использовании цепей сопряжения реакций с бактериальной люциферазой. Основные принципы биолюминесцентных ферментативных тестов, а также примеры их использования для решения различных аналитических задач представлены в следующем разделе.

Биолюминесцентное тестирование на основе ферментов светящихся бактерий

Концепция так называемого люциферазного биотестирования была выдвинута в 1990 г. [Kratasyuk, 1990]. Принцип люциферазных биотестов состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции светящихся бактерий. В качестве тест-объектов выступают реакции, катализируемые люциферазой (L):



и биферментной системой NAD(P)H: FMN-оксидоредуктаза + люцифераза (R + L):



Параметры указанных биолюминесцентных реакций являются основными тест-функциями.

Базовый метод биолюминесцентного ферментативного тестирования методически прост: в измерительной кювете смешивают ферменты R + L и их субстраты и регистрируют на биолюминометре контрольную интенсив-

ность свечения. Далее процедура повторяется в присутствии анализируемой пробы. Токсичность смеси определяют по изменению величины интенсивности биолюминесценции в присутствии пробы по сравнению с контролем. Количественная оценка степени влияния тестируемого образца на интенсивность свечения биферментной системы R + L выражается в виде безразмерной величины – люциферазного индекса токсичности (ЛИТ), определяемого по формуле: $ЛИТ = ((I_k - I_o)/I_k) \cdot 100 \%$ где I_k – максимальная интенсивность свечения в контрольной пробе; I_o – максимальная интенсивность свечения после добавления анализируемой пробы.

Кроме того, реакцию биотеста можно оценить по изменению константы спада свечения $k_{сп}$, времени выхода интенсивности свечения на максимальный уровень (T) и периода задержки свечения (P), который появляется при наличии в анализируемом образце редокс-активных соединений. Критерием токсичности пробы воды является снижение на 20 % и более максимальной интенсивности свечения биферментной системы R + L при добавлении анализируемого образца воды по сравнению с интенсивностью свечения в контрольной пробе. Основными условиями для применения люциферазного биотеста являются: наличие прибора (биолюминометра) и реактивов (препаратов ферментов и субстратов) для проведения измерений; чувствительность биолюминесцентных реакций к компонентам анализируемого образца, достаточная для установления соответствия между степенью изменения параметров биолюминесцентных реакций и токсичностью образца.

Долгое время в биотестировании использовались лишь биотесты, основанные на моно- и биферментной реакциях. В дальнейшем были сконструированы новые ферментативные тесты, основанные на использовании разных типов взаимодействия ферментов с бактериальной люциферазой. В работе Н. С. Кудряшевой с коллегами [Kudryasheva et al., 1999] на примере реакции, катализируемой алкогольдегидрогеназой, проведено сопряжение трех ферментов. Показано, что удлинение цепи сопряжения ферментативных реакций приводит к увеличению чувствительности ферментативных тестов к действию редокс-активных веществ. В другой

работе [Сутормин и др., 2018] показано, что повышение сложности тест-объекта от монодо триферментной системы лактатдегидрогеназа + NAD(P)H: FMN-оксидоредуктаза + люцифераза способствует увеличению чувствительности ферментативных систем к воздействию диазинона, малатиона и хлорида меди (II) в почвенных образцах, полученные значения IC₂₀ составили 0,35, 2 и 0,004 мг/кг почвы соответственно. Кроме прямого сопряжения ферментативных реакций описаны другие способы конструирования биолюминесцентных ферментативных тестов, в том числе добавление к биферментной системе R + L еще одной NADH-зависимой реакции, обеспечивающей конкурентные отношения ферментов за субстрат, а также введение дополнительной протеазной реакции [Kratasyuk, Esimbekova, 2015].

В дальнейшем использование биолюминесцентного свечения в основе биотестов позволило разработать биолюминесцентную сигнальную систему (БСС), включающую тест *in vivo*, основанный на светящихся бактериях, и тесты *in vitro*, основанные на ферментативных биолюминесцентных системах с различным типом взаимодействия ферментов. Комбинированная методика проведения биотестирования с использованием БСС предусматривает измерение биолюминесцентного свечения в фоновых условиях и условиях химического загрязнения окружающей среды. Данная система была успешно использована для мониторинга природных и лабораторных водных экосистем [Kratasyuk et al., 2001], оценки безопасности полимеров микробного происхождения – полигидроксиканоатов [Шишацкая и др., 2002], в гидробиологических исследованиях возможной связи сезонной динамики естественной смертности зоопланктона в водоеме с изменением токсичности воды [Дубовская и др., 2002], а также анализа токсичности ряда пестицидов [Vetrova et al., 2007].

Интегральные биолюминесцентные ферментативные методы предназначены для непрерывного экспресс-контроля состояния окружающей среды промышленных районов и природно-хозяйственных комплексов, контроля залповых вредных выбросов предприятий, оценки эффективности детоксикации сточных вод и работы очистных сооружений,

а также для оценки экологической опасности предприятий и отдельных районов. Применение биолюминесцентных биотестов с использованием ферментов светящихся бактерий для экологического мониторинга описано во многих научных трудах [Kratasyuk et al., 2001; Vetrova et al., 2007; Esimbekova et al., 2014]. Биотесты на основе биферментной системы R + L были успешно использованы для анализа воды р. Енисей и ее притоков, питьевой воды различных районов Красноярска и Алтайского края, соленого оз. Шира (Республика Хакасия), а также оз. Байкал [Kratasyuk et al., 1996, 1999; Vetrova et al., 2002]. Получены данные, убедительно демонстрирующие возможности применения биолюминесцентных ферментных тестов для анализа токсичности не только воды, но и воздуха или почвы [Rimatskaya et al., 2012; Сутормин и др., 2018; Колосова и др., 2019].

Область применения биолюминесцентных ферментативных методов анализа не ограничена исключительно экологическими задачами. В настоящее время биолюминесцентные ферментные тесты активно используются для анализа потенциальной токсичности различных веществ, в том числе наноматериалов на основе углерода [Esimbekova et al., 2017a], наночастиц металлов [Есимбекова и др., 2017] и пищевых добавок [Esimbekova et al., 2017b]. Кроме того, биолюминесцентные ферментативные тесты наряду с тестами на основе светящихся бактерий используют для мониторинга радиационной токсичности, отслеживая таким способом результаты воздействия радиоактивного излучения как на микробиологическом, так и на биохимическом уровне [Selivanova et al., 2013; Kudryasheva, Kovel, 2019]. Биолюминесцентные методы используются также для количественной оценки детоксицирующей способности биоактивных соединений, например, гуминовых веществ и производных фуллеренов [Kudryasheva, Tarasova, 2015; Sachkova et al., 2019].

