

*На правах рукописи*



**АЛЕСКЕРОВА ЛЕЙЛА ЭЛЬШАДОВНА**

**Люминесцентные биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле  
поливинилового спирта фотобактерий**

03.02.03-микробиология  
03.01.06-биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва**

**2014**

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

**ИСМАИЛОВ АНАВАР ДЖУРАЕВИЧ**

доктор биологических наук Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», кафедры микробиологии биологического факультета, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

**ДЕРЯБИН ДМИТРИЙ ГЕННАДИЕВИЧ**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет».

**ЦЫГАНКОВ АНАТОЛИЙ АНАТОЛЬЕВИЧ**

доктор биологических наук, заведующий лабораторией биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Учреждения Российской академии наук Института фундаментальных проблем РАН.

Ведущая организация

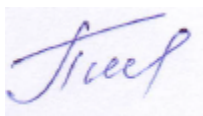
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Защита состоится 09.12.2014г в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел.8(495)939054-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета .



Пискункова Нина Федоровна.

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Современное экологическое состояние окружающей среды требует применения быстродействующих и чувствительных методов биомониторинга экотоксикантов. Светящиеся бактерии широко используются в качестве тест-объектов в биомониторинге загрязнений воды, почвы, атмосферы, пищевых продуктов и других жизненно важных компонентов окружающей среды. Основным тест-объектом в течение длительного времени являлись лиофилизированные клетки фотобактерий, которые непосредственно перед аналитическим процессом подвергались процедурам регидратации и стабилизации эмиссионной активности. В последние годы значительная часть исследований направлена на получение иммобилизованных препаратов фотобактерий для тех же целей экологического биомониторинга. Иммобилизованные препараты рассматриваются как биосенсоры на тяжелые металлы, различные ксенобиотики органической природы (фенолы и хлорфенолы, ароматические и алифатические углеводороды, фармакологические препараты и продукты их синтеза, пестициды, инсектициды и другие вещества, загрязняющие окружающую среду). Особое внимание уделяется применению биосенсоров в контроле за очистными сооружениями и наиболее опасными участками технологических производств. В качестве носителей для иммобилизации клеток фотобактерий использованы различные природные и синтетические полимеры. Подавляющее большинство работ по иммобилизации фотобактерий выполнена с использованием  $\text{Ca}^{2+}$ - или  $\text{Sr}^{2+}$ -альгинатных гелей, а также агаровых и агарозных носителей. Основным недостатком применения данных полимеризующихся веществ для иммобилизации фотобактерий со специфической чувствительностью свечения к физико-химическим условиям среды, является температурный режим гелеобразования ( $30^{\circ}\text{--}50^{\circ}\text{C}$ ), который отрицательно сказывается на удельной биолюминесцентной активности клеток (прежде всего на психрофильные штаммы фотобактерий), в частности вызывает образование тусклых и темновых мутантов. Кроме того, препараты в большинстве случаев отличаются нестабильной кинетикой эмиссии света. Синтетические полимерные носители (полиуретаны, полиспирты, полиэфиры) для иммобилизации светящихся бактерий используются крайне редко. Поливиниловый спирт как носитель использован для иммобилизации *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio fischeri* и lux-маркированных генно-инженерных штаммов *Pseudomonas putida*. Литературные данные указывали на то, что полученные фотобиосенсоры характеризовались невысокой удельной биолюминесцентной активностью с нестабильной кинетикой свечения иммобилизованных клеток. Основной причиной этих явлений, с нашей точки зрения, являлась технология иммобилизации бактерий. В указанной работе полимерный носитель (ПВС) использовался как простая синтетическая матрица без введения в нее субстратов и протекторов, - процесс криогенного

формирования гелей осуществлялся в простом солевом растворе (3% NaCl). Необходимо отметить, что ПВС эффективно использован для иммобилизации широкого круга других нелюминесцирующих микроорганизмов, используемых в различных биотехнологических процессах (получение биологически активных веществ, водорода, спирта, биотрансформации ксенобиотиков и др.). Таким образом, использование синтетических носителей, в частности ПВС, для иммобилизации фотобактерий перспективно как с технологической (получения биосенсоров), научной (изучение факторов, контролирующих эмиссионную активность иммобилизованных клеток), так и с практической (не только для точечного, но и непрерывного биомониторинга экотоксикантов) стороны.

**Цель данной работы:** получение токсикологических биосенсоров, на основе иммобилизованных в криогеле ПВС клеток фотобактерий.

**Задачи исследования:**

1. Отбор штаммов для использования в качестве тест-объекта в иммобилизованных препаратах криогеля ПВС.
2. Разработка технологических операций и оптимизация условий криогенной иммобилизации фотобактерий, хранения и реактивации препаратов.
3. Определение выживаемости фотобактерий при иммобилизации с использованием метода биолюминесцентной АТФ-метрии.
4. Анализ основных физико-химических условий, контролирующих эмиссионную активность и стабильность иммобилизованных клеток.
5. Электронная микроскопия препаратов с иммобилизованными клетками фотобактерий.
6. Анализ пула АТФ свободных и иммобилизованных клеток психрофильных штаммов светящихся фотобактерий.
7. Разработка технологических операций дискретного и непрерывного биомониторинга токсинов с использованием разработанных препаратов биосенсоров.

**Научная новизна работы.** В технологии иммобилизации нами в качестве гельформирующего раствора использован не простой солевой раствор (как в других работах), а богатая сбалансированная среда культивирования, имеющая в своем составе как метаболические и энергетические субстраты, так и протекторы. Наряду с этим особое внимание было уделено выбору объекта иммобилизации. Как известно, природные штаммы фотобактерий различаются между собой как интенсивностью люминесцентной активности, так и длительностью люминесцентного цикла. Наиболее длительным и интенсивным свечением отличаются *Photobacterium phosphoreum*. Нами выделен и детально

изучен психрофильный штамм фотобактерий из кишечника рыб в акватории Белого моря. Высокая удельная активность (до  $10^5$  квант/с·кл) и стабильность эмиссии в глубинной культуре (свыше 100 часов) и интактных клетках являлись критериями для использования данного штамма в качестве основного объекта получения иммобилизованных в ПВС биосенсоров.

Разработанная нами технология иммобилизации носила специфическую для светящихся бактерий процедуру, включающую в себя этапы ступенчатого замораживания до  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ , а также мягкую процедуру размораживания и инкубации иммобилизованных препаратов до  $+4^{\circ}\text{C}$ . Особое внимание уделено физико-химическим параметрам, в первую очередь температуре и рН, условиям хранения и применения препаратов биосенсоров в процедурах биомониторинга токсинов. Наряду с технологическими операциями по иммобилизации и реактивации бактерий, поставлена задача по изучению основных процессов и элементов, контролирующих эмиссионную активность и стабильность свечения препаратов. В качестве приоритетных рассмотрены: энергообеспечение клеток (пул АТФ), метаболическая активность, вызывающая сдвиг рН, а также воздействие температуры и состава среды на кинетику эмиссии света препаратов.

Исследованы условия хранения иммобилизованных клеток при разных температурах ( $-80^{\circ}$ ,  $-20^{\circ}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$ ) и изучено влияние состава инкубационных смесей на кинетику свечения реактивированных препаратов при положительных температурах.

