

Люминесцентные цельноклеточные биосенсоры в детекции экотоксикантов (обзор)

© 2020. Э. Ш. Шемшединова, ассистент, Э. Р. Абдураманова, ассистент,
Е. В. Морозкина, к. х. н., старший преподаватель,
А. М. Кацев, д. б. н., профессор, зав. кафедрой,
Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского,
Медицинская академия имени С. И. Георгиевского,
295051, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, бульвар Ленина, д. 5/7,
e-mail: katsev@mail.ru, elvisa.shemshedinova@mail.ru

Анализ современных литературных источников показывает перспективность использования оптических биосенсоров в биомониторинге экотоксикантов. В работе рассмотрены современные разработки люминесцентных цельноклеточных биосенсорных устройств на основе природных и генномодифицированных штаммов. Их применяют для детекции широкого ряда веществ: тяжёлые металлы, гербициды и пестициды, поверхностно-активные вещества в природных и сточных водах, в почвах. Показана актуальность использования биосенсоров на основе иммобилизованных фотобактерий за счёт ряда преимуществ, таких как портативность, высокая чувствительность, быстрое действие и экономичность по сравнению с другими биосенсорами. Проанализированы технологии конструирования бактериальных биосенсоров, принципы их действия, перспективность в экспресс-оценке содержания поллютантов в экосистеме. В настоящее время продолжается поиск оптимального носителя, подбираются условия иммобилизации бактерий с целью увеличения интенсивности и стабильности люминесценции; проводятся работы по повышению чувствительности и селективности тест-культур.

Ключевые слова: бактериальная люминесценция, люминесцентные бактерии, биолюминесцентный анализ, биосенсоры, биорепортёры, экотоксичность.

Luminescent whole-cell biosensors in detection of environmental contaminants (review)

© 2020. E. Sh. Shemshedinova ORCID: 0000-0003-3420-117X,
E. R. Abduramanova ORCID: 0000-0002-6432-7382,
E. V. Morozkina ORCID: 0000-0002-5415-182X,
A. M. Katsev ORCID: 0000-0002-7762-3818,
V. I. Vernadsky Crimean Federal University,
S. I. Georgievsky Medical Academy,
5/7, Lenina Bulvar, Simferopol, Republic of Crimea, Russia, 295051,
e-mail: katsev@mail.ru, elvisa.shemshedinova@mail.ru

The advantages of various optical biosensors application in environmental pollution monitoring have been reviewed and evaluated. These biosensors allow testing only the components bioavailable for living cell, assessing their toxic or mutagenic hazard. Examples of the use of a broad spectrum of modern whole-cell luminescent biosensors based on natural marine luminescent bacteria and genetically engineered strains have been presented. The luminescent bioassays quantify the physiological changes demonstrated by luminescent bacteria due to metabolic disruption induced by toxic components. They are found to be applicable to all types of pollutants (heavy metals, herbicides, pesticides, surfactants) in water streams, wastewater, and contaminated sediments. The whole-cell luminescent biosensors can be used to study some processes in cells that were not previously available for analysis. They allow determining not only different toxicants influence on the luminescence level intensity of luminescent bacteria, but also understanding their physiological effect on the bacteria cell. This review pays a special attention to some luminescent biosensors containing immobilized luminescent bacteria on different organic and inorganic carriers and the whole-cell organism's immobilization methods. The advantages offered by immobilized luminescent bacteria whole-cell toxicity testing include portability, high sensitivity, low cost, and rapid responses. This fact stimulates a development and improvement of the biosensor devices based on luminescent bacteria. A great potential of the whole-cell luminescent biosensors application in on-line environmental toxicity monitoring has been demonstrated. It has been summarized the relevance of immobilized luminescent bacteria whole-cell biosensors design problems such as luminescence stability, sensitivity and selectivity of the test-culture.

Keywords: bacterial bioluminescence, luminescent bacteria, bioluminescence assay, biosensor, bioreporter, ecotoxicity.