Наряду с растворимыми ферментами при проведении биолюминесцентного ферментативного тестирования активно используются иммобилизованные ферменты, а также многокомпонентные реагенты под коммерческим названием “Энзимолум”, включающие помимо ферментов R + L и их субстраты (миристиновый альдегид и NADH). Использо-

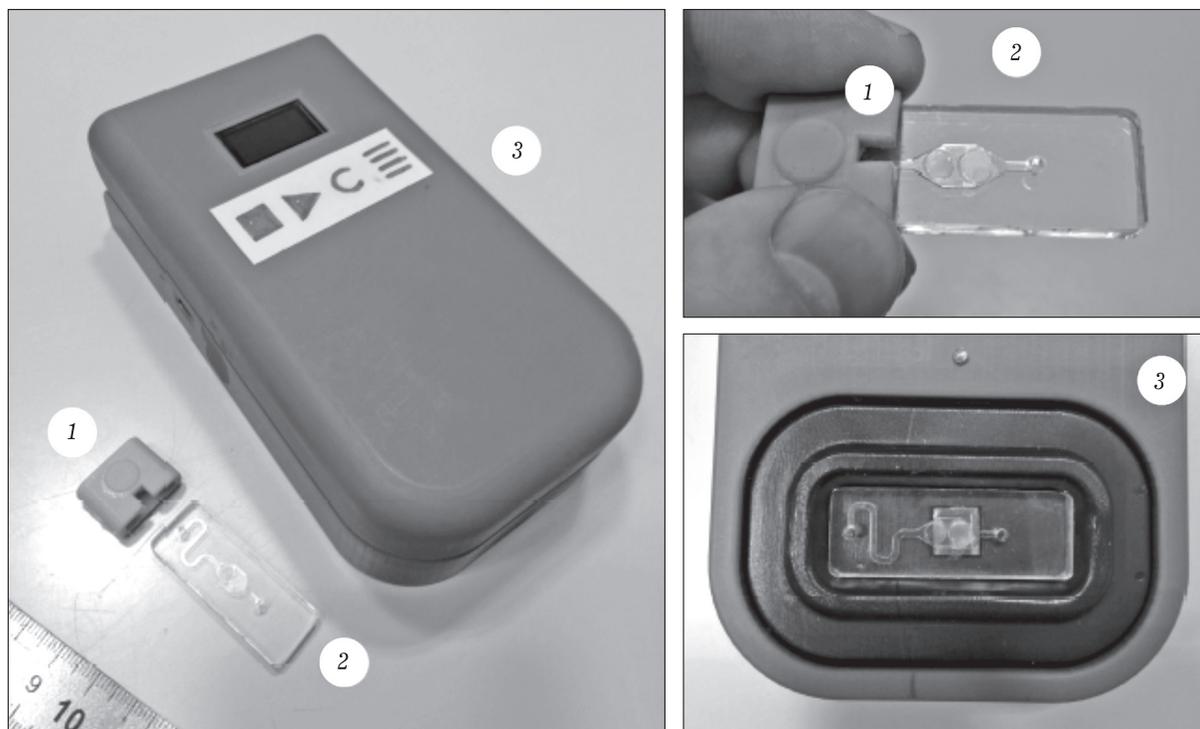


Рис. 3. Адаптер пробоотборника для чипов (1), одноразовый микрофлюидный чип (2) и портативный люминометр (3) на основе термостабилизированного кремниевого фотоумножителя (SiPM). Портативный люминометр имеет возможность автономной работы, для этого он оснащен аккумулятором, дисплеем и кнопками управления. Воспроизведено из [Lukyanenko et al., 2019] с разрешения издательства MDPI

зование иммобилизованных реагентов позволило повысить точность измерений, в частности, при проведении длительных анализов, а также существенно упростить процедуру анализа, сократить время его проведения и уменьшить его стоимость [Есимбекова и др., 2015; Lonshakova-Mukina et al., 2015]. В отличие от растворимых форм иммобилизованные реагенты не требуют специальных условий хранения и могут использоваться не только в лабораторных, но и полевых условиях. В дальнейшем технология получения многокомпонентных реагентов легла в основу производства одноразовых микрофлюидных чипов [Lukyanenko et al., 2017; Denisov et al., 2018]. Использование чипов в комплекте со специально разработанным портативным биолуцинометром (рис. 3) позволяет быстро проводить скрининг большого количества образцов [Lukyanenko et al., 2019].

Таким образом, современные биолуцинофосфоресцентные ферментативные методы весьма перспективны для решения множества аналитических задач, и до настоящего време-

ни их возможности еще далеко не исчерпаны. Экономичность, высокая чувствительность, нетоксичность используемых реагентов и быстрота проведения анализа делают биолуцинофосфоресцентные ферментативные методы особенно привлекательными. Более того, использование цепей сопряжения с бактериальной люциферазой позволяет конструировать новые ферментативные тесты, различающиеся по чувствительности к разным классам токсических веществ, а также создать батарею ферментативных тестов для достоверной диагностики состояния окружающей среды.

ПРЕИМУЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ МЕТОДОВ ТЕСТИРОВАНИЯ

Среди существующих методов биотестирования ферментативные биотесты в наибольшей степени отвечают требованиям экспрессности и простоты выполнения, а также отличаются высокой чувствительностью к разнообразным химическим соединениям, присутствующим в промышленных сбросах

и загрязняющих почву, воду и атмосферу (тяжелые металлы, фенолы, формальдегид, пестициды и т. д.).

Несомненным преимуществом ферментативных методов является то, что при необходимости всегда можно найти такой фермент, активность которого будет избирательно ингибировать анализируемый загрязнитель, нарушающий взаимодействие “фермент – субстрат”. Так, для пестицидов это как раз тот фермент, который является мишенью действия данного пестицида. Применение того или иного фермента в качестве тест-объекта ограничивается его коммерческой доступностью и стабильностью в процессе хранения и использования [Evtugyn et al., 1998; Van Dyk, Pletschke, 2011].

Еще одним важным преимуществом ферментативных методов является возможность варьирования их чувствительностью к воздействию токсических веществ для обеспечения тестирования загрязняющих веществ на уровне ПДК. Увеличение чувствительности ферментативных методов достигается изменением условий проведения анализа, в том числе изменением состава реакционной смеси (количества ферментов и субстратов, объема добавляемой токсической смеси); изменением последовательности добавления компонентов реакции; введением дополнительной процедуры инкубации ферментов в анализируемом образце; использованием различных препаратов ферментов (например, ферментов с разной степенью очистки, а также лиофилизированных или иммобилизованных препаратов) и т. д. [Arduini, Amine, 2014; Esimbekova et al., 2014]. Так, в работе [Esimbekova et al., 2013] показано, что дополнительная инкубация препарата иммобилизованной биферментной системы светящихся бактерий R + L в течение 5 мин в растворе сульфата меди приводит к увеличению чувствительности ферментов к данному токсиканту в 10 раз. В последнее время проводятся многочисленные исследования, в которых повышение чувствительности и селективности ферментативных анализов достигается путем использования наноматериалов и новых мутантных форм ферментов [Amine et al., 2016].