**Практическая значимость работы.** Разработаны и оптимизированы процедуры дискретного и непрерывного биомониторинга различных классов экотоксикантов (тяжелых металлов, хлорфенолов и других ксенобиотиков), а также проведен анализ кинетики ингибирования свечения иммобилизованных клеток в сравнительном аспекте со свободными. Установлено, что кинетика ингибирования свечения иммобилизованных препаратов в точечном режиме практически не отличается от кинетики затухания свечения свободных клеток, что обусловлено наличием макропор в препаратах, которые снимают диффузионные ограничения для токсинов. Величины пороговой чувствительности к токсинам на иммобилизованных биосенсорах ( $EC_{50}$ ) близки к значениям, полученным при применении в качестве тест-объекта свободных клеток того же штамма. В отличие от дискретного анализа непрерывный биомониторинг отличается сложной обратимой кинетикой тушения свечения, отражающей два конкурирующих процесса: ингибирование клеточного метаболизма и вымывание токсина потоком среды. Несмотря на сложность кинетики обратимого ингибирования свечения, непрерывный режим биомониторинга перспективен для многократного использования одного препарата в режиме реального времени.

Получен новый тип биосенсоров, способный экспрессно реагировать на наличие широкого спектра токсичных объектов. Результаты настоящей работы

могут быть использованы в практических задачах охраны окружающей среды, сельского хозяйства, медицины, ветеринарии и фармакологии.

### **Основные проблемы, выносимые на защиту**

1. Изучены физиолого-биохимические характеристики психрофильного штамма фотобактерий, использованного для получения люминесцентных биосенсоров.
2. Разработаны научные основы и технологические операции иммобилизации фотобактерий в криогеле ПВС.
3. Выявлены основные факторы стабилизации свечения фотобактерий в иммобилизованном виде.
4. Установлено, что затухание свечения иммобилизованных фотобактерий не является следствием спада пула АТФ в клетке.
5. Разработаны и оптимизированы технологические операции применения полученных биосенсоров в различных режимах биомониторинга токсинов.

**Апробация материалов диссертации.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, Россия, 2012), на Международном конгрессе по инженерии и технологиям (Пекин, Китай, 2012), на V Конгрессе Европейских Микробиологов (Лейпциг, Германия, 2013), на конференции, посвященной 75-летию ББС МГУ имени Н.А.Перцова (Москва, Россия, 2013), на Международной конференции «Физиология и биотехнология оксигенных фотоавтотрофных микроорганизмов» (Москва, Россия, 2014), на VII Съезде Российского фотобиологического общества (пос. Шепси Краснодарского края, Россия, 2014)

Диссертация апробирована на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и 9 тезисов докладов на отечественных и международных конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 189 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Список литературы включает 144 источника. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 49 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Бактериальный штамм**

В работе использованы штаммы светящихся бактерий: *Vibrio harveyi* (шт. 292 ATCC, MAV), *Vibrio fischeri* (шт. №6 КМ МГУ) и два штамма *Photobacterium phosphoreum* - умеренно психрофильный (шт. 11040 ATCC) и

психрофильный штамм (331 КМ МГУ), выделенный из кишечника донной рыбы — керчака европейского *Myoxocephalus scorpius* в прибрежной зоне Кандалакшского залива Белого моря. Штаммы *Vibrio harveyi* (шт. 292 АТС) и *Photobacterium phosphoreum* (шт. 11040 АТСС) получены от профессора Дж.Гастингса (Гарвардский университет).

#### **Условия выращивания. Получение биомассы**

Бактерии выращивали на стандартной богатой среде с пепетоном, дрожжевым экстрактом, глицерином при рН 7,6 при 17-20°C (штаммы *P. phosphoreum*) и 25°C (*Vibrio harveyi*).

500 мл клеток из поздней логарифмической фазы роста, осаждали центрифугированием, двукратно отмывали Na – фосфатным буфером с 2% NaCl, рН 7,6. Осадок сырой биомассы использовали в процедуре иммобилизации.

#### **Технология иммобилизации фотобактерий в криогеле ПВС**

Для получения иммобилизованных препаратов использовали клетки из поздней логарифмической фазы роста (8ч. и 22ч., для *Vibrio harveyi* и *P. phosphoreum*, соответственно) с плотностью биомассы  $2-5 \times 10^9$  кл/мл.

Биомассу клеток получали согласно методике, описанной в разделе «Получение биомассы». Раствор ПВС (молекулярной массы 48000 Да) готовили на основе СК, полусинтетической среде (СК без пептона) и 3%-ного NaCl. Клетки суспендировали в 10 или в 14%-ном растворе ПВС до получения однородной массы. Концентрация клеток в общей массе полученной смеси составляла 1%. Смесь разливали по 200 мкл в ячейки 96-луночного планшета, замораживали при  $-20^\circ\text{C}$ , инкубировали в течение 17 ч для образования криогеля, содержащего клетки в формирующейся полимерной матрице. Сформированный при  $-20^\circ\text{C}$  криогель хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Состав полученного препарата (мас.%): биомасса бактерий — 0,62; поливиниловый спирт — 6,8; водная фаза — до 100. Все операции проводились при температурах, не превышающих  $15^\circ\text{C}$ . Размораживание планшетов с гранулами проводили при  $4^\circ\text{C}$  в течение 17 ч. Гранулы хранили при  $4^\circ\text{C}$  в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 7,6, содержащем 2% NaCl.

#### **Определение эмиссионной активности**

Биолюминесценцию регистрировали на люминометре 1250 LKB—Wallac и выражали: для рутинных экспериментов в относительных единицах (ОЕ), для специальных экспериментов в абсолютных значениях выхода фотонов (Q, квант/сек) с использованием стандарта Гастингса, Вебера. Для анализа биолюминесцентной активности культуры клеток или суспензии, клетки разводили в  $10^3 - 10^5$  раз в 3% NaCl, и определяли максимальный уровень свечения за 10 сек в 1 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера с 2% NaCl, рН 7,6 при комнатной температуре. Активность иммобилизованных препаратов определяли по максимуму свечения одной гранулы в 1 мл того же буфера после 1 - 2 мин. выравнивания температуры ( $22^\circ\text{C}$ ) гранул и раствора.

Температурные зависимости снимали на люминометре с термостатируемым кюветным отделением. Измерение температуры проводили термодатчиком непосредственно в пробе с бактериями или в объеме гранул с иммобилизованными клетками.

### **Определение биомассы**

Концентрацию клеток в растущей культуре или суспензии определяли спектрофотометрически из величины оптической плотности ( $A_{660\text{nm}}$ ). Количественный анализ содержания иммобилизованных клеток в гранулах, осуществляли по содержанию АТФ биолюминесцентным методом с использованием люциферазы светляков.

### **Определение АТФ**

Разрушение клеток и экстракцию АТФ проводили путем обработки клеточной суспензии или препаратов, иммобилизованных в ПВС клеток ДМСО: 100 мкл суспензии бактерий или 1 гранулу иммобилизованных в криогеле клеток смешивали с 1 мл ДМСО, и через 10 мин проводили биолюминесцентный анализ содержания АТФ в пробах. Система измерения: 1 мл 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 7,6) + 20 мкл пробы + 50 мкл люминесцентного реагента с люциферазой светляков. Мерой количественной оценки АТФ служила максимальная интенсивность эмиссии при использовании калибровочного графика: «интенсивность эмиссии ( $I - I_{\text{фон}}$ ) / [АТФ]».

### **Электронная микроскопия**

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы фиксировали 2%-м раствором глутарового альдегида на 0,1М какодилатном буфере рН 7,2 в течение 1,5 часов, обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации, из 100%-го этанола переносили в 100%-й ацетон, затем высушивали при критической точке на установке “Dryer HCP-2” (Hitachi, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке “IB-3 Ion Coater” (Eiko, Япония) и исследовали с помощью микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония).

### **Анализ токсинов**

Основная среда инкубации как для свободных, так и для иммобилизованных клеток при анализе токсикантов — 3% NaCl. В дискретном режиме анализа 10 мкл токсиканта различных концентраций в воде, этаноле или диметилсульфоксиде (ДМСО) вносили в 1 мл среды инкубации, содержащей свободные клетки или гранулы с иммобилизованными клетками. В контроль вносили соответствующий объем растворителя. Все эксперименты проводили в трех повторах. при температуре 22°C.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Excel. Каждое значение в графическом построении является средним из трех измерений.