Глобальной проблемой экологии на данный момент является загрязнение окружающей среды в связи с интенсивной индустриализацией общества. Особую опасность представляют соли тяжёлых металлов (ТМ), поверхностно-активные вещества (ПАВ), пестициды, нефтепродукты. Поэтому актуальным становится разработка надёжных методов экспресс-оценки содержания экотоксикантов. Использование традиционных аналитических методов анализа таких, как спектроскопические, электрохимические методы, газовая хроматография, масс-спектрометрия и др., несмотря на избирательность и высокую точность, не всегда даёт желаемый результат, так как не учитывает общее токсикологическое действие соединений загрязнителей на биологические объекты [1]. Основным критерием токсичности в этих методах является превышение предельно допустимых концентраций (ПДК) токсикантов, однако не для всех соединений, производимых человеком, разработаны методики определения и обоснованные значения ПДК. Кроме того, химические и физико-химические методы требуют дорогостоящего оборудования, высококвалифицированного персонала, длительной пробоподготовки и не пригодны для полевого анализа [2]. Поэтому в настоящее время разрабатываются простые, надёжные и экспрессные методы анализа токсического воздействия поллютантов [3]. На сегодняшний день в интегральной оценке качества окружающей среды широко применяются различные аналитические системы, включающие в себя биологический чувствительный элемент (ферменты, клетки и отдельные организмы), связанный с преобразователем, действие которого заключается в распознавании информации и её передаче. Такие аналитические системы называются биосенсорами [4]. В качестве организмов-сенсоров широко используют простейшие (*Tetrahymena thermophila*), микроводоросли (*Selenastrum capricornutum*) и беспозвоночные (*Daphnia magna*) [5]. Установлено, что с повышением уровня биологической организации тест-объектов усложняется и становится неоднозначной взаимосвязь регистрируемого сигнала с токсическими факторами. Наиболее перспективными являются устройства на основе морских фотобактерий [6–9], за счёт ряда преимуществ, таких как, простота в использовании, высокая скорость анализа, низкая стоимость и чувствительность к широкому спектру токсикантов [10–13].

Практическое применение таких биосенсоров основано на анализе активности их люминесцентной системы, связанной с метаболизмом и клеточным дыханием бактериальной клетки. Оценка изменения люминесценции фотобактерий в ответ на действие внешних факторов является эффективным методом определения общей токсичности *in vitro* широкого спектра веществ. Это даёт возможность использовать биолюминесцентный метод для первичного отбора синтезируемых веществ на определённые виды биологической активности, а также для получения первичной информации об их токсичности [14, 15].

Целью настоящего обзора является анализ современных данных о биосенсорных устройствах на основе морских люминесцентных бактерий.

Морские люминесцентные фотобактерии и механизм их биолюминесценции

Люминесцирующие бактерии представлены четырьмя родами морских микроорганизмов: *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio* и *Shewanella*, а также наземным родом *Photorhabdus*. Люминесцирующие бактерии находятся в морских экосистемах как во взвешенном состоянии (в виде свободно живущих форм), так и в виде колоний, которые прикрепляются к поверхности других организмов [3].

Уникальной особенностью данных микроорганизмов является их способность к биолюминесценции [16]. Это явление представляет собой ферментативный процесс, сопровождающийся потреблением кислорода и высвобождением квантов света в сине-зелёной части спектра. Ферменты биолюминесцентных реакций называются люциферазами, а участвующие в этих реакциях субстраты в большинстве случаев определяются как «люциферины». Одним из таких субстратов является восстановленный флавиномононуклеотид (FMN), способный принимать и отдавать два атома водорода, вторым – длинноцепочечный алифатический альдегид с 8–16 атомами углерода. В общем виде реакция свечения сводится к окислению восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH₂) до FMN с одновременным окислением длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) до соответствующей жирной кислоты (RCOOH):



Представленные схемы реакций свидетельствуют о сложности процесса бактериального свечения, обеспечиваемого не только люциферазой, но и многокомпонентными ферментными системами, ответственными за субстраты [17]. Следует отметить, что кроме бактериальной люциферазы некоторые люминесцентные бактерии несут дополнительные флуоресцентные белки, способные модулировать цвет световой эмиссии в сторону более низких или высоких длин волн. За биосинтез белков и других веществ, которые необходимы для бактериальной биолюминесценции, ответственны «lux-гены». Их количество превышает два десятка, а перечень названий варьирует от luxA до luxZ. Среди них выделяют структурные или кодирующие белки, которые участвуют в светоизлучении, и регуляторные – ответственные за позитивный и негативный контроль этого процесса. Как правило, они собраны в относительно протяжённые генные последовательности, называемые lux-операми. Экспрессия lux-опера обеспечивается механизмом, действующим по принципу положительной обратной связи и опосредованным накоплением в среде низкомолекулярных веществ – аутоиндукторов (АИ). Последние образуются и выделяются клетками на всех фазах роста, и поэтому их концентрация в среде пропорциональна плотности бактериальной культуры. Достигая некоторого порогового значения, АИ ведут к активизации свечения образующих их бактерий, что оказывается возможным только при высокой плотности бактериальной популяции, вследствие этого описанное явление получило название «quorum sensing» (QS) [18]. Этот эффект связан с процессом коллективной координации экспрессии генов в популяции бактерий, опосредующий специфическое поведение клеток, в частности, их способность к биолюминесценции.

