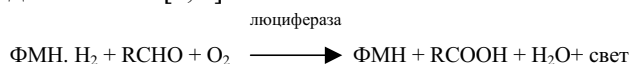


## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ БИОТЕСТЫ НА ОСНОВЕ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Биолюминесцентный анализ – один из перспективных экспрессных методов биомониторинга окружающей среды. Биолюминесцентные бактериальные биотесты дают интегральную оценку загрязнения и часто превосходят другие известные биотесты по быстродействию, точности, чувствительности и простоте. В Коллекции культур ИБСО разработана технология производства биотестов на основе лиофильно высушенных природных светящихся бактерий *P. phosphoreum* и рекомбинантного штамма *E. coli* с клонированным геном люциферазы. Метод гостирован и используется для экологического мониторинга.

Для решения экологических задач, а также для исследований в области медицины, сельского хозяйства, фундаментальной биологии необходимы быстрые и удобные методы анализа токсичности веществ. Биолюминесцентный анализ стал в настоящее время одним из перспективных экспрессных методов биологического мониторинга окружающей среды. Биолюминесценция бактерий является одной из разновидностей хемилюминесцентной реакции, для осуществления которой необходимы восстановленный флавиномононуклеотид, кислород, длинноцепочечный альдегид и фермент – люцифераза, а конечными продуктами являются жирная кислота, вода и видимый свет [1, 2]:



Свечение бактерий в благоприятных условиях довольно яркое, в слегка затемненном помещении его хорошо видно невооруженным глазом. Бактериальная биолюминесценция обладает высокой чувствительностью к действию различных ингибиторов биологической активности: анестетиков, наркотиков, промышленных ядов, инсектицидов, пестицидов, отравляющих и лекарственных веществ [1, 3-6]. Широко используются для этих целей бактерии двух родов: *Photobacterium* и *Vibrio* (*P. phosphoreum*, *P. leiognathi*, *V. fischeri*, *V. harveyi*). Эти бактерии используются при изготовлении биолюминесцентных биотестов для оценки загрязнения природных водных источников, промышленных стоков и почв [5-9].

Биотесты с использованием живых бактерий отличаются от современных биотестов, использующих инфузории, дафнии, водоросли, рыб, тем, что в качестве параметра жизнедеятельности используется биолюминесценция. Биотесты на светящихся бактериях дают количественную меру токсичности и часто превосходят известные биотесты по быстродействию, точности, чувствительности и простоте, позволяют контролировать одновременно значительное число токсикантов [8-12].

В основе этих методов лежит изменение интенсивности люминесценции биопрепаратов

после воздействия того или иного анализируемого вещества. Концентрацию анализируемого вещества определяют, измеряя параметры излучения. Исходя из современных требований, предъявляемых к оценке токсичности веществ, биолюминесцентным способом можно определить общепризнанные в токсикологии параметры, такие как эффективная концентрация (ЭК-50) – концентрация вещества, которая подавляет функцию люминесценции на 50%, и пороговая концентрация (ЛК-0) или уровень биологически безопасного разведения (УББР) – концентрация (разведение) исследуемого вещества, при достижении которой уровень свечения исследуемых растворов равен интенсивности свечения в контрольных кюветах.

В последнее время разрабатываются разнообразные биолюминесцентные биотесты на основе рекомбинантных штаммов. Возможность использования *lux*-генов в качестве маркера генной экспрессии важна в изучении патогенности, вирулентности, адаптации, а также вторичного метаболизма [13, 14]. Уже имеются примеры использования этого пути для изучения транскрипции [15]. Создаются и используются рекомбинантные биолюминесцентные штаммы для определения различных антибиотиков [16-19], тяжелых металлов [20-22]. Использование рекомбинантных штаммов *E. coli* с клонированным геном люциферазы оказалось эффективным при разработке биопрепарата для тестирования с помощью методов биолюминесцентного анализа пресных вод [23, 24]. Получены репортерные штаммы, обладающие высокой специфичностью к определенному токсическому агенту [25]. Имеется ряд сообщений о создании биолюминесцентных репортеров для определения тяжелых металлов и фенолов в водных и почвенных образцах [26-29].

Светящиеся бактерии из коллекции культур ИБСО были успешно использованы для создания тест-систем на различные фенолы и их производные, сульфопроизводные янтарной кислоты и гексахлоранциклогексана (ГХЦГ) [30-32], а также для разработки биотестов на основе лиофилизированных природных светящихся бак-

терий *P. phosphoreum* и трансгенного штамма *E. coli* с *lux*-геном.