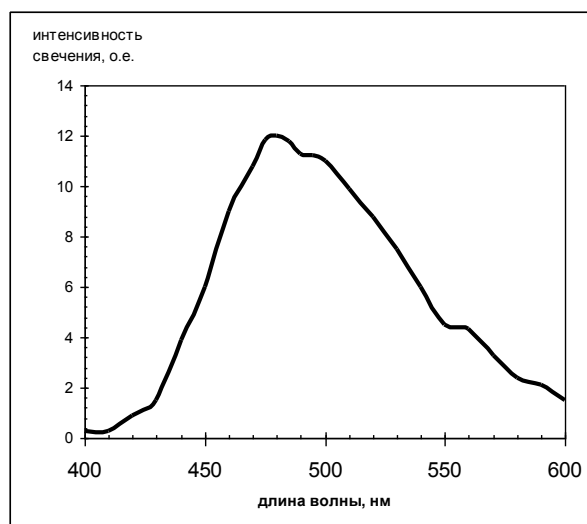
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

### Физиологические и биолюминесцентные характеристики психрофильных бактерий *Photobacterium phosphoreum* Белого моря

Из внутренних органов рыб Белого моря выделены бактерии, идентифицированные как *Photobacterium phosphoreum*, которые послужили основным объектом для создания и применения биосенсоров.

Исходя из имеющихся данных, по контролю ростовых и эмиссионных параметров у разных видов фотобактерий, температурным фактором среды обитания, можно было ожидать проявления штаммов с высокоэффективной и длительной генерацией света именно в акваториях с низкой среднегодовой температурой. Представленная работа впервые характеризует специфические адаптационные, физиологические и энергетические свойства светящихся бактерий Белого моря.

Проведен детальный анализ кинетики роста, свечения, изменения pH среды и пула АТФ при глубинном культивировании, а также спектральные параметры свечения, температурная, pH и солевая зависимость свечения беломорского штамма *Photobacterium phosphoreum*, (КМ МГУ № 331), - энтеробактерий *Mioхоcephalus scorpius*. Спектр биолюминесценции клеток выделенного штамма, снятый при 15°C, характеризуется относительно широким максимумом при 476-480 нм и плечами (сглаженные пики) при ~510 нм. и ~540 нм (рис. 1).

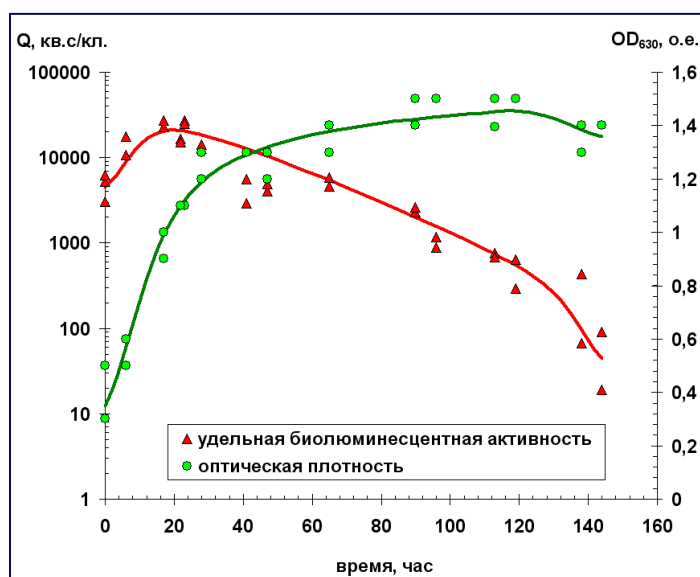


**Рисунок 1.** Спектр биолюминесценции *Photobacterium phosphoreum* (КМ МГУ № 331) при 15°C.

Наблюдаемая спектральная картина логично соответствует доминирующему функционированию у бактерий в относительно низких температурных условиях люциферазного (lux) и люмазинового (LP) излучателей света. Плечо при 540 нм свидетельствует о наличии у данного

штамма YFP - белкового эмиттера, обычно характерного только для бактерий *Vibrio fischeri* Y-1, При этом эффективность генерации фотонов люмазиновым (475нм) и флавин-люциферазным (495нм) излучателями у данного вида бактерий соизмерима, что определяет перекрывающуюся спектральную картину в области максимума, вклад YFP (530нм) в общую светосумму незначителен.

При культивировании бактерий при 20°C логарифмическая фаза роста 20-24 ч., стационарная фаза свыше 100 часов, незначительные флуктуации плотности популяции наблюдается на 3 сутки культивирования. На рисунке 2 представлены данные по динамике роста и свечения *Photobacterium phosphoreum* (КМ МГУ № 331) в глубинной культуре. Удельная люминесцентная активность в глубинной культуре на порядок выше, чем у штаммов того же вида, выделенных из более теплых регионов, в частности, известного штамма 11040 (АТСС), и достигает в оптимальных условиях  $10^5$  квант/с·кл. Эмиссионная активность практически не изменяется в логарифмической фазе роста бактерий, что свидетельствует об отсутствии аутоиндукции в процессе синтеза люциферазы *de novo*. Установлена повышенная длительность и стабильность свечения при температуре не превышающей 25°C. За 120 часов культивирования эмиссионная активность снижается не более, чем на 1 порядок. При начальных значениях pH = 7,5; - сдвиг pH в кислую область за весь временной период роста незначителен, - с 7,5 до 7,2 ед. pH. Все изменения pH происходят в логарифмической фазе роста.



**Рисунок 2.** Динамика роста и удельной биолуминесцентной активности бактерий *Photobacterium phosphoreum* (331 КМ МГУ) из Белого моря при глубинном культивировании при 20°C.

Характеристики температурной, рН и солевой зависимости являются важными диагностическими, физиологическими и экологическими признаками штамма.

Анализ температурной зависимости свечения интактных клеток отразил специфический для психрофильных штаммов температурный профиль свечения с максимумом при 15-17°C. Потеря свечения после 30-мин инкубации при температурах выше 25°C носит необратимый характер.

При исследовании рН – зависимость свечения интактных клеток в фосфатно-карбонатном буфере установлена выраженная алкалотолерантность люминесценции с широким диапазоном максимальной активности (рН 7,0-8,5). Резкое снижение люминесценции клеток происходит при рН ниже 6,5 и выше 9,0.

Анализ солевой зависимости показал, что свечение интактных клеток возможно при 0,5-4% концентрации NaCl. Максимальный уровень эмиссии в узком диапазоне при 2,5%. Солевой оптимум свечения соответствует пониженной солености Белого моря.

Совокупность полученных результатов свидетельствует об адаптации метаболизма светящихся бактерий к физико-химическим условиям среды обитания.

### **Иммобилизация фотобактерий в криогеле поливинилового спирта**

Нижеследующие результаты отражают технологические подходы и научные основы получения нового типа люминесцентных биосенсоров. Основная работа выполнена по иммобилизации в криогеле ПВС психрофильного штамма *P. phosphoreum* (шт. 331 КМ МГУ), в ряде экспериментов работа проведена на других видах бактерий (*Vibrio harveyi* (шт.292 ATCC, MAV), *Vibrio fischeri* (шт №6 КМ МГУ)).