К настоящему времени описано клонирование и экспрессия десяти генов люминесцентной системы светящихся бактерий *Vibrio harveyi*, *Aliivibrio fischeri* и *Photobacterium leiognathi* в плазмидном векторе клеток различных микроорганизмов [19]. При разработке биосенсорных устройств используют как нативные, так и генномодифицированные (с клонированными в них lux-генами). Введение lux-гена позволяет создавать ультрачувствительные, избирательные биосенсоры, иммуносенсоры, сенсоры на основе гибридных нуклеиновых кислот. Например, были сконструированы бактерии, которые под действием

определённых токсикантов начинают светиться ярче [20].

Основные типы биотестов на основе люминесцентных бактерий

Реализован коммерческий выпуск тест-систем: «Microtox» («Azur Environmental», США), «Toxalert» («Merck», США) на основе бактерий *P. phosphoreum*. Наибольшее применение за рубежом нашли биотесты на основе природных морских светящихся бактерий *A. fischeri* «Mutatox» [11] и «Microtox» (США), «LUMIStox» (Великобритания) [21]. В России широко используются технологии экологического контроля с использованием высокочувствительных специализированных микробных сенсоров «Эколюм», разработанные на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, а также в ряде экспериментов применяется ферментативный препарат «Комплект реактивов для биолюминесцентного анализа» (КРАБ), выпускаемый ИБСО РАН [22].

Впервые биосенсор с биологическим чувствительным элементом – клетками бактерий *A. fischeri* и *V. harveyi* был использован для определения токсичности воды, оценка которой производилась по величине ингибирования биолюминесценции – ЭК₅₀ (эффективная концентрация вещества, вызывающая 50%-ное снижение бактериальной биолюминесценции) [3]. В дальнейшем был произведён целый ряд клеточных биосенсоров с целью мониторинга качества питьевых, поверхностных, грунтовых и сточных вод [12, 13, 17–19]. В частности, проведена работа по изучению возможностей биолюминесцентного анализа при тестировании минеральных вод и его адаптации к особенностям исследуемых объектов [20].

Однако биолюминесцентное биотестирование не ограничивается использованием уже разработанных тест-систем. Ведётся постоянная работа по выделению новых тест-культур, использование которых повышало бы уровень тестирования. В работе [23] был выделен из Каспийского моря и идентифицирован штамм *Vibrio* sp. MM1, который обладал высокой чувствительностью к катионам ТМ, включая Cd, Pb(II), Cu(II), Ni(II), Co(II) и Zn. Цитотоксичное влияние было определено для каждого ТМ с помощью ЭК₅₀. Для Zn²⁺ значение ЭК₅₀ составило 0,97 мг/л, для Ni²⁺ 3,00 мг/л, 3,62 мг/л для Cu²⁺, 5,75 мг/л для Pb²⁺, 6,16 мг/л для Co²⁺ и 14,54 мг/л для Cd²⁺, соответственно. Результаты показали, что

данный штамм обладал наибольшей чувствительностью к соединениям цинка и низкой – к соединениям кадмия. Для того, чтобы отнести данный штамм к перспективным для биолюминесцентного анализа, необходимо провести дополнительные исследования для определения чувствительности выделенной бактерии к пестицидам и другим опасным соединениям.

Оптические биосенсоры на основе иммобилизованных живых клеток люминесцентных бактерий