В настоящей работе представлены результаты использования биолюминесцентных биотестов на основе лиофилизированных природных светящихся бактерий *P. phosphoreum* и трансгенного штамма *E. coli* с *lux*-геном для оценки степени загрязнения различных водных источников Сибири.

### Методы

Биотесты Микробиосенсор В17-677F (на основе светящихся лиофилизированных бактерий *Photobacterium phosphoreum* из Коллекции культур ИБСО) и Микробиосенсор ЕСК (на основе генетически модифицированного штамма *E. coli* Z905, несущего плазмиду PHL1 с *lux*-геном из *Photobacterium leiognathi*, любезно предоставленный Б.А. Илларионовым) разработаны в Институте биофизики СО РАН [33, 34]. Биотесты являются стандартными тест-объектами для измерения интегральной токсичности исследуемых водных образцов, исключают необходимость культивирования и поддержания бактериальных культур с маркерным *lux*-геном.

Пробы воды собирали в определенных точках рек и водоемов, а также исследовали сточные воды некоторых промышленных предприятий. Образцы хранили при 4°С, затем анализировали их с предварительной фильтрацией или без нее. К клеточной суспензии, содержащей 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> клеток/мл (в 3% растворе хлорида натрия), добавляли растворы с определенной концентрацией токсикантов. Интенсивность бактериальной люминесценции измеряли с использованием стандартной методики с помощью биолюминометра, созданного в Институте биофизики.

Токсичность образца оценивалась по величине биолюминесцентного индекса, который рассчитывался по формуле:

$$БИ = I_o / I_k$$

(относительные единицы) или  $БИ = (I_o / I_k) \cdot 100\%$  (проценты),

где *БИ* – остаточная относительная активность люминесценции,

*I<sub>o</sub>* – интенсивность свечения бактерий в опытной кювете,

*I<sub>k</sub>* – интенсивность люминесценции бактерий в контрольной кювете.

«Норма» *БИ* = 0,8-1,2 отн. ед, или 80-120%.

### Результаты и обсуждение

Сравнение действия модельных веществ на микробиосенсоры показало, что Микробиосенсор В17-677F и Микробиосенсор ЕСК имеют

сходную зависимость люминесценции от концентрации вещества. Анализ полученных результатов показал, что чувствительность Микробиосенсора ЕСК к фенольным соединениям выше, чем у Микробиосенсора В17-677F (рис. 1). При этом самым токсичным из исследованных соединений являлся парабензохинон, максимальное ингибирующее действие наблюдалось в диапазоне концентраций 10<sup>-5</sup> – 1 мг/мл.

Эффективная концентрация (*EC*<sub>50</sub>) равна 6 x 10<sup>-5</sup> мг/мл через 5 мин. воздействия. Для гидрохинона эффективная концентрация (*EC*<sub>50</sub>) равна 2 x 10<sup>-4</sup> мг/мл. *EC*<sub>50</sub> для пирокатехина после 5 мин. воздействия равна 10<sup>-2</sup> мг/мл. Полученный ряд токсичности фенольных соединений для Микробиосенсора ЕСК соответствует рядам токсичности фенольных соединений, определенных на интактных клетках светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* и различных гидробионтов [32].

Одним из источников поступления фенольных соединений и тяжелых металлов в водоемы служат сточные воды целлюлозно-бумажных комбинатов (ЦБК). С использованием лиофилизованного препарата Микробиосенсора ЕСК (рекомбинантный штамм *E. coli*) проведено тестирование сточной воды ЦБК г. Красноярска. Исследования показали, что угнетение люминесценции на 50% достигается при разведении в 100 раз и сточная вода ЦБК только при разведении в 1000 раз становится не токсичной.

Оценка состояния воды в колодцах, реках и водоемах Алтайского края с помощью биолюминесцентного биотеста Микробиосенсор В17-677F показала, что ряд источников имел значительные отклонения от нормы. В ходе мониторинга выяснилось, что реки Катунь и Бия следует рассматривать как незагрязненные, а реки Алей и Чумыш – как реки со слабо токсичным загрязнением (рис. 2). В большинстве колодцев вода имела отклонения от нормы. В части озер обнаружено значительное отклонение от нормы, что было вызвано, скорее всего, наличием в них большого количества органических веществ или сбросов промышленных отходов (рис. 3). Следует отметить, что по результатам биотестирования определялась необходимость проведения химического анализа, подтвердившего результаты биотестирования и показавшего значительные превышения содержания различных загрязнителей, в первую очередь фенолов и тяжелых металлов, по сравнению с ПДК в пробах, где наблюдалось ингибирование биолюминесценции.