В основе научных подходов для получения высокоактивных биосенсоров с пролонгированной эмиссией заложены следующие предпосылки:

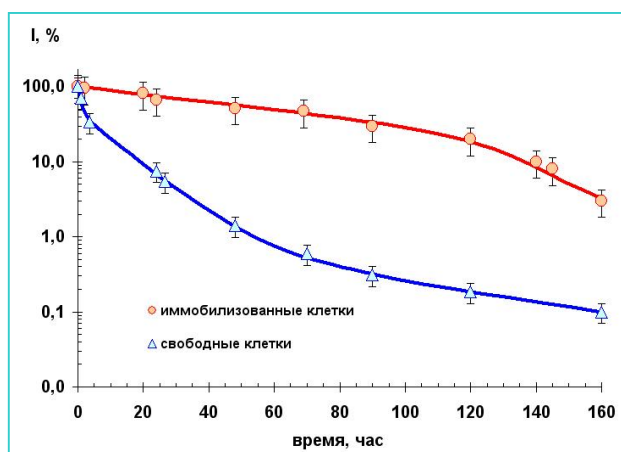
1. Интенсивность и длительность свечения, как растущей культуры, так и покоящихся клеток, в первую очередь определяется специфическими природными свойствами вида и штамма фотобактерий.
2. Люминесцентная реакция комплексно контролируется следующими элементами и процессами:
  - метаболическим потенциалом клетки, обеспечивающим пул восстановленных эквивалентов,
  - эффективностью переноса электронов на люциферазу, зависящую от активности дегидрогеназно-редуктазных ферментных комплексов и уровнем темновых утечек.
  - физико-химическими параметрами: (кислород, рН, температура, солевой состав), наличием активаторов и ингибиторов.

3. Одним из наиболее узких звеньев эмиссионной активности клетки является пул восстановленного флавина.

Разработанные технологические операции принципиально отличаются от обычно используемых процедур, где ПВС используется только как синтетическая матрица. Отличие заключается в том, что формирование геля осуществляется не в простом солевом растворе, а в оптимизированной среде культивирования.

При  $-80^{\circ}\text{C}$  100% уровень биолюминесцентной активности гранул сохранялся в течение двух лет. Остаточная активность гранул, хранившихся при  $-20^{\circ}\text{C}$ , за тот же период сохранялась на уровне 70%.

На рисунке 3 показана кинетика свечения свободных и иммобилизованных бактерий *P. phosphoreum* шт. 331 ККМ МГУ при инкубации в 3% NaCl при  $4^{\circ}\text{C}$ .

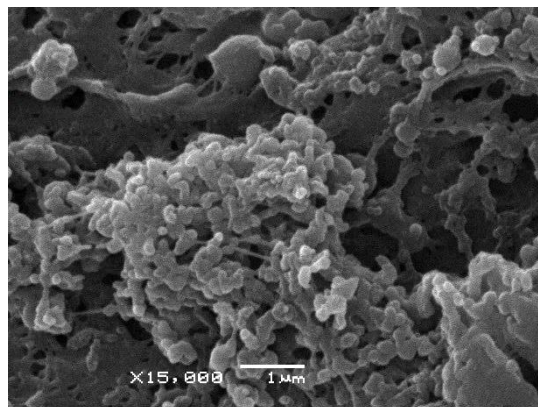
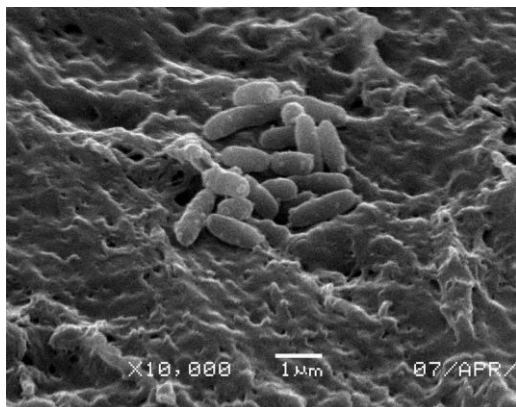


**Рисунок 3.** Динамика свечения свободных и иммобилизованных в 10% ПВС клеток *P. phosphoreum*.

Результаты показывают, что иммобилизованные в ПВС-геле клетки фотобактерий характеризуются не только высоким уровнем начальной эмиссии, но и более пролонгированной люминесцентной активностью по сравнению со свободными.

### **Структурные характеристики криогеля ПВС с иммобилизованными клетками фотобактерий**

С использованием электронной микроскопии оценивали характеристики бинарной системы носитель-клетка в первую очередь-структуру геля после процедуры «замораживания/оттаивания», наличие прочно связанных клеток как на поверхности, так и в объеме носителя. Данные электронной микроскопии представлены на рисунке 4 (А, Б). Фотографии иллюстрируют состояние клеток после «принудительной» иммобилизации в криогеле ПВС с различной плотностью носителя (1, 10% ПВС).



А.

Б.

**Рисунок 4.** Клетки *P. phosphoreum* в порах криогелей ПВС, полученных из растворов исходной концентрации 10% (А) и 1% (Б). Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Увеличение в 10000 раз (А) и 15000 раз (Б). Масштаб отрезка соответствует 1 мкм.

Электронная микроскопия показывает, что основное распределение клеток происходит в порах носителя ПВС, в которых клетки закреплены с поверхностью носителя. К сожалению, оценить природу связей трудно, можно лишь предполагать, что в первую очередь в этом процессе участвуют водородные связи, а также взаимодействие функциональных групп клеточной мембраны с ацильными группами носителя.

С уменьшением концентрации ПВС от 10% до 1% преобладающий размер пор в матрице геля увеличивается от 0,1-0,4 мкм до 1-3 мкм соответственно (рис. 4). Это, в свою очередь, определяет разный характер иммобилизации клеток *P. phosphoreum* в матрице криогеля ПВС. Большие поры образца криогеля с меньшей концентрацией ПВС (1%) активно заселялись мелкими (делящимися) клетками (средний размер 0,3 мкм), выделяющими слизистый биополимерный матрикс (рис. 4 Б). В то время как образец криогеля с большей концентрацией ПВС (10%) оказался менее предпочтительной матрицей для клеток: отмечены одиночные или редкие небольшие скопления более крупных клеток (средний размер 1,5 мкм) (рис. 4 А).

### **Факторы стабилизации биолюминесценции иммобилизованных в криогеле ПВС фотобактерий**

Предпосылка исследований заключалась в том, что определяющими элементами стабильности свечения иммобилизованных препаратов являются специфические природные характеристики люминесцентного цикла бактериального штамма. Наиболее критичными факторами для эмиссионной активности иммобилизованных клеток является среда формирования геля, температурный режим хранения, а также pH среды инкубации.

Установлено, что при оптимальных условиях культивирования для каждого штамма наиболее пролонгированной и интенсивной эмиссией обладает психрофильный штамм 331 КМ МГУ, выделенный из акватории Белого моря. В

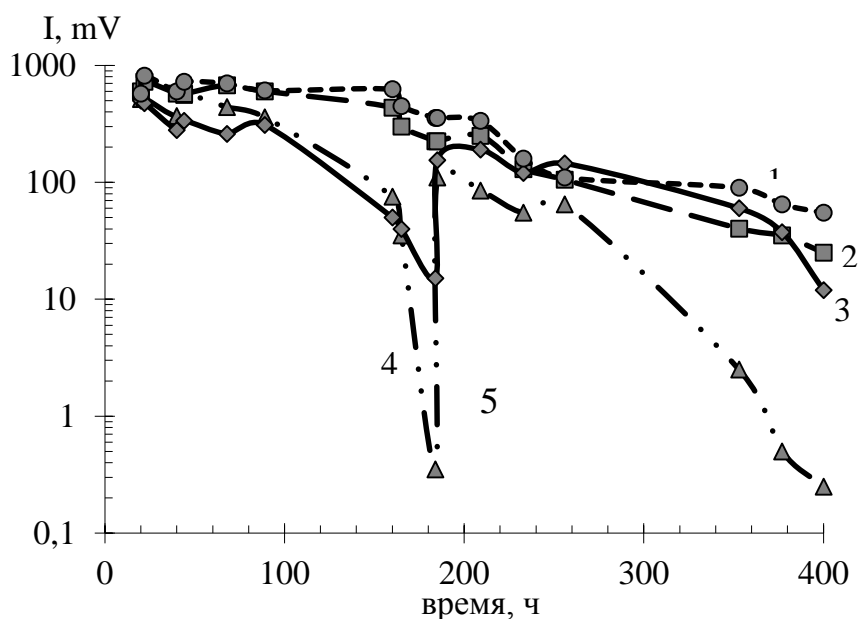
таблице 1 представлены данные по стабильности свечения штаммов при хранении изолированных клеток при разных температурах в среде культивирования.