Пределы обнаружения токсикантов с помощью ферментативных биосенсоров в значительной степени зависят от типа преоб-

разователя, природы электрода и способа иммобилизации фермента. Так, датчики для детекции фосфорорганических соединений демонстрируют различную чувствительность к пестицидам в зависимости не только от используемого фермента, но и от типа биосенсора [Pundir et al., 2019].

Несмотря на ряд существенных преимуществ, из многочисленных литературных данных понятно, что чувствительность ферментативных тестов к токсикантам часто уступает традиционным хроматографическим методам. Более того, использование ферментов в качестве тест-объектов влечет за собой много предварительной работы. Действительно, ряд токсических веществ, например большинство пестицидов, являются нерастворимыми в воде веществами. Различия растворимости между пестицидами могут влиять на их сольватацию и доступность для фермента в анализе. При концентрациях, близких к пределу растворимости, соединение может находиться не в растворе, а в суспензии, что влияет на способность фермента взаимодействовать с соединением и, следовательно, сказывается на чувствительности метода [Everett, Rechnitz, 1998]. Таким образом, при анализе чувствительности ферментативного метода к тому или иному токсиканту в первую очередь необходимо исследовать воздействие на ферментативную активность используемых растворителей [Andreescu et al., 2002b]. Иммобилизация ферментов позволяет улучшить их стабильность в присутствии растворителей. Однако применение иммобилизованных ферментов может повлечь за собой потерю чувствительности к токсическим веществам. В работе S. Fennouh et al. [1997] показано, что применение 5 % циклогексана в качестве растворителя приводит к увеличению чувствительности ацетилхолинэстеразы к параоксону в 250 раз, однако для иммобилизованного фермента такого эффекта не наблюдали.

Многие авторы скептически относятся к использованию ферментативных методов, аргументируя это тем, что их применение для анализа содержания каких-либо токсикантов в реальных, а не лабораторных образцах невозможно. Действительно, при проведении анализа необходимо учитывать влияние на активность фермента естественных компонентов анализируемой среды. Например, воз-

действие некоторых соединений, таких как фульвокислоты или гуминовые вещества, в пробе воды или почвы может снизить активность фермента даже в отсутствие загрязняющих веществ, что дает ложноположительный результат. В работе В. П. Калябиной с соавт. [2019] формулируются принципы конструирования ферментативных тестов для оценки качества сложных сред, которые заключаются в обеспечении максимальной чувствительности к потенциально токсичным веществам при минимальном воздействии незагрязненных сложных сред.

Открытым остается и вопрос о сочетанном действии загрязняющих веществ. Токсикология смесей остается крайне важным, но недостаточно изученным аспектом при оценке потенциального риска. В ряде работ обсуждаются проблемы токсикологического анализа смесей и возможности применения для этих целей методов математического моделирования [Wilkinson et al., 2000; Feron, Groten, 2002; Carr et al., 2003; Bucur et al., 2018]. В некоторых случаях удается провести идентификацию веществ в смесях путем использования для интерпретации результатов тестирования методов хемометрики. Например, с помощью таких методов, как регрессия главных компонент (PCR), частичная регрессия наименьших квадратов (PLS) и искусственная нейронная сеть (ANN), удалось разделить эффекты, оказываемые карбарилем и фоксимом [Ni et al., 2007], паратионом, малатионом и фенитротиионом [Ni et al., 2004], катехолом и 4-хлорфенолом [Dock et al., 2005]. Для ферментативных методов на основе ацетилхолинэстеразы использование хемометрических методов основано на двух фактах. Во-первых, ингибирование фермента смесью инсектицидов выше по сравнению со степенью ингибирования отдельными пестицидами [Mwila et al., 2013]. Во-вторых, ферменты, выделенные из различных организмов или полученные с помощью методов генной инженерии, обладают различной чувствительностью к разным пестицидам [Songa, Okonkwo, 2016]. В обзоре В. Bucur et al. [2018] подробно рассказано об использовании методов хемометрики для анализа сложных смесей ферментативными методами, проведен критический анализ данных методов.

Следует отметить, что ферментативные тесты не могут заменить собой физико-хими-

ческие аналитические методы анализа. Ферменты, так же как и другие тест-объекты, могут реагировать на целый ряд токсикантов, содержащихся в анализируемом образце, так что их применение для анализа содержания конкретных химических веществ действительно является спорным. Именно из-за отсутствия специфичности ферментативные методы долгое время подвергались усиленной критике [Luque de Castro, Herrera, 2003]. Даже при использовании наиболее популярных методов на основе холинэстераз обнаружение ингибирующего эффекта может говорить лишь о наличии в пробе веществ антихолинэстеразного действия, к которым относятся не только фосфорорганические пестициды, но и карбаматы, ионы тяжелых металлов, фториды, катионные поверхностно-активные вещества и др. [Evtugyn et al., 1998; Marinov et al., 2011].

Надо сказать, что при необходимости сконструировать ферментативный тест, отвечающий за идентификацию конкретного вещества или класса веществ, все-таки возможно. Для этого требуется проведение дополнительной пробоподготовки, позволяющей первоначально удалить или уменьшить содержание в образце интерферирующих примесей [Caroferri et al., 2018]. Однако в этом случае теряются главные преимущества ферментативных методов – быстрота и простота процедуры выполнения.

Итак, без специальной пробоподготовки ферменты выступают лишь в роли индикатора для оценки интегральной токсичности образца, так же как живые тест-объекты в классических биотестах. В свою очередь быстрота и простота выполнения анализов, возможность их автоматизации за счет использования биосенсоров, воспроизводимость и сходимостью результатов ферментативных методов делают их применение целесообразным для первичного быстрого скрининга большого количества проб, предваряющего длительные и дорогостоящие традиционные методы химического анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ферментативное биотестирование прочно завоевало свою нишу, так как относительная простота, возможность автоматизации анализов за счет использования биосенсоров делают эти методы весьма привлекательными и кон-

курентоспособными. Однако проблемы избирательной чувствительности ферментативных тест-систем к воздействию токсических веществ остаются нерешенными. Поэтому возлагать на ферментативные методы функцию количественного анализа какого-либо токсиканта чаще всего нецелесообразно. При этом разнообразие ферментных методов указывает на выход из создавшейся ситуации путем разработки батареи ферментативных тестов.

Для создания комплексного ферментативного биотеста мы предлагаем два подхода, различающиеся принципами подбора ферментативных методов. В первом случае выбирают ферментативные методы, в которых осуществляется связь “ключевые ферменты – функция организма”. Такой подход позволяет отслеживать влияние токсических веществ на активность ключевых ферментов – показателей функционирования основных метаболических цепей человека. В этом случае батарея ферментативных тестов представляет собой своеобразную “ферментативную модель организма”, отражающую влияние токсичной среды на молекулярном уровне. Действительно, включив в батарею тестов ферменты, являющиеся представителями различных классов, или ключевые ферменты метаболических процессов живых организмов, можно предположить, какая из функций жизнедеятельности организмов будет угнетаться тем или иным токсикантом либо смесью токсических веществ.