Для создания более удобных, экспрессных и экономичных методов биотестирования создаются биосенсоры путём иммобилизации биологических объектов на различных подложках [24–32]. Этап «узнавания» заключается во взаимодействии чувствительного биологического элемента биосенсора (биодатчика), иммобилизованного на некотором носителе, с анализируемыми веществами в водной или газообразной средах. Передача сигнала осуществляется в результате непосредственного контакта биологического объекта с датчиком, преобразующим его ответную реакцию на то или иное воздействие в количественный сигнал, причём преобразователь должен быть надёжным, избирательным, высокочувствительным в определённом диапазоне концентраций, экспрессным [25]. Иммобилизация биологического чувствительного элемента осуществляется за счёт физической сорбции (специфическая и неспецифическая), ковалентной пришивки, встраивания в мембрану. Обычно иммобилизация за счёт сорбции осуществляется простым погружением подложки как органической (различные полимерные материалы), так и неорганической природы в раствор с биологическим объектом [26, 28]. Десорбцию можно предотвратить за счёт сшивки слоя сорбированных частиц друг с другом. Ковалентные пришивки особенно актуальны при иммобилизации белков, при необходимости их прочной фиксации, однако условия, при которых осуществляется ковалентная пришивка, часто приводят к нарушению структуры белков и потере их активности. Для создания мембран используют полиакриламидный гель, желатин, латекс натурального каучука, поливиниловый спирт, крахмал, целлюлозу, агарозный, сефарозный и альгинатный гели, поливинилхлорид, поливинилацетат, поликарбамоилсульфонат, микропористые фильтры, полимеры из сульфонатстирена, дивинилбензена и других

материалов. Традиционным материалом для изготовления мембран считается поливиниловый спирт [26, 27]. Большую популярность при иммобилизации ферментов и клеток получили альгинаты, способные образовывать гели в присутствии двухвалентных катионов металлов.

Создан оптоволоконный биосенсор для детекции ТМ в воде на основе морских бактерий *A. fischeri*, инкапсулированных в альгинатных микросферах. Cu(II), Cd, Pb(II), Zn, Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I) и Fe(II) были выбраны в качестве модельных токсикантов для оценки эффективности микробиосенсора [33]. Биосенсор, на основе иммобилизованных бактерий в микросферах альгината, показал нижний предел обнаружения для Cu(II) (6,40 мкг/л), Cd (1,56 мкг/л), Pb(II) (47 мкг/л), Ag(I) (18 мкг/л), Zn (320 мкг/л), Cr(VI) (1000 мкг/л), Co(II) (1700 мкг/л), Ni(II), (2800 мкг/л) и Fe(III) (3100 мкг/л). Полученные результаты продемонстрировали высокую чувствительность данного биосенсора, в сравнении с ранее созданными бактериальными цельноклеточными сенсорами, полученными иммобилизацией бактерий в гель агара, гель агарозы и биоматрицу мембраны целлюлозы. Бактерии, микрокапсулированные в альгинатном биополимере, сохраняли свою метаболическую активность в течение продолжительного периода, до шести недель без каких-либо заметных изменений в реакции биолюминесценции. Разработанный оптический биосенсор можно использовать для количественной микродетекции ТМ в экологических образцах воды.

Основной целью работы [34] являлось создание простого в использовании биосенсора, предназначенного для мониторинга токсичности *in situ*. Основа биосенсора – бактериальная карта, содержащая биолюминесцентные клетки *A. fischeri* ATCC®49387™, иммобилизованные в матрице агарозы. Сменная карта была конструирована так, чтобы обеспечить максимальный контакт между клетками и образцами поллютантов. После использования бактериальная карта легко заменяется, что значительно упрощает техническое обслуживание. Была проведена предварительная работа по подбору оптимальных параметров (состав питательной среды и концентрация агарозы), обеспечивающих стабильный и высокий сигнал биолюминесценции. Далее было проведено сравнение полученного биосенсорного устройства с традиционным методом, основанным на определении ингибиторного

воздействия проб воды на свечение лиофилизированных бактерий *A. fischeri* (стандарт ISO 11348) в оценке общей токсичности. В качестве модельного токсиканта был использован нафталин. Однако, биосенсор показал более низкую чувствительность к нафталину (эффективная концентрация ЭК₅₀ = 95 мг/л) по сравнению с результатами, полученными с помощью эталонного метода (ЭК₅₀ = 43 мг/л).

Несмотря на существующее разнообразие носителей для фиксирования бактерий, многие из них не могут быть использованы из-за снижения функциональных показателей микроорганизмов. Лишь гели, сформированные на основе сефарозы и поливинилового спирта, позволяли в какой-то мере регистрировать биолюминесценцию клеток [11, 26]. Поэтому ведётся активная работа по увеличению чувствительности биосенсорных устройств, подбираются оптимальные условия иммобилизации с целью усиления сигнала и повышения его стабильности [27], так как трудности регистрации оптического сигнала связаны с его низкой интенсивностью.