**Таблица 1.** Интегральный выход фотонов и длительность эмиссии иммобилизованных в криогеле ПВС бактерий *P.phosphoreum* шт. ATCC 11040, *P.phosphoreum* шт. №331 (КМ МГУ), *V.harveyi* шт. MAV, *V.fischeri* шт. №6 (КМ МГУ) в ходе инкубации в 0,1М Na-фосфатном буфере с 2% NaCl, pH7,8 при 4°C.

| Штаммы<br>фотобактерий                       | Иммобилизованные клетки          |                                    | Свободные клетки                 |                                    |
|--|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
|  | Выход<br>фотонов Q,<br>квант/сек | Длительность<br>свечения,<br>сутки | Выход<br>фотонов Q,<br>квант/сек | Длительность<br>свечения,<br>сутки |
| <i>P.phosphoreum</i><br>шт. 11040<br>(ATCC)  | $1-5 \times 10^7$                | 14                                 | $10^6$                           | 3-7                                |
| <i>P.phosphoreum</i><br>шт. №331 (КМ<br>МГУ) | $1-5 \times 10^9$                | 42                                 | $10^8$                           | 14-21                              |
| <i>V.harveyi</i> шт.<br>292 MAV<br>(ATCC)    | $1-5 \times 10^6$                | 3                                  | $10^5$                           | 1-3                                |
| <i>V.fischeri</i> шт.<br>№6 (КМ<br>МГУ)      | $1-5 \times 10^6$                | 5                                  | $10^5$                           | 2-5                                |

Наиболее эффективной средой формирования гелей является среда, используемая для культивирования бактерий. В данной среде после проведения криогенной иммобилизации и размораживания бактерии сохраняли практически 100% уровень люминесцентной активности. Спад свечения гранул за 200 часов инкубации не превышал 1,5 порядка, детектируемый уровень свечения ( $10^{-6}$  от начального) гранул — более месяца. Исключение из среды формирования геля пептона приводит к снижению начальной эмиссионной активности гранул на 1–

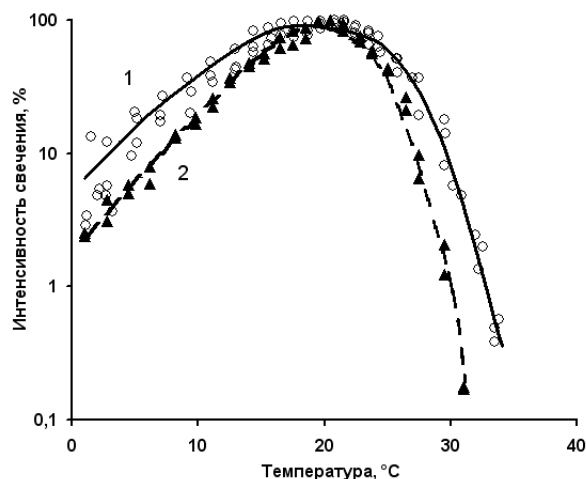
1,5 порядка. Существенный спад уровня свечения (в  $10^3$ – $10^4$  раз) наблюдался при иммобилизации в гелях, сформированных в простом солевом растворе (3% NaCl). Установлено, что одним из наиболее критичных элементов является сдвиг pH среды инкубации гранул, за счет образования фотобактериями кислых продуктов метаболизма (рис. 5). Тот факт, что при переносе затухших в солевой среде фотобактерий в буферную среду с pH 8,5 приводит к полному восстановлению эмиссионной активности, подтверждает данное предположение.



**Рисунок 5.** Кинетика затухания свечения в различных средах инкубации: 1.- фосфатный буфер pH 8,5; 2. - фосфатный буфер pH 7,6; 3. - среда культивирования; 4. - 3% NaCl, 5. – перенос гранул в фосфатный буфер pH 8,5.

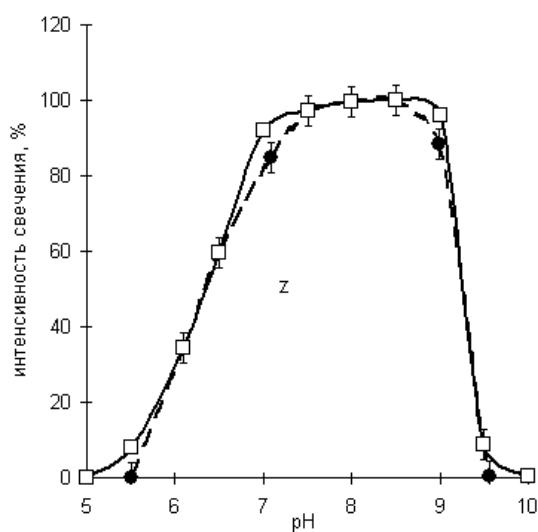
#### **Анализ температурной и pH зависимости свободных и иммобилизованных клеток фотобактерий**

Сравнительный анализ температурной зависимости свободных и иммобилизованных клеток показал различия в температурном профиле свечения. Температурная зависимость биолюминесценции иммобилизованных клеток имеет более широкий диапазон максимальной активности, чем свободных (рис. 6). В низкотемпературном диапазоне (4–17°C) удельная активность иммобилизованных клеток превышает активность свободных клеток. Максимальный уровень свечения сохраняется у иммобилизованных клеток до температуры 25°C, в то время как активность свободных клеток существенно снижается при этой температуре. Наблюдаемое явление указывает на повышенную устойчивость иммобилизованных клеток к температурам, превышающим оптимальные.



**Рисунок 6.** Температурная зависимость свечения иммобилизованных (1) и свободных (2) клеток *P. phosphoreum* КМ МГУ №331.

Проведено исследование влияния pH на свободные и иммобилизованные клетки. На рисунке 7 представлена pH зависимость иммобилизованных и свободных клеток. Профили pH-зависимости отличаются незначительно, однако в обоих случаях выражена алкалотолерантность эмиссионной реакции бактерий.



**Рисунок 7.** pH зависимость свечения свободных (1) и иммобилизованных (2) клеток фотобактерий.

### **АТФ-пул и биолюминесцентная активность у свободных и иммобилизованных клеток бактерий *Photobacterium phosphoreum***

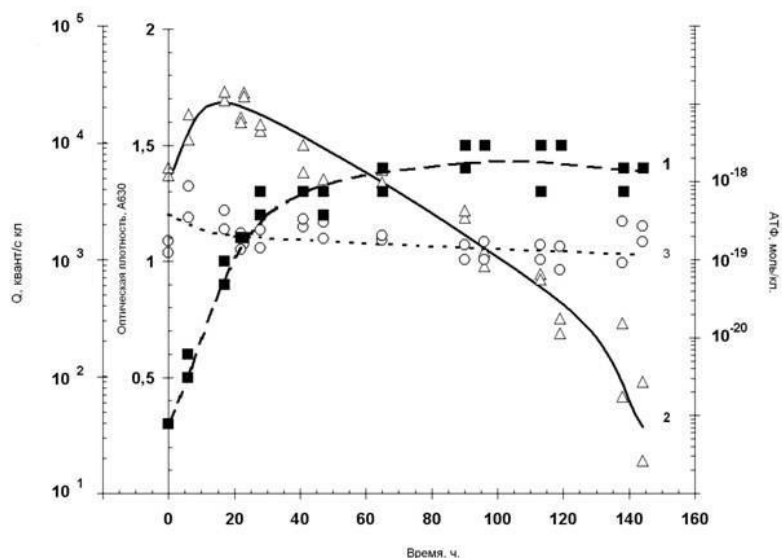
Люминесцентная активность фотобактерий контролируется комплексно многими факторами, в первую очередь субстратами и кофакторами



люминесцентной системы, а также аутоиндукторами, температурой, рН и другими элементами.