Во втором случае в батарею ферментативных тестов отбираются ферменты, различающиеся по чувствительности к различным токсикантам, что позволяет максимально точно обнаружить наличие различных токсических веществ в анализируемом образце и даже сделать предварительный прогноз относительно классов содержащихся в образце токсикантов. Так или иначе для включения ферментативного метода в батарею тестов должно выполняться требование о простоте выполнения анализа, обеспечивающее возможность его автоматизации для создания биосенсора.

Разработка и внедрение в практику подобной экспрессной батареи ферментативных тестов позволит качественно изменить подходы к организации экологического мониторинга окружающей среды, оптимизировать схему его проведения. Действительно, использование ферментов вместо живых организмов

позволит увеличить скорость и воспроизводимость анализа, упростить процедуру оценки токсичности, а значит, увеличить количество анализируемых образцов в единицу времени, проследить динамику изменения характеристик окружающей среды в условиях антропогенной нагрузки.

Однако стоит помнить, что ферментативное биотестирование – это лишь способ провести быстрый скрининг токсичности большого количества образцов за короткое время, отбрасывая таким образом те, которые не требуют более детального анализа. Ферментативные методы не заменяют собой традиционные физико-химические методы, поскольку в большинстве своем являются неспецифичными. Таким образом, разные методы, применяемые для оценки состояния окружающей среды, не конкурируют, а дополняют друг друга. Каждый из них имеет как преимущества, так и недостатки. Только комплексное использование разных методов позволяет сделать наиболее точную оценку экотоксикологического состояния объектов окружающей среды.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-14-50238\19.

ЛИТЕРАТУРА

- Воробейчик Е. Л., Садыков О. Ф., Фарафонов М. Г. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем. Екатеринбург: УИФ «Наука», 1994. 280 с.
- Дубовская О. П., Гладышев М. И., Есимбекова Е. Н., Морозова И. И., Гольд З. Г., Махутова О. Н. Изучение возможной связи сезонной динамики естественной смертности зоопланктона в водоеме с изменением токсичности воды // Биол. внутр. вод. 2002. № 3. С. 39–43. [Dubovskaya O. P., Gladyshev M. I., Esimbekova E. N., Morozova I. I., Gold Z. G., Makhutova O. N. Study of possible relation between seasonal dynamics of zooplankton nonconsumptive mortality and water toxicity in a pond // Inland Water Biology. 2002. N 3. P. 39–43].
- Есимбекова Е. Н., Кратасюк В. А., Немцева Е. В., Кудряшева Н. С., Медведева С. Е., Кириллова М. А. Биоломинесцентные биотесты: современное состояние и перспективы / ред. В. А. Кратасюк. Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2018. 256 с.
- Есимбекова Е. Н., Лоншакова-Мукина В. И., Безрукых А. Е., Кратасюк В. А. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для энзимологического анализа // Докл. АН. 2015. Т. 461, № 4. С. 472–475. [Esimbekova E. N., Lonshakova-Mukina V. I., Bezrukikh A. E., Kratasjuk V. A. Design of multicomponent reagents for enzymatic assays // Dokl. Biochem. Biophys. 2015. Vol. 461, N 4. P. 102–105.]

- Есимбекова Е. Н., Немцева Е. В., Кириллова М. А., Асанова А. А., Кратасюк В. А. БиOLUMИнесцентный метод токсикологической оценки наноматериалов // Докл. АН. 2017. Т. 472, № 5. С. 596–599. [Esimbekova E. N., Nemtseva E. V., Kirillova M. A., Asanova A. A., Kratasjuk V. A. Bioluminescent assay for toxicological assessment of nanomaterials // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. Vol. 472, N 1. P. 60–63].
- Калябина В. П., Есимбекова Е. Н., Торгашина И. Г., Копылова К. В., Кратасюк В. А. Принципы конструирования биOLUMИнесцентных ферментативных биотестов для оценки качества сложных сред // Докл. АН. 2019. Т. 485, № 2. С. 229–233. [Kalyabina V. P., Esimbekova E. N., Torgashina I. G., Kopylova K. V., Kratasjuk V. A. Principles for construction of bioluminescent enzyme biotests for analysis of complex media // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. Vol. 485, N 1. P. 107–110].
- Колосова Е. М., Сутормин О. С., Есимбекова Е. Н., Лоншакова-Мукина В. И., Кратасюк В. А. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы // Докл. АН. 2019. Т. 489, № 1. С. 103–107. [Kolossova E. M., Sutormin O. S., Esimbekova E. N., Lonshakova-Mukina V. I., Kratasjuk V. A. Set of enzymatic bioassays for assessment of soil contamination // Dokl. Biol. Sci. 2019. Vol. 489, N 1. P. 165–168].
- Красовский Г. Н., Алексеева Т. В., Егорова Н. А., Жолдакова З. И. Биотестирование в гигиенической оценке качества воды // Гигиена и санитария. 1991. С. 13–16.
- Сутормин О. С., Колосова Е. М., Немцева Е. В., Искорнева О. В., Лисица А. Е., Матвиенко В. С., Есимбекова Е. Н., Кратасюк В. А. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би- и три-ферментной систем // Цитология. 2018. Т. 60, № 10. С. 826–829.
- Шишацкая Е. И., Есимбекова Е. Н., Волова Т. Г., Калачева Г. С., Кратасюк В. А. Гигиеническая оценка полиоксиданов – природных полиэфинов нового поколения // Гигиена и санитария. 2002. № 4. С. 59–63.
- Alonso-Lomillo M. A., Domínguez-Renedo O., Román L. del T.-de, Arcos-Martínez M. J. Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A // Analytica Chimica Acta. 2011. Vol. 688, N 1. P. 49–53.
- Amine A., Arduini F., Moscone D., Palleschi G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition // Biosens. Bioelectron. 2016. Vol. 76. P. 180–194.
- Andrescu S., Avramescu A., Bala C., Magearu V., Marty J.-L. Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase – comparative study of two enzyme sensors // Anal. Bioanal. Chem. 2002a. Vol. 374, N 1. P. 39–45.
- Andrescu S., Noguier T., Magearu V., Marty J.-L. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents // Talanta. 2002b. Vol. 57, N 1. P. 169–176.
- Arduini F., Amine A. Biosensors based on enzyme inhibition // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2014. Vol. 140, P. 299–326.
- Ashrafi A. M., Sys M., Sedláčková E., Farag A. S., Adam V., Příbyl J., Richtera L. Application of the enzymatic electrochemical biosensors for monitoring non-competitive inhibition of enzyme activity by heavy metals // Sensors (Basel). 2019. Vol. 19, N 13. P. 2939.
- Aubert S. D., Li Y., Raushel F. M. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase // Biochemistry. 2004. Vol. 43, N 19. P. 5707–5715.
- Bachan Upadhyay L. S., Verma N. Enzyme inhibition based biosensors: a review // Anal. Lett. 2013. Vol. 46, N 2. P. 225–241.
- Bacmaga M., Kucharski J., Wyszowska J. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin // Environ. Monit. Assess. 2015. Vol. 187, N 10. P. 615.
- Bao J., Hou C., Chen M., Li J., Huo D., Yang M., Luo X., Lei Y. Plant esterase-chitosan/gold nanoparticles-graphene nanosheet composite-based biosensor for the ultrasensitive detection of organophosphate pesticides // J. Agr. Food. Chem. 2015. Vol. 63, N 47. P. 10319–10326.
- Bartkowiak A., Lemanowicz J., Breza-Boruta B. Evaluation of the content of Zn, Cu, Ni and Pb as well as the enzymatic activity of forest soils exposed to the effect of road traffic pollution // Environ. Sci. Pollut. Res. 2017. Vol. 24. P. 23893–23902.
- Blaise C., Ferard J.-F. Small-scale freshwater toxicity investigations. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2005. 552 p.
- Bosch-Orea C., Farré M., Barceló D. Biosensors and bioassays for environmental monitoring // Compr. Anal. Chem. 2017. Vol. 77. P. 337–383.
- Bucur B., Munteanu F.-D., Marty J.-L., Vasilescu A. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection // Biosensors (Basel). 2018. Vol. 8, N 2. P. 27.
- Campaña A. L., Florez S. L., Noguera M. J., Fuentes O. P., Puentes P. R., Cruz J. C., Osma J. F. Enzyme-based electrochemical biosensors for microfluidic platforms to detect pharmaceutical residues in wastewater // Biosensors (Basel). 2019. Vol. 9, N 1. P. 41.
- Capoferri D., Della Pelle F., Del Carlo M., Compagnone D. Affinity sensing strategies for the detection of pesticides in food // Foods. 2018. Vol. 7, N 9. P. 148.
- Carr R. L., Chambers H. W., Chambers J. E., Oppenheimer S. F., Richardson J. R. Modelling the interaction of mixtures of organophosphorus insecticides with cholinesterase. Electron. J. Diff. Eq. / Conference 10. 2003. P. 89–99.
- Caruso G., de Pasquale F., Mita D. G., Micalè V. Digestive enzymatic patterns as possible biomarkers of endocrine disruption in the red mullet (*Mullus barbatus*): A preliminary investigation // Mar. Pollut. Bull. 2016. Vol. 105, N 1. P. 37–42.
- Chauhan N., Pundir C. S. An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides // Anal. Chim. Acta. 2011. Vol. 701, N 1. P. 66–74.
- Chen H., Mousty C., Chen L., Cosnier S. A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor // Mat. Sci. Eng. C. 2008. Vol. 28, N 5–6. P. 726–730.
- Chrouda A., Zinoubi K., Soltane R., Alzahrani N., Osman G., Al-Ghamdi Y. O., Qari S., Al Mahri A., Algethami F. K., Majdoub H., Jaffrezic Renault N. An acetylcholinesterase inhibition-based biosensor for aflatoxin B₁ detection using sodium alginate as an immobilization matrix // Toxins (Basel). 2020. Vol. 12, N 3. P. 173.
- Cosnier S., Mousty C., Cui X., Yang X., Dong S. Specific determination of As(V) by an acid phosphatase-polyphenol oxidase biosensor // Anal. Chem. 2006. Vol. 78, N 14. P. 4985–4989.