Разработан и оптимизирован портативный цельноклеточный биосенсор, состоящий из оптоэлектронного приёмника и сменных гранул, представляющих собой иммобилизованные биолюминесцентные бактерии в матрице альгината кальция [35]. Устройство было протестировано на воздействие различных химических веществ: органических растворителей, ТМ и эндокринных нарушающих соединений. Отмечена высокая чувствительность к цинку и мышьяку. Затем датчик был подвергнут воздействию трёх различных источников воды в окружающей среде (озера Галилеи, Амазонки и реки Лачиш), и он подтвердил свою способность обнаруживать присутствие токсикантов в воде. Простота в использовании прибора, быстрый отклик и высокая чувствительность делают этот прибор перспективным в экомониторинге.

Создан портативный биосенсор для мониторинга токсичности воды, состоящий из иммобилизованных генномодифицированного штамма *E. coli* TV1061, в кальций-альгинатной грануле и фотодетектор CMOS (complementary metal-oxide-semiconductors) [36]. После этапов оптимизации (например, определение влияния концентрации альгината, вязкости и плотности бактерий на реакции датчиков), как CMOS, так и устройства на основе люминометра подвергались воздействию модельных растворов генотоксикантов: гидроксида аммония, формаль-

дегида, солей ртути. Была показана сходная чувствительность к соединениям ртути (до 2,5 мг/л). А по отношению к гидроксиду аммония и формальдегиду CMOS сенсор показал более высокую чувствительность ($1 \cdot 10^{-10}$ и $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л соответственно), чем при измерении с помощью коммерческого люминометра. К недостаткам данного устройства следует отнести длительный и трудоёмкий процесс измерений.

Получены новые знания касательно применимости в аналитических целях иммобилизованных на неорганических носителях (высокодисперсный кремнезём, оксид алюминия, фосфат кальция) фотобактерий Чёрного и Азовского морей, в частности, для количественного определения солей ТМ [37, 38]. Установлено, что полученные формы иммобилизованных светящихся бактерий могут храниться в три раза дольше, чем бактериальная суспензия в жидкой среде, сохраняя при этом высокий уровень биолюминесценции, в пределах 80% от первоначальных значений. Отмечено сходство результатов анализов на основе свободных и связанных бактерий *P. leiognathi* Sh1.

В работе [39] представлена новая модель проточного клеточного биосенсора, сконструированного на основе биолюминесцентного анализа с участием бактерий *A. fischeri*, проводимого в проточной жидкой системе. Использован трубчатый люминесцентный детектор, с модифицированным приёмником с «крышкой» для клеточной бактериальной массы, конструкция которого позволяет в светоизоляционном режиме соединить клеточный поток, поступающий для анализа, с отработанной биомассой посредством инкубационного капилляра. Воздухоразделительный способ поступления бактериальной суспензии обеспечивал отдельное введение различных образцов для анализа. Хотя результаты эксперимента с производными фенола показали двукратное снижение скорости ингибирования свечения в сравнении с данными DINENISO 11348-2 микропланшетного анализа, следует отметить возможность обеспечения высокой скорости детекции данного биосенсора.

Сконструирован проточный биосенсор для контроля качества воды на основе матрицы из пористого Al₂O₃ (ПАО) с иммобилизованными в нём рекомбинантными бактериями [40]. В основе проточной ячейки лежит одноразовый электронный чип из пористого оксида алюминия, который удерживает сенсорные микроорганизмы на своей жёсткой плоской

поверхности. Высокая пористость носителя позволяет обеспечить беспрепятственный доступ к бактериям как необходимых питательных веществ, так и анализируемых токсикантов. Показано, что сенсорные характеристики иммобилизованных бактерий сохранялись в таком биосенсоре в течение 12 недель.

Наряду с твёрдофазными методами иммобилизации бактерий в биочипах на твёрдых подложках, в которых микроконтактное формирование ячеек возможно на плоскости, ведутся работы по разработке и внедрению микрожидкостных (microfluidic) систем, которые не имеют ограничений в отношении количества иммобилизованных клеток. В работе [41] представлен микрожидкостной биочип на основе водорастворимого светочувствительного полимера поливинилового спирта – стирилпиридиума, способного образовать трёхмерную матрицу под действием УФ-излучения. Данное устройство сконструировано с использованием Bio-MEMS (bio micro-electromechanical system) технологий, в котором биодатчиком служили рекомбинантные штаммы бактерий *E. coli*, используемые в качестве индикаторов токсичности.