Особое значение для эмиссионного процесса имеет пул АТФ, который является интегральным индикатором темновых и световых реакций. Содержание АТФ в клетках фотобактерий по данным разных авторов составляет  $0,2-2,0 \times 10^{-18}$  моль на клетку. Несмотря на то, что АТФ не включается непосредственно в световую реакцию, окисление восстановленного флавина и альдегидной молекулы люциферазой бактерий с эмиссионной активностью  $10^4-10^5$  квант $\times$ с $^{-1}$ кл $^{-1}$  может представлять потенциальную конкуренцию за электроны, необходимые для АТФ синтеза.

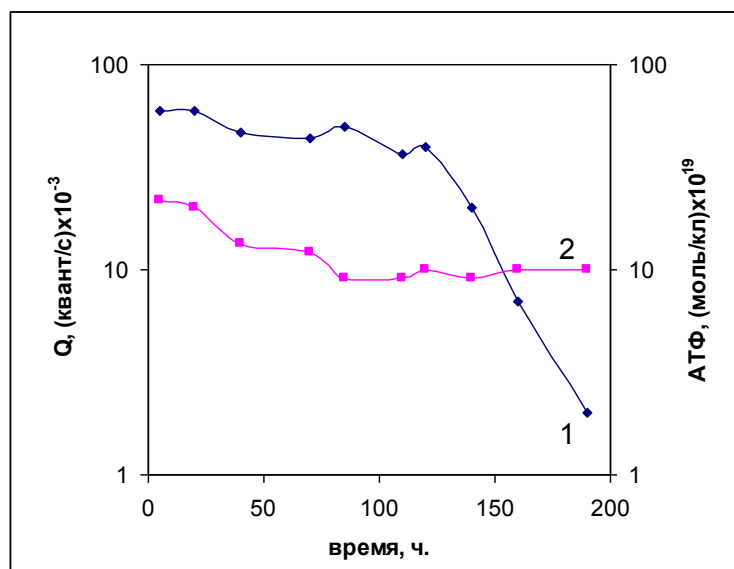
На рисунке 8 представлены динамика роста, удельная биолуминесцентная активность и пул АТФ при глубинном культивировании бактерий при 20°C. Установлена асинхронность во времени между биолуминесцентной активностью и пулом АТФ. Длительность люминесцентного цикла более 100 часов. Пул АТФ незначительно снижается в логарифмической фазе и сохраняется на постоянном уровне ( $0,2-0,5 \times 10^{-18}$  моль/кл) за весь период люминесцентного цикла. Удельная биолуминесцентная активность достигает максимума к 20 ч роста, после чего происходит медленное затухание свечения. Падение активности за 100 часов не превышает 1,5 порядка.



**Рисунок 8.** Динамика роста (1), удельной биолуминесцентной активности (2), и АТФ пула (3) при глубинном культивировании бактерий *P. phosphoreum* в комплексной среде при 20°C.

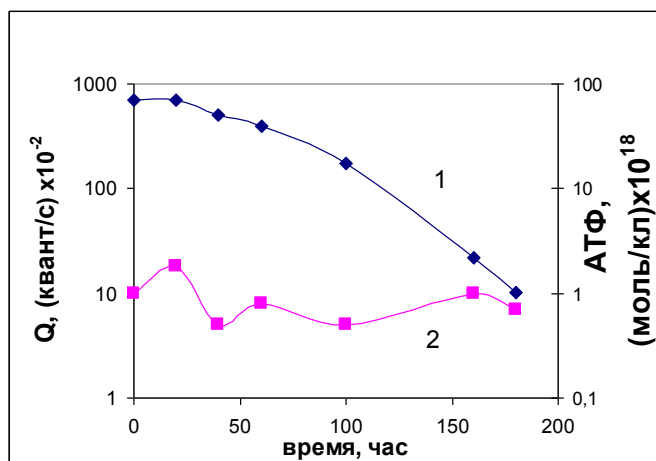
Наряду с исследованием пула АТФ в глубинной культуре те же параметры изучались в изолированных интактных клетках фотобактерий при их инкубации в богатой среде культивирования и 3% NaCl. Установлено, что как при дефиците кислорода, так и при дефиците энергетических субстратов пул АТФ остается на постоянном уровне в течение более 100 часов инкубации.

Результаты параллельного анализа свечения и концентрации АТФ в иммобилизованных клетках за 200-часовой период свидетельствовали об отсутствии корреляции между этими параметрами. При падении свечения на 3 порядка, содержание АТФ в препаратах остается практически постоянным, в пределах вариаций, совокупно отражающих структурные особенности объекта, погрешности экстракции и анализа АТФ (рис. 9).



**Рисунок 9.** Динамика билюминесцентной активности (1) и пула АТФ (2) иммобилизованных в криогеле ПВС клеток *P. phosphoreum* (концентрация клеток  $\sim 10^6$  кл/гранулу) при инкубации препаратов при  $4^\circ\text{C}$  в среде культивирования.

При инкубации иммобилизованных клеток в голодной среде, не содержащей источников энергии и углерода, энергообеспечение клетки ограничено только эндогенными субстратами. Сравнительный анализ билюминесцентной активности и содержания АТФ в иммобилизованных клетках при инкубации гранул ( $\sim 10^7$  кл/гранулу) в 3% NaCl (1/20 v/v) представлен на рисунке 10.



**Рисунок 10.** Динамика удельной билюминесцентной активности (1) и пула АТФ (2) иммобилизованных в криогеле ПВС клеток *P. phosphoreum* при инкубации препаратов при 4°C в 3% NaCl.

Резюмируя результаты параллельного анализа АТФ и билюминесцентной активности фотобактерий в различных режимах инкубации клеток и препаратов можно сделать ряд принципиальных выводов о факторах, непосредственно регулирующих интенсивность свечения и длительность люминесцентного цикла.

Затухание свечения, как в растущей культуре, так и в стационарных и иммобилизованных клетках, не является следствием снижения энергетического потенциала клетки.

Долговременная стабильность пула АТФ подтверждает правомочность применения метода билюминесцентной АТФ-метрии для количественного анализа фотобактерий, как в свободной, так и находящихся в иммобилизованной форме, независимо от физиологического возраста клеток, состава среды и времени инкубации препаратов.

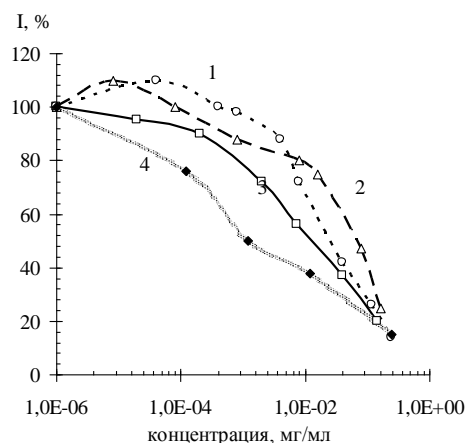
Постоянство пула АТФ свидетельствует о низком уровне темновых утечек и незначительном расходе энергии на метаболические реакции по поддержанию жизнедеятельности в неделящихся и стационарных, пролиферативно покоящихся, клетках глубинных культур фотобактерий. Стабильность пула АТФ при длительной инкубации клеток также указывает на отсутствие утечки АТФ или разобщения процессов окислительного фосфорилирования.