- Crane M., Maltby L. The lethal and sublethal responses of *Gammarus pulex* to stress: sensitivity and sources of variation in an *in situ* bioassay // *Environ. Toxicol. Chem.* 1991. Vol. 10, N 10. P. 1331–1339.
- Dang Z., van der Ven L. T. M., Kienhuis A. S. Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribund as approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test // *Chemosphere.* 2017. Vol. 186. P. 677–685.
- Denisov I., Lukyanenko K., Yakimov A., Kukhtevich I., Esimbekova E., Belobrov P. Disposable luciferase-based microfluidic chip for rapid assay of water pollution // *Luminescence.* 2018. Vol. 33, N 6. P. 1054–1061.
- Dock E., Christensen J., Olsson M., Tønning E., Ruzgas T., Emnéus J. Multivariate data analysis of dynamic amperometric biosensor responses from binary analyte mixtures – application of sensitivity correction algorithms // *Talanta.* 2005. Vol. 65, N 2. P. 298–305.
- Dopp E., Pannekens H., Itzel F., Tuerk J. Effect-based methods in combination with state-of-the-art chemical analysis for assessment of water quality as integrated approach // *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 2019. Vol. 222, N 4. P. 607–614.
- Edori O. S., Festus C., Edori E. S. Comparative effects of petrol and diesel on enzyme activity in *Tympanotonus fuscatus* after sublethal exposure // *Pak. J. Biol. Sci.* 2014. Vol. 17, N 4. P. 545–549.
- Edwards C., Duanghathaipornasuk S., Goltz M., Kanel S., Kim D.-S. Peptide nanotube encapsulated enzyme biosensor for vapor phase detection of malathion, an organophosphorus compound // *Sensors (Basel).* 2019. Vol. 19, N 18. P. 3856.
- Ekelund N. G. A., Häder D.-P. Environmental monitoring using bioassays // in book *Bioassays: Advanced Methods and Applications* / eds. D. Hader, G. Erzinger. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018. P. 419–437.
- Elsebai B., Ghica M. E., Abbas M. N., Brett C. M. A. Catalase based hydrogen peroxide biosensor for mercury determination by inhibition measurements // *J. Hazard. Mater.* 2017. Vol. 340. P. 344–350.
- Esimbekova E. N., Asanova A. A., Deeva A. A., Kratasyuk V. A. Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases // *Food Chem.* 2017b. Vol. 235. P. 294–297.
- Esimbekova E. N., Kondik A. M., Kratasyuk V. A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity // *Environ. Monit. Assess.* 2013. Vol. 185, N 7. P. 5909–5916.
- Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O. Application of enzyme bioluminescence in ecology // in book *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology – Volume 1. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* / eds. G. Thouand, R. Marks. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. Vol. 144. P. 67–109.
- Esimbekova E. N., Nemtseva E. V., Bezrukikh A. E., Jukova G. V., Lisitsa A. E., Lonshakova-Mukina V. I., Rimatskaya N. V., Sutormin O. S., Kratasyuk V. A. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials // *Toxicol. In Vitro.* 2017a. Vol. 45. Part 1. P. 128–133.
- Everett W. R., Rechnitz G. A. Mediated bioelectrocatalytic determination of organophosphorus pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor // *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70, N 4. P. 807–810.
- Evtugyn G. A., Budnikov H. C., Nikolskaya E. B. Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination // *Talanta.* 1998. Vol. 46, N 4. P. 465–484.
- Fennouh S., Casimiri V., Burstein C. Increased paraoxon detection with solvents using acetylcholinesterase inactivation measured with a choline oxidase biosensor // *Biosens. Bioelectron.* 1997. Vol. 12, N 2. P. 97–104.
- Feron V. J., Groten J. P. Toxicological evaluation of chemical mixtures // *Food Chem. Toxicol.* 2002. Vol. 40, N 6. P. 825–839.
- Greer J. B., Magnuson J. T., Hester K., Giroux M., Pope C., Anderson T., Liu J., Dang V., Denslow N. D., Schlenk D. Effects of chlorpyrifos on cholinesterase and serine lipase activities and lipid metabolism in brains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Toxicol. Sci.* 2019. Vol. 172, N 1. P. 146–154.
- Gul I., Sheeraz Ahmad M., Saqlan Naqvi S. M., Hussain A., Wali R., Ahmad Farooqi A., Ahmed I. Polyphenol oxidase (PPO) based biosensors for detection of phenolic compounds: A Review // *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 2017. Vol. 5, N 3. P. 72–85.
- Hani Y. M. I., Turies C., Palluel O., Delahaut L., Gaillet V., Bado-nilles A., Porcher J.-M., Geffard A., Dédouge-geffard O. Effects of chronic exposure to cadmium and temperature, alone or combined, on the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Interest of digestive enzymes as biomarkers // *Aquat. Toxicol.* 2018. Vol. 199. P. 252–262.
- Hossain S. M. Z., Brennan J. D. β -Galactosidase-Based Colorimetric Paper Sensor for Determination of Heavy Metals // *Anal. Chem.* 2011. Vol. 83, N 22. P. 8772–8778.
- Hussain Ch. M., Keçili R. Environmental pollution and environmental analysis // in book *Modern Environmental Analysis Techniques for Pollutants.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2020a. P. 1–36.
- Hussain Ch. M., Keçili R. Future of environmental analysis // in book *Modern Environmental Analysis Techniques for Pollutants.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2020b. P. 381–398.
- Istomina A., Chelomin V., Kukla S., Zvyagintsev A., Karpenko A., Slinko E., Dovzhenko N., Slobodskova V., Kolosova L. Copper effect on the biomarker state of the *Mizuhopecten yessoensis* tissues in the pre-spawning period // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2019. Vol. 70. P. 103189.
- Jain M., Yadav P., Joshi A., Kodgire P. Advances in detection of hazardous organophosphorus compounds using organophosphorus hydrolase based biosensors // *Crit. Rev. Toxicol.* 2019. Vol. 49, N 5. P. 387–410.
- Jaworska H., Lemanowicz J. Heavy metal contents and enzymatic activity in soils exposed to the impact of road traffic // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. N 19981.
- Jemec A., Drobne D., Tisler T., Sepčić K. Biochemical biomarkers in environmental studies – lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2010. Vol. 17, N 3. P. 571–581.
- Jia L., Zhou Y., Wu K., Feng Q., Wang C., He P. Acetylcholinesterase modified AuNPs-MoS 2-rGO/PI flexible film biosensor: Towards efficient fabrication and application in paraoxon detection // *Bioelectrochem.* 2020. N 107392.
- Karousos N. G., Aouabdi S., Way A. S., Reddy S. M. Quartz crystal microbalance determination of organophosphorus and carbamate pesticides // *Anal. Chim. Acta.* 2002. Vol. 469, N 2. P. 189–196.