Использование биосенсора в течение длительного времени приводит к увеличению биомассы иммобилизованных бактерий и, следовательно, влияет на функционирование биосенсора. В работе [42] было смоделировано функционирование биосенсора для пролонгированного обнаружения кадмия и изучена динамика биолюминесцентной реакции генномодифицированных бактерий (*E. coli* DH1, содержащих luxCDABE гены) – биорепортёров внутри агарозной матрицы. Было проведено математическое моделирование профиля биомассы путём соединения уравнения диффузии и потребления питательных веществ бактериями. Теоретические расчёты были подтверждены экспериментально, где было доказано, что рост бактерий, обусловленный как диффузией, так и потреблением питательных веществ, коррелирует с экспериментальными данными. Таким образом, наблюдается высокая бактериальная плотность в первом миллиметре матрицы. Математические расчёты прироста биомассы необходимы для понимания стабильности свечения бактерий внутри геля и показывают, что для поддержания значительного уровня биолюминесценции требуется концентрация кислорода, превышающая или равная 22%. Непрерывное поступление питательных веществ в процессе обнаружения кадмия приводит к образованию

биоплёнки, которая уменьшает диффузию питательных веществ и ограничивает поступление кислорода из первого слоя агарозы (1 мм) и влияет на интенсивность биолюминесцентной реакции. Предложенная численная модель роста и биолюминесценции может быть экстраполирована на другие металлические индукторы, биолюминесцентные бактерии и матрицы иммобилизации.

Биосенсоры на основе люминесцирующих бактерий становятся чрезвычайно важными биоаналитическими приборами в различных областях экологии, медицины и фармации и являются потенциальными кандидатами для мониторинга состояния окружающей среды в режиме on-line [43–46].

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

Заключение

Анализ литературных данных позволяет заключить, что биотесты на основе бактериальной люминесценции имеют ряд преимуществ по параметрам экономичности, скорости, простоте процедуры анализа и диапазону анализируемых веществ. Эти преимущества стимулируют дальнейшие разработки и совершенствования биосенсорных устройств. Ведётся поиск оптимального носителя, подбираются условия иммобилизации бактерий с целью увеличения интенсивности и стабильности люминесценции; проводятся работы по повышению чувствительности и селективности тест-культур. Экспериментируют в направлении дизайна светочувствительных элементов, миниатюризации метода тестирования. Данные факты свидетельствуют о перспективности работ по созданию биосенсоров на основе бактериальной биолюминесценции для биомониторинга широкого спектра веществ.

Работа выполнена при поддержке Программы развития Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» на 2015–2024 годы в рамках реализации проекта И/2018/16 «Лаборатория биолюминолюминесцентных аналитических технологий (Л-БАТ)» и гранта № ВГ19/2018.