### **Билюминесцентный мониторинг экотоксикантов**

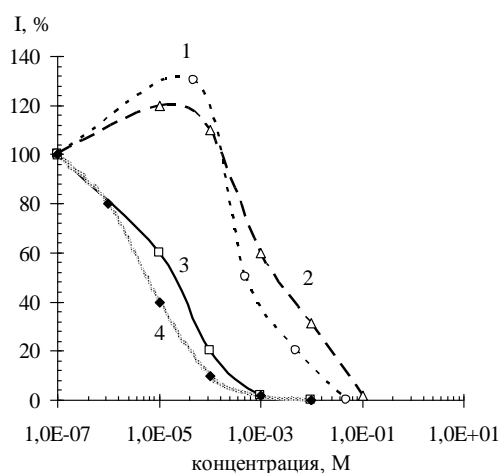
В результате проведенных нами экспериментов оптимизированы технологии получения и условия хранения препаратов с высокостабильной эмиссией, разработаны оригинальные методики практического применения тест-системы для биомониторинга токсинов.

Анализ кинетики ингибирования свободных и иммобилизованных клеток тяжелыми металлами, хлорфенолами, пестицидами показал сходные временные профили тушения свечения, что свидетельствовало об отсутствии серьезных диффузионных ограничений для всех использованных молекул токсинов материалом геля и формой гранул.

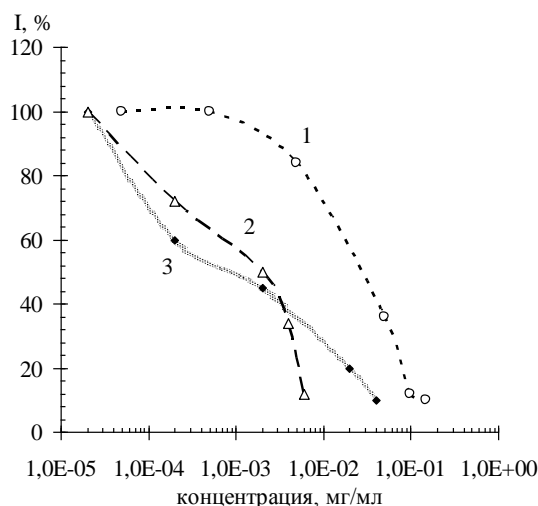
На рисунке 11, 12, 13 представлены концентрационные зависимости тушения свечения гранул с иммобилизованными клетками тяжелыми металлами, фенольными производными, пестицидами.



**Рисунок 11.** Тушение свечения иммобилизованных клеток *P. phosphoreum* тяжелыми металлами: 1. - 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, 2. - 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 3. - 2,6-диметилфенол, 4. - пентохлорфенол.



**Рисунок 12.** Тушение свечения иммобилизованных клеток *P. phosphoreum* тяжелыми металлами: 1. -  $\text{CoCl}_2$ , 2. -  $\text{ZnCl}_2$ , 3. -  $\text{HgCl}_2$ , 4. -  $\text{CuSO}_4$



**Рисунок 13.** Тушение свечения иммобилизованных клеток *P. phosphoreum* тяжелыми металлами: 1. - коммофос, 2. - паратион, 3. – малатион

Процедура анализа включала 10-минутное уравнивание гранул с температурой среды (22°C), и последующей 5-мин. инкубации гранул с токсином. Каждая концентрация токсиканта анализировалась в трех повторах и определялось среднее значение. В контрольных экспериментах вносились соответствующие аликвоты растворителя (воды, этанола, DMSO). Установлено, что пороговая чувствительность свободных и иммобилизованных клеток к выбранным тушителям свечения приблизительно одинакова, и в целом соответствует литературным данным.

Наряду с применением иммобилизованных препаратов в дискретном анализе токсинов разработаны технологические процедуры непрерывного биомониторинга этих соединений. Оптимизированы режимы протока, условия введения пробы с токсикантом, геометрические параметры биосенсора и температурный режим. Проведенный анализ кинетики ингибирования свечения. Установлена обратимая кинетика свечения, зависящая от концентрации токсина и скорости протока.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель данной работы - разработка научных и технологических операций получения нового типа люминесцентных биосенсоров, в основе которых заложена иммобилизация светящихся бактерий в криогеле поливинилового спирта. Технологические операции по криогенной иммобилизации разрабатывались с учетом уникального метаболизма морских, умеренно галофильных фотобактерий, со специфическим отношением к физико-химическим параметрам среды, прежде всего к температуре, рН, солевому составу, наличию субстратов люциферазы и ингибиторов люминесцентной системы бактерий. В рамках поставленных задач проведена комплексная

работа по подбору и оптимизации процедур криогенной иммобилизации, специфичных для светогенерирующего объекта- морских светящихся бактерий. Проведен отбор фотобактерий с наиболее стабильной и пролангированной эмиссией света, как в глубинной культуре, так и в свободных и иммобилизованных клетках. Исследованы морфологические, физиологические и микробиологические параметры психрофильных штаммов фотобактерий, отличающихся наиболее стабильной эмиссией света. Проведен анализ основных физиологических параметров и физико-химических факторов, контролирующих эмиссионную активность иммобилизованных бактерий, оптимизированы условия для получения высокостабильной и пролангированной эмиссией света биосенсорами. Исследованы особенности интродукции носителя (криогеля ПВС) в ходе «принудительной» иммобилизации и спонтанной колонизации сформированных препаратов криогеля фотобактериями.

Разработаны и апробированы операции по дискретному и непрерывному мониторингу различных классов экотоксикантов в дискретном и непрерывном режиме.

Резюмируя экспериментальный материал данной работы можно прийти к ряду фундаментальных научных выводов как по технологическим операциям получения новых типов биосенсоров, их физико-химических и биотехнологических характеристик, так и к научным основам по анализу процессов, контролирующей интенсивность и стабильность иммобилизованных клеток. К основным достижениям работы необходимо отнести:

1. Выбор носителя. В соответствии с нашими и литературными данными криогель ПВС обладает рядом характеристик, имеющих важное значение при иммобилизации светящихся бактерий. Данный носитель нетоксичен по отношению к включенным микроорганизмам, обладает макро и микропорами, благодаря которым нет ограничений для диффузии субстратов, протекторов, а также токсинов. Криогенная полимеризация не требует введения дополнительного криопротектора, например, глицерина. Сформированные криогели оптически прозрачны, обладают механической прочностью, устойчивостью структуры к температуре до +70°C. При формировании возможно получение препаратов различной формы – от пленок до гранул. Препараты устойчивы при хранении при -80°C. Принципиальное значение имеет тот факт, что формирование криогеля мало зависит от состава среды (солевого состава, буферности, рН).

Для получения высокостабильной и пролонгированной эмиссии необходима модификация криогеля, обогащением его субстратами и протекторами. Проведенный анализ различных сред формирования криогеля показал, что наиболее эффективной средой формирования гелей является богатая, сбалансированная среда для глубинного культивирования

фотобактерий. В данной среде после проведения процедуры «замораживание/оттаивание» сохраняется 100% люминесцентная активность клеток. Исключения из среды гелеобразования пептона вызывает снижение люминесцентной активности клеток на 1-2 порядка. Наиболее существенный спад уровня свечения (в  $10^3$ - $10^4$  раз) наблюдается при иммобилизации в гелях, сформированных на основе только одного NaCl.

2. Использование технологии криогенного гельформирования ПВС позволяет исключить отрицательное влияние температуры на клетки фотобактерий, которое наблюдается при применении других (агаровых, агарозных и альгинатных) носителей.

Установлена повышенная устойчивость иммобилизованных клеток к температурам превышающим оптимальные по сравнению со свободными.