- Khare A., Chhawani N., Kumari K. Glutathione reductase and catalase as potential biomarkers for synergistic intoxication of pesticides in fish // *Biomarkers*. 2019. Vol. 24, N 7. P. 666–676.
- Kratasyuk V. A. Principle of luciferase biotesting // *Proceeding of the First Int. School "Biological luminescence"*. Singapore: World Scientific Publishing Co., 1990. P. 550–558.
- Kratasyuk V., Esimbekova E. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology // *Comb. Chem. High. T. Scr.* 2015. Vol. 18, N 10. P. 952–959.
- Kratasyuk V. A., Esimbekova E. N., Gladyshev M. I., Khromichek E. B., Kuznetsov A. M., Ivanova E. A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems // *Chemosphere*. 2001. Vol. 42, N 8. P. 909–915.
- Kratasyuk V. A., Kuznetsov A. M., Rodicheva E. K., Egorova O. I., Abakumova V. V., Gribovskaya I. V., Kalacheva G. S. Problems and prospects of bioluminescence assays in ecological monitoring // *Sib. J. Ecol.* 1996. Vol. 5. P. 397–403.
- Kratasyuk V. A., Vetrova E. V., Kudryasheva N. S. Bioluminescent water quality monitoring of salt lake Shira // *Luminescence*. 1999. Vol. 14, N 4. P. 193–195.
- Kudryasheva N. S., Kovel E. S. Monitoring of low-intensity exposures via luminescent bioassays of different complexity: cells, enzyme reactions and fluorescent proteins // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, N 18. N 4451.
- Kudryasheva N. S., Tarasova A. S. Pollutant toxicity and detoxification by humic substances: mechanisms and quantitative assessment via luminescent biomonitoring // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015. Vol. 22, N 1. P. 155–167.
- Kudryasheva N. S., Kudinova I. Y., Esimbekova E. N., Kratasyuk V. A., Stom D. I. The influence of quinones and phenols on the triple NAD(H)-dependent enzyme systems // *Chemosphere*. 1999. Vol. 38, N 4. P. 751–758.
- Law K. A., Higson S. P. J. Sonochemically fabricated acetylcholinesterase micro-electrode arrays within a flow injection analyser for the determination of organophosphate pesticides // *Biosens. Bioelectron.* 2005. Vol. 20, N 10. P. 1914–1924.
- Li Z. H., Li P., Shi Z.-C. Molecular responses in digestive tract of juvenile common carp after chronic exposure to sublethal tributyltin // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014. Vol. 109. P. 10–14.
- Li Z. H., Zlabek V., Grabic R., Li P., Machova J., Velisek J., Randak T. Effects of exposure to sublethal propiconazole on intestine-related biochemical responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Chem. Biol. Interact.* 2010. Vol. 185, N 3. P. 241–246.
- Lillicrap A., Belanger S., Burden N., du Pasquier D., Embry M. R., Halder M., Lampi M. A., Lee L., Norberg-King T., Rattner B. A., Schirmer K., Thomas P. Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: A review of developments over the last 2 decades and current status // *Environ. Toxicol. Chem.* 2016. Vol. 35, N 11. P. 2637–2646.
- Lima L. B. D., de Moraes P. B., de Andrade R. L. T., Matos L. V., Moron S. E. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture // *Environ. Pollut.* 2018. Vol. 237. P. 611–624.
- Lonshakova-Mukina V., Esimbekova E., Kratasyuk V. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors // *Sens. Actuat. B-Chem.* 2015. Vol. 213. P. 244–247.
- Lopes R. M., Filho M. V. S., de Salles J. B., Bastos V. L. F. C., Bastos J. C. Cholinesterase activity of muscle tissue from freshwater fishes: characterization and sensitivity analysis to the organophosphate methyl-paraoxon // *Environ. Toxicol. Chem.* 2014. Vol. 33, N 6. P. 1331–1336.
- Lukyanenko K. A., Denisov I. A., Sorokin V. V., Yakimov A. S., Esimbekova E. N., Belobrov P. I. Handheld enzymatic luminescent biosensor for rapid detection of heavy metals in water samples // *Chemosensors, Special Issue "Chemical Sensors for Heavy Metals/Toxin Detection"*. 2019. Vol. 7, N 1. P. 16.
- Lukyanenko K. A., Denisov I. A., Yakimov A. S., Esimbekova E. N., Belousov K. I., Bukatin A. S., Kukhtevich I. V., Sorokin V. V., Evstrapov A. A., Belobrov P. I. Analytical enzymatic reactions in microfluidic chips // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. Vol. 53, N 7. P. 775–780.
- Luque de Castro M. D., Herrera M. C. Enzyme inhibition-based biosensors and biosensing systems: questionable analytical devices // *Biosens. Bioelectron.* 2003. Vol. 18, N 2-3. P. 279–294.
- Lyubanova M., Boteva S. Biotests in Ecotoxicology: Current Practice and Problems // in book *Toxicology – New Aspects to This Scientific Conundrum*/ eds. M. L. Larramendy, S. Soloneski. Rijeka, Croatia: Intech, 2016. P. 147–177.
- Marinov I., Ivanov Y., Vassileva N., Godjevargova T. Amperometric inhibition-based detection of organophosphorus pesticides in unary and binary mixtures employing flow-injection analysis // *Sens. Actuat. B-Chem.* 2011. Vol. 160, N 1. P. 1098–1105.
- Marques S. M., Esteves da Silva J. C. G. Quantitative analysis of organophosphorus pesticides in freshwater using an optimized firefly luciferase-based coupled bioluminescent assay // *Luminescence*. 2014. Vol. 29, N 4. P. 378–385.
- Mazzei F., Botre F., Botre C. Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides // *Anal. Chim. Acta.* 1996. Vol. 336, N 1-3. P. 67–75.
- McDaniel C. // *United States Patent Appl.* 20040109853. 2004.
- Muenchen D. K., Martinazzo J., Brezolin A. N., de Ceza-ro A. M., Rigo A. A., Mezarroba M. N., Manzoli A., de Lima Leite F., Steffens J., Steffens C. Cantilever Functionalization Using Peroxidase Extract of Low Cost for Glyphosate Detection // *Appl. Biochem. Biotech.* 2018. Vol. 186, N 4. P. 1061–1073.
- Mwila K., Burton M. H., van Dyk J. S., Pletschke B. I. The effect of mixtures of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and application of chemometrics to identify pesticides in mixtures // *Environ. Monitor. Assess.* 2013. Vol. 185, N 3. P. 2315–2327.
- Narra M. R., Begum G., Rajender K., Rao J. V. *In vivo* impact of monocrotophos on biochemical parameters of a freshwater fish during subacute toxicity and following cessation of exposure to the insecticide // *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 2011. Vol. 66, N 9-10. P. 507–514.
- Ni Y., Cao D., Kokot S. Simultaneous enzymatic kinetic determination of pesticides, carbaryl and phoxim, with the aid of chemometrics // *Anal. Chim. Acta.* 2007. Vol. 588, N 1. P. 131–139.
- Ni Y., Huang C., Kokot S. Application of multivariate calibration and artificial neural networks to simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of