References

1. Boehler S., Strecker R., Heinrich P., Prochazka E., Northcott G.L., Ataria J.M. Assessment of urban stream sediment pollutants entering estuaries using chemical analysis and multiple bioassays to characterise biological activities // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 593. P. 498–507. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.209
2. De Castro-Català N., Kuzmanovic M., Roig N., Sierra J., Ginebreda A., Barceló D. Ecotoxicity of sediments in rivers: invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 540. P. 297–306. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.071
3. Deryabin D.G. Bacterial bioluminescence: fundamental and applied aspects. Moskva: Nauka, 2009. 248 p. (in Russian).
4. Wan N.A., Wan J., Ling S.W. Exploring the potential of whole cell biosensor: a review in environmental applications // *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS)*. 2014. V. 2. P. 52–56. [Internet resource] <http://www.isaet.org/images/extraimages/K314057.pdf> (Accessed: 20.04.20).
5. Hassan S.H.A., Van Ginkel S.W., Hussein M.A.M., Abskharon R., Sang-Eun O. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors // *Environment International*. 2016. V. 201. No. 2. P. 106–118. doi: 10.1016/j.envint.2016.03.003
6. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. The management and exploitation of naturally light-emitting bacteria as a flexible analytical tool: A tutorial // *Analytica Chimica Acta*. 2016. V. 934. P. 22–35. doi: 10.1016/j.aca.2016.05.038
7. Sharifian S., Homaei A., Hemmati R., Khajeh Kh. Light emission miracle in the sea and preminent applications of bioluminescence in recent new biotechnology // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017. V. 172. P. 115–128. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.05.021
8. Girotti S., Ferri E.N., Fumo M.G., Maiolini E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria // *Ibid.* 2008. V. 608. P. 2–29. doi: 10.1016/j.aca.2007.12.008
9. Tsybulskii I.E., Sazykina M.A. New biosensors for assessment of environmental toxicity based on marine luminescent bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010. V. 46. No. 5. P. 505–510. doi: 10.1134/S0003683810050078
10. Ron E.Z. Biosensing environmental pollution // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. No. 3. P. 252–256. doi: 10.1016/j.copbio.2007.05.005
11. Ismailov A D., Aleskerova L.E. Photobiosensors containing luminescent bacteria review // *Biochemistry (Moscow)*. 2015. V. 80. No. 6. P. 733–744. doi: 10.1134/S0006297915060085
12. Eltzov E., Marks R.S. Whole-cell aquatic biosensors // *Anal Bioanal Chem.* 2011. V. 400. No. 4. P. 895–913. doi: 10.1007/s00216-010-4084-y
13. Woutersen M., Van der Gaag B., Boakye A.A., Marks R.S., Wagenvoort A.J., Ketelaars H.A.M., Brouwer B., Heringa M.B. Development and validation of an on-line water toxicity sensor with immobilized luminescent bacteria for on-line surface water monitoring // *Sensors*. 2017. V. 17. No. 11. P. 2682. doi: 10.3390/s17112682
14. Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S. Toxicity assessment of organic pollutants: reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri* // *Toxicol. in vitro*. 2008. V. 22. No. 7. P. 1806–1813. doi: 10.1016/j.tiv.2008.07.011
15. Ma X.Y., Wang X.C., Ngo H.H., Guo W., Wu M.N., Wang N. Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. Review // *Science of the Total Environment*. 2014. V. 468–469. P. 1–11. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.028
16. Kahlke T., Umbers K.D.L. Bioluminescence // *Current Biology*. 2016. V. 26. No. 8. P. 313–314. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.007
17. Abbas M., Adil M., Ehtisham-Ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G.A., Tahir M. A., Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review // *Science of the Total Environment*. 2018. V. 626. P. 1295–1309. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.066
18. Mangwani N., Dash H.R., Chauhan A., Das S. Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2012. No. 22. P. 215–227. doi: 10.1159/000341847
19. Deryabin D.G., Aleshina E.S. Effect of salts on luminescence of natural and recombinant luminescent bacterial biosensors // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. V. 44. No. 3. P. 324–329. doi: 10.1134/S0003683808030113
20. Deryabin D.G., Aleshina E.S. Natural and recombinant luminescent microorganisms in biotoxicity testing of mineral waters // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. V. 44. No. 4. P. 378–381. doi: 10.1134/S0003683808040078
21. Kokkali V., Delft W. Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014. V. 61. P. 133–155. doi: 10.1016/j.trac.2014.08.001
22. Danilov V.S., Zarubina A.P., Iroshnikov G.E. Sensor bioluminescent system based on lux-operons of different types of luminescent bacteria // *Vestnik MGU seriya Biologiya*. 2002. No. 3. P. 20–24 (in Russian).
23. Mohseni M., Abbaszadeh J., Maghool Sh., Chaichi M. Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018. V. 149. P. 555–560. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.002
24. Mitchell R.J., Gu M.B. Characterization and optimization of two methods in the immobilization of 12 bioluminescent strains // *Biosens. Bioelectr.* 2006. V. 22. P. 192–199. doi: 10.1016/j.bios.2005.12.019