3. Проведен комплексный анализ выживаемости фотобактерий в носителе криогеля ПВС. В качестве основного критерия выживаемости рассматривалась удельная биолюминесцентная активность клеток. Для количественного анализа живых клеток в носителе применен метод биолюминесцентной АТФ-метрии. Установлено, что пул АТФ в течение более 200 часов инкубации клеток при 4°C независимо от состава среды инкубации сохраняется на постоянном уровне. С использованием электронной микроскопии проведен анализ структуры полимерной матрицы криогеля, состояния клеток в носителе в результате иммобилизации. Основная масса клеток сосредоточена в порах в объеме носителя, крайне незначительное количество клеток зафиксировано на поверхности гранул. Гранулы с иммобилизованными клетками могут быть использованы в качестве инокулята для глубинного культивирования. Установлено, что при длительной инкубации (более двух суток) иммобилизованные клетки способны диффундировать из носителя в среду культивирования.

4. Проведен анализ наиболее значимых факторов, контролирующих интенсивность и стабильность эмиссии света иммобилизованными клетками. В качестве критерия энергетического состояния клетки использован пул АТФ в растущей глубиной культуре микроорганизмов, изолированных интактных клетках и иммобилизованных в криогеле ПВС *P. phosphoreum*. Установлено, что у исследованных бактерий пул АТФ сохраняется на постоянном уровне на протяжении всего люминесцентного цикла глубиной культуры. Постоянство пула АТФ наблюдается в интактных клетках фотобактерий как в условиях дефицита энергетических субстратов (инкубация в 3% NaCl), так и при блокировании дыхательной цепи кислородом. Результаты параллельного анализа интенсивности эмиссии и пула АТФ в иммобилизованных в криогеле ПВС клетках за 200 часов инкубации, как в среде культивирования, так и в простом солевом растворе (3% NaCl) показали, что концентрация АТФ ( $1-5 \times 10^{-19}$  моль/клетку) остается постоянной. Таким образом, АТФ не лимитирует энергетический метаболизм клетки. Стабильность пула АТФ при длительной

инкубации клеток указывает на отсутствие утечек АТФ или на разобщение процесса окислительного фосфорилирования.

5. Полученные препараты иммобилизованных в криогеле ПВС клеток использованы в качестве биосенсоров в дискретном и непрерывном биомониторинге различных классов экотоксикантов. Установлено, что благодаря наличию макропор отсутствуют диффузионные ограничения для всех групп экотоксикантов. Кинетические профили тушения свечения свободных и иммобилизованных клеток практически идентичны. При непрерывном биомониторинге экотоксикантов кинетика инактивации свечения имеет обратимый характер. В непрерывном биомониторинге оптимизированы среда инкубации гранул в проточной кювете, скорость протока, температурный режим, геометрические размеры биосенсоров (гранул). Установлено, что в режиме протока эмиссионная активность стабильна в течение суток при температуре раствора 10–20°C. Кинетический профиль тушения свечения зависит от концентрации токсиканта. Кинетика реверсии эмиссии отражает обратимость ингибиторного эффекта в проточном режиме.

Разработанные технологии биолюминесцентного анализа на свободных и иммобилизованных фотобактериях в дискретном и непрерывном режиме, в силу высокой чувствительности, быстродействия и стабильности, могут быть перспективны для экспресс-детекции загрязнителей в водных акваториях и промышленных стоках в режиме реального времени, а также в контроле за процессами биотрансформации и деградации токсинов.



## **ВЫВОДЫ**

1. Получен новый тип люминесцентных биосенсоров, основанный на иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта клетках светящихся бактерий.
2. Разработаны технологические процедуры криогенной иммобилизации клеток фотобактерий в ПВС, позволившие создать препараты с интенсивной ( $10^4$  -  $10^5$  квант/с кл) и пролонгированной (более 200 часов) эмиссией света.
3. Показано, что детерминирующие воздействия на эмиссионную активность оказывают: штаммовые характеристики объекта иммобилизации, состав гельформирующей смеси, технологические операции «замораживания/оттаивания», температурный режим.
4. Выделен, охарактеризован и использован для получения фотобиосенсоров новый психрофильный штамм светящихся бактерий.
5. Показано, что затухание свечения иммобилизованных клеток фотобактерий не связано с падением энергообеспечения клетки.
6. Установлено, что критичным фактором затухания свечения является сдвиг pH среды кислыми продуктами метаболизма.
7. Разработанные биосенсоры применены в биомониторинге экотоксикантов в дискретном и непрерывном режиме.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**  
**Статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ**

1. Л.Э.Алескерова, К.А.Аленина, Е.Н.Ефременко, М.М.Мажуль, Н.Ф.Пискункова, А.Д.Исмаилов. АТФ-пул и биолюминесцентная активность у психрофильных бактерий *Photobacterium phosphoreum* // Микробиология. 2014. т. 83, N.4.,с. 315-321.
2. Е.Н.Ефременко, Л.Э.Алескерова, К.А.Аленина, А.Д.Исмаилов. Токсикологические биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. N.5. С. 490-496
3. Е.С.Лобакова, А.Д.Исмаилов, П.Б.Кашеева, Л.Э.Алескерова, Е.О.Омарова, Р.К.Идиатулов, Е.А.Иванова, Е.Е.Белюсова, А.Г.Дедов. Определение токсичности нефтесорбентов на основе нетканых полимерных материалов биолюминесцентным методом// Химическая технология. 2013. 14(11). с. 672-678
4. К.А.Alenina, L.E.Aleskerova, P.B.Kascheyeva, A.D.Ismailov. The poly(vinyl alcohol)-immobilized photobacteria for toxicology monitoring. // Engineering. 2012. V. 4. p. 118-119.

**Тезисы докладов:**

1. Аленина К.А., Алескерова Л.Э., Вахромеева Т.А., Кашеева П.Б., Исмаилов А.Д. АТФ-пул и эмиссионная активность психрофильных бактерий *Photobacterium phosphoreum*. // IV Съезд биофизиков России, 2012, с. 15
2. Алескерова Л.Э., Аленина К.А., Вахромеева Т.А., Кашеева П.Б., Исмаилов А.Д. Детерминирующие элементы стабилизации свечения при иммобилизации фотобактерий в криогель поливинилового спирта. // IV Съезд биофизиков России. 2012. С. 16
3. К.Alenina, L.Aleskerova, T.Vachrameeva, A.Ismailov. Bioluminescence and pool ATP in psychrophilic bacteria *Photobacterium phosphoreum*. // FEMS. 2013.
4. L.Aleskerova, K.Alenina, E.Efremenko, A.Ismailov. The immobilization of photobacteria in poly(vinyl-alcohol)-cryogel. // FEMS. 2013
5. А.Д.Исмаилов, В.В.Куц, К.А.Аленина, Л.Э.Алескерова, Т.А.Вахромеева, М.М.Мажуль. Светящиеся бактерии Белого моря. // Конференция посвященная 75-летию ББС им. Н.А.Перцова. 2013. С. 111-115.

6. K.A.Alenina, L.E.Aleskerova, P.B.Kascheyeva, A.D. Ismailov. The poly(vinyl alcohol)-immobilized photobacteria for toxicology monitoring. // World Congress on Engineering and Technology (CET). 2012.
7. Л.Э.Алескерова, К.А.Аленина, А.Д.Исмаилов. Фотолюминесцентные биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта *Photobacterium phosphoreum*.// VII съезд Российского фотобиологического общества. 2014. С. 96.
8. М.М.Мажуль, Л.Э.Алескерова, К.А.Аленина, А.Локтюшкин, А.Д.Исмаилов. Флуоресцентные и биолюминесцентные характеристики психрофильных фотобактерий из Белового моря. // VII съезд Российского фотобиологического общества. 2014. С. 110
9. Алескерова Л.Э., Мажуль М.М., Исмаилов А.Д. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта фотобактерий *Photobacterium phosphoreum*. // Международная конференция «Физиология и биотехнология оксигенных фотоавтотрофных микроорганизмов», 2014, с.85-86