- carbamate pesticides // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2004. Vol. 71, N 2. P. 177–193.
- Pachapur P. K., Martínez A. D. L., Pulicharla R., Pachapur V. L., Brar S. K., Galvez-Cloutier R. Advances in protein/enzyme-based biosensors for the detection of pesticide contaminants in the environment // in book *Tools, Techniques and Protocols for Monitoring Environmental Contaminants* / eds. S. K. Brar, K. Hegde, V. L. Pachapur. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2019. P. 231–243.
- Pandard P., Devillers J., Charissou A.-M., Poulsen V., Jourdain M.-J., Férard J.-F., Grand C., Bispo A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes // *Sci. Total Environ.* 2006. Vol. 363, N 1–3. P. 114–125.
- Pandey L. K., Lavoie I., Morin S., Depuydt S., Lyu J., Lee H., Jung J., Yeom D.-H., Han T., Park J. Towards a multi-bioassay-based index for toxicity assessment of fluvial waters // *Environ. Monit. Assess.* 2019. Vol. 191. P. 112.
- Parmar T. K., Rawtani D., Agrawal Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution // *Front. Life Sci.* 2016. Vol. 9, N 2, P. 110–118.
- Pohanka M. Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review // *Molecules.* 2019. Vol. 24, N 3. P. 616.
- Pundir C. S., Malik A., Preety. Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review // *Biosens Bioelectron.* 2019. Vol. 140. P. 111348.
- Rimatskaya N. V., Nemtseva E. V., Kratasyuk V. A. Bioluminescent assays for monitoring air pollution // *Luminescence.* 2012. Vol. 27, N 2. P. 154.
- Sachkova A. S., Kovel E. S., Churilov G. N., Stom D. I., Kudryasheva N. S. Biological activity of carbonic nano-structures – comparison via enzymatic bioassay // *J. Soils Sedim.* 2019. Vol. 19, N 6. P. 2689–2696.
- Schiffelers M.-J. W. A., Blaauboer B. J., Bakker W. E., Beken S., Hendriksen C. F. M., Koeter H. B. W. M., Krul C. Regulatory acceptance and use of 3R models for pharmaceuticals and chemicals: Expert opinions on the state of affairs and the way forward // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2014. Vol. 69, N 1. P. 41–48.
- Seitkalieva A. V., Menzorova N. I., Rasskazov V. A. Application of different enzyme assays and biomarkers for pollution monitoring of the marine environment // *Environ. Monit. Assess.* 2016. Vol. 188, N 1. P. 70.
- Selivanova M. A., Mogilnaya O. A., Badun G. A., Vydryakova G. A., Kuznetsov A. M., Kudryasheva N. S. Effect of tritium on luminous marine bacteria and enzyme reactions // *J. Environ. Radioact.* 2013. Vol. 120. P. 19–25.
- Shanks N., Greek R., Greek J. Are animal models predictive for humans? // *Philos. Ethics Humanit. Med.* 2009. Vol. 4, N 1. N 2.
- Shtenberg G., Massad-Ivanir N., Segal E. Detection of trace heavy metal ions in water by nanostructured porous Si biosensors // *Analyst.* 2015. Vol. 140, N 13. P. 4507–4514.
- Simonian A. L., Flounders A. W., Wild J. R. Fet-based biosensors for the direct detection of organophosphate neurotoxins // *Electroanalysis.* 2004. Vol. 16, N 22. P. 1896–1906.
- Sogorb M. A., Estévez J., Vilanova E. Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics // in book *Biomarkers in Toxicology* / ed. R. C. Gupta. San Diego, USA: Elsevier Academic Press, 2014. P. 965–973.
- Soldatkin O. O., Kucherenko I. S., Pyeshkova V. M., Kukla A. L., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A. V., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions // *Bioelectrochemistry.* 2012. Vol. 83. P. 25–30.
- Solná R., Dock E., Christenson A., Winther-Nielsen M., Carlsson C., Emnéus J., Ruzgas T., Skládal P. Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases // *Anal. Chim. Acta.* 2005. Vol. 528, N 1. P. 9–19.
- Songa E. A., Okonkwo J. O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review // *Talanta.* 2016. Vol. 155. P. 289–304.
- Stasyuk N., Gayda G., Zakalskiy A., Zakalska O., Errachid A., Gonchar M. Highly Selective Apo-Arginase Based Method for Sensitive Enzymatic Assay of Manganese (II) and Cobalt (II) Ions // *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 193. P. 349–356.
- Syshchik O., Skryshevsky V. A., Soldatkin O. O., Soldatkin A. P. Enzyme biosensor systems based on porous silicon photoluminescence for detection of glucose, urea and heavy metals // *Biosens. Bioelectron.* 2015. Vol. 66. P. 89–94.
- Tekaya N., Saiapina O., Ouada H. B., Lagarde F., Namour P., Ouada H., Jaffrezic-Renault N. Bi-enzymatic conductometric biosensor for detection of heavy metal ions and pesticides in water samples based on enzymatic inhibition in *Arthrospira platensis* // *J. Environ. Prot.* 2014. Vol. 5. P. 441–453.
- Terekhova V. A., Wadhia K., Fedoseeva E. V., Uchanov P. V. Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions // *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 2018. Vol. 419, P. 32.
- Van Dyk J. S., Pletschke B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment // *Chemosphere.* 2011. Vol. 82, N 3. P. 291–307.
- Vetrova E., Esimbekova E., Rimmel N., Kotova S., Beloskov N., Kratasyuk V., Gitelson I. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water // *Luminescence.* 2007. Vol. 22, N 3. P. 206–214.
- Vetrova E., Kratasyuk V., Kudryasheva N. Bioluminescent characteristics of Lake Shira water // *Aquat. Ecol.* 2002. Vol. 36. P. 309–315.
- Vighi M., Villa S. Ecotoxicology: The Challenges for the 21st Century // *Toxics.* 2013. Vol. 1, N 1. P. 18–35.
- Wang C., Zhang Q., Wang F., Liang W. Toxicological effects of dimethomorph on soil enzymatic activity and soil earthworm (*Eisenia fetida*) // *Chemosphere.* 2017. Vol. 169. P. 316–323.
- Wang J.-I., Xia Q., Zhang A.-P., Hu X.-Y., Lin C.-M. Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables by an enzyme inhibition method using α -naphthyl acetate esterase extracted from wheat flour // *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* 2012. Vol. 13, N 4. P. 267–273.
- Wang N. Increasing the reliability and reproducibility of aquatic ecotoxicology: Learn lessons from aquaculture research // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. Vol. 161. P. 785–794.
- Wattthaisong P., Pongpamorn P., Pimviriyakul P., Maenpuen S., Ohmiya Y., Chaiyen P. A chemo-enzymatic cascade for the smart detection of nitro- and haloge-