25. Esimbekova E.N., Kratasyuk V.A., Torgashina I.G. Disk-shaped immobilized multicomponent reagent for bioluminescent analyses: Correlation between activity and composition // *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. V. 40. P. 343–346. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.05.003
26. Efremenko E.N., Senko O.V., Aleskerova L.E., Alenina K.A., Mazhul M.M., Ismailov A.D. Biosensors based on the luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* immobilized in polyvinyl alcohol cryogel for the monitoring of ecotoxicants // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014. V. 50. No. 5. P. 477–482. doi: 10.1134/S0003683814050032
27. Aleskerova L.E., Alenina K.A., Efremenko E.N., Ismailov A.D. The factor stabilizing the bioluminescence of PVA-immobilized photobacteria // *Microbiology*. 2017. V. 86. No. 2. P. 218–224. doi: 10.1134/S0026261717020047
28. Michelini E., Roda A. Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 1785–1789. doi: 10.1007/s00216-011-5364-x
29. Ivask A. Fiber-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain // *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. V. 22. P. 1396–1402. doi: 10.1016/j.bios.2006.06.019
30. Ben-Yoav H., Elad T., Shlomovits O., Belkin S., Shacham-Diamand Y. Optical modeling of bioluminescence in whole cell biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. 2009. V. 24. No. 7. P. 1969–1973. doi: 10.1016/j.bios.2008.10.035
31. Sakaguchi T., Morioka Y., Yamasaki M., Iwanaga J., Beppu K., Maeda H., Morita Y., Tamiya E. Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells-immobilized chip // *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. V. 22. No. 7. P. 1345–1350. doi: 10.1016/j.bios.2006.06.008
32. Hirmann D., Loibner A.P., Braun R., Szolar O.H. Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils // *Chemosphere*. 2007. V. 67. P. 1236–1242. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.10.047
33. Futra D., Heng L.Y., Surif S., Ahmad A., Ling T.L. Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters // *Sensors*. 2014. V. 14. No. 12. P. 23248–23268. doi: 10.3390/s141223248
34. Jouanneau S., Durand-Thouand M.J., Thouand G. Design of a toxicity biosensor based on *Aliivibrio fischeri* entrapped in a disposable card // *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016. V. 23. No. 5. P. 4340–4345. doi: 10.1007/s11356-015-4942-4
35. Eltzov E., Yehuda A., Marks R.S. Creation of a new portable biosensor for water toxicity determination // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015. V. 221. P. 1044–1054. doi: 10.1016/j.snb.2015.06.153
36. Axelroda T., Eltzov E., Marks R.S. Bioluminescent bioreporter pad biosensor for monitoring water toxicity // *Talanta*. 2016. V. 149. P. 290–297. doi: 10.1016/j.talanta.2015.11.067
37. Morozkina E.V., Shemshedinova E.Sh., Abduramanova E.R., Katsev A.M. High dispersed silica applicability as a carrier of the biosensor sensitive element // *Uchenyye zapiski Krymskogo federalnogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo, seriya “Biologiya, khimiya”*. 2018. V. 4. No. 3. P. 208–218. [Internet resource] <http://sn-biolchem.cfuv.ru/wp-content/uploads/2018/10/020morozkina.pdf> (Accessed: 15.04.20) (in Russian).
38. Abduramanova E.R., Naumova N.V., Derzyan L.M., Katsev A.M. Functional characteristics of free and immobilized photobacterial of Black and Azov seas // *Uchenyye zapiski Krymskogo federalnogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo, seriya “Biologiya, khimiya”*. 2018. V. 4. No. 1. P. 179–187. [Internet resource] <http://sn-biolchem.cfuv.ru/wp-content/uploads/2018/04/019abduramanova.pdf> (Accessed: 15.04.20) (in Russian).
39. Stolper P., Fabel S., Weller M.G., Knopp D., Niessner R. Whole-cell luminescence-based flow-through biodetector for toxicity testing // *Anal Bioanal Chem.* 2008. V. 390. P. 1181–1187. doi: 10.1007/s00216-007-1770-5
40. Yagur-Krolla Sh., Schreuderb E., Inghamc C.J., Heidemanb R., Rosena R., Belkina Sh. A miniature porous aluminum oxide-based flow-cell for online water quality monitoring using bacterial sensor cells // *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. V. 64. P. 625–632. doi: 10.1016/j.bios.2014.09.076
41. Yoo S.K., Lee J.H., Yun S.-S. Fabrication of a bio-MEMS based cell-chip for toxicity monitoring // *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. V. 22. P. 1586–1592. doi: 10.1016/j.bios.2006.07.014
42. Affi M., Sollicc C., Legentilhomme P., Comiti J., Legrand J., Jouanneau S., Thouand G. Numerical modeling of the dynamic response of a bioluminescent bacterial biosensor // *Anal Bioanal Chem.* 2016. V. 408. No. 30. P. 8761–8770. doi: 10.1007/s00216-016-9490-3
43. Erzinger G.S., Schmoeller F., Pinto L.H., Américo L., Hemmersbach R., Hauslage J., Häder D-P. 12-Bioluminescence systems in environmental biosensors // *Bioassays Advanced Methods and Applications*. 2018. P. 241–262. doi: 10.1016/B978-0-12-811861-0.00012-7
44. Polakovič M., Švitel J., Bučko M., Filip J., Neděla V., Ansorge-Schumacher M.B., Gemeine P. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications // *Biotechnology Letters*. 2017. V. 39. No. 5. P. 667–683. doi: 10.1007/s10529-017-2300-y
45. Jouanneau S., Durand M.J., Thouand G. Online detection of metals in environmental samples: Comparing two concepts of bioluminescent bacterial biosensors // *Environ. Sci. Technol.* 2012. V. 46. P. 11979–11987. doi: 10.1021/es3024918
46. Leitgib L., Kalman J., Gruiz K. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites // *Chemosphere*. 2007. V. 66. P. 428–434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.06.024