- nated phenols // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019. Vol. 58, N 38. P. 13254–13258.
- Weyandt R. G. Okologische bewertung von arbeitsflüssigkeiten und schmierölen durch biotests // *Olhydraul. und Pheum.* 1990. Vol. 34, N 6. P. 396–398.
- Wieczerek M., Namieśnik J., Kudlak B. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review // *Environ. Int.* 2016. Vol. 94. P. 341–361.
- Wilkinson C. F., Christoph G. R., Julien E., Kelley J. M., Kronenberg J., McCarthy J., Reiss R. Assessing the risks of exposures to multiple chemicals with a common mechanism of toxicity: How to cumulate? // *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 2000. Vol. 31, N 1. P. 30–43.
- Xu T., Close D., Smartt A., Ripp S., Sayler G. Detection of organic compounds with whole-cell bioluminescent bioassays // in book *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology – Volume 1.* *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* / eds. G. Thouand, R. Marks. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. Vol. 144. P. 111–151.
- Yang X., Dai J., Zhao S., Li R., Goulette T., Chen X., Xiao H. Identification and characterization of a novel carboxylesterase from *Phaseolus vulgaris* for detection of organophosphate and carbamates pesticides // *J. Sci. Food. Agric.* 2018. Vol. 98, N 13. P. 5095–5104.
- Zhang C., Zhou T., Zhu L., Juhasz A., Du Z., Li B., Wang J., Wang J., Sun Y. Response of soil microbes after direct contact with pyraclostrobin in fluvo-aquic soil // *Environ. Pollut.* 2019. Vol. 255. Pt. 1. N 113164.
- Zhang Y., Zeng C.-M., Tang L., Huang D.-L., Jiang X.-Y., Chen Y.-N. A hydroquinone biosensor using modified core-shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode // *Biosens. Bioelectron.* 2007. Vol. 22, N 9–10. P. 2121–2126.
- Zheng Y., Liu Z., Jing Y., Li J., Zhan H. An acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquid functionalized graphene-gelatin-modified electrode for sensitive detection of pesticides // *Sensor Actuat. B-Chem.* 2015. Vol. 210. P. 389–397.

Enzymatic biotesting: scientific basis and application

E. N. ESIMBEKOVA^{1, 2,*}, I. G. TORGASHINA¹, V. P. KALYABINA^{1, 2}, V. A. KRATASYUK^{1, 2}

¹*Siberian Federal University*
660041, Krasnoyarsk, Svobodnyi av., 79

²*Institute of Biophysics of SB RAS*
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/50
E-mail: esimbekova@yandex.ru

The paper provides a review of the current state of research in the field of biotesting. Authors discuss the problems of environmental studies and ways to solve them. The basic principles and examples of the use of enzymes for the detection of toxicants in various environmental samples are considered. Based on the analysis of numerous published data, the advantages and limitations, as well as the prospects for using enzymes for performing biotesting tasks, are estimated. A separate section of the review is devoted to bioluminescent enzymatic bioassays developed by the authors. These bioassays are successfully implemented for environmental monitoring of water, soil, and air. The necessity of developing a battery of enzymatic bioassays is substantiated. It allows to have the most complete and accurate information about the levels of environmental pollution.

Key words: biotesting, enzymatic bioassays, bioluminescence, environmental monitoring, pesticides, heavy metals.