Биотесты на основе лиофилизированных светящихся бактерий были использованы также для

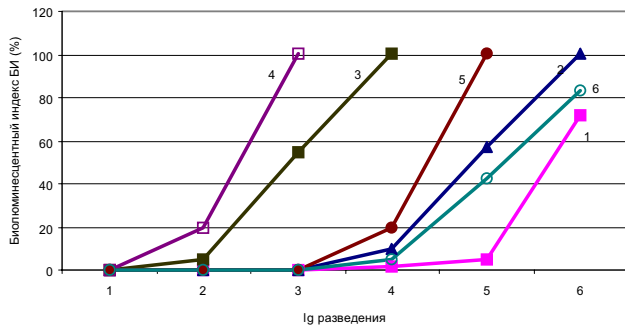


Рисунок 1. Влияние различных фенолов на люминесценцию двух биотестов: парабензохинон (1 – *E. coli*, 6 – *P. phosphoreum*); гидрохинон (2 – *E. coli*, 5 – *P. phosphoreum*); катехол (3 – *E. coli*, 4 – *P. phosphoreum*).

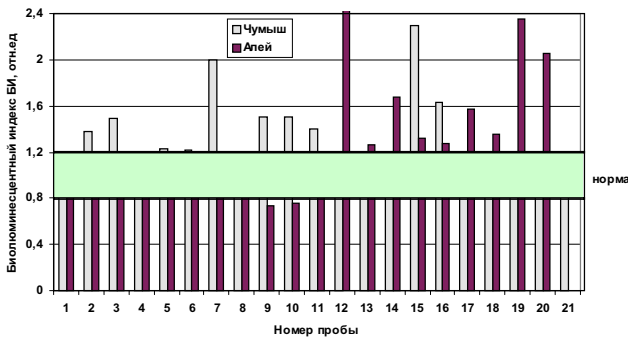


Рисунок 2. Зоны различного качества воды в реках Алей и Чумыш, определенные биоломисцентным биотестом Микробиосенсор V17– 677F.

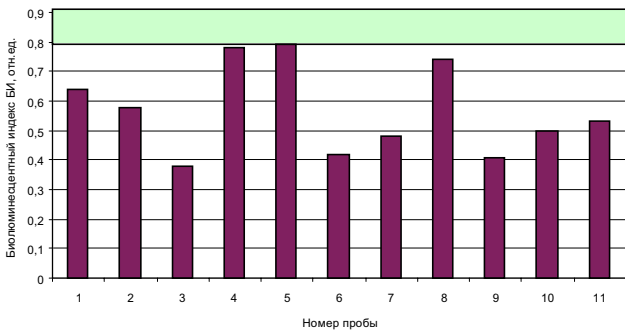


Рисунок 3. В озере Большое Островное воду следует признать токсичной, так как во всех измеренных пробах люминесценция биотеста Микробиосенсор V17– 677F была ниже нормы, которая лежит в границах 0,8-1,2.

Более половины проб были взяты в местах сброса сточных вод от ферм и промышленных предприятий.

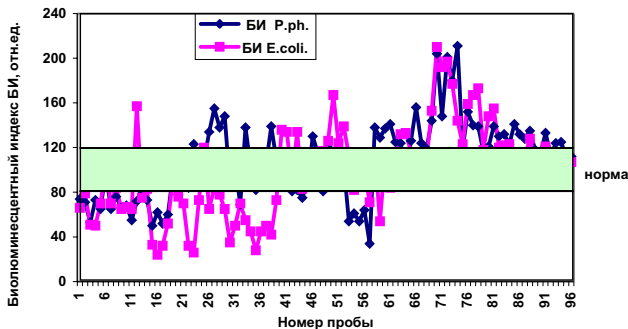


Рисунок 4. Зоны различного качества воды в реке Енисей, определенные двумя биоломисцентными биотестами Микробиосенсор V17-677F и Микробиосенсор ЕСК.

оценки загрязнения вод реки Енисей. Рис. 4 демонстрирует зоны плохого качества воды реки Енисей, наблюдавшиеся в 1998 году. Эта зона находится на участке 300 км от г. Красноярска ниже по течению, Сравнение результатов измерений, полученных с помощью двух биоломисцентных биотестов (Микробиосенсора V17-677F и Микробиосенсора ЕСК), показало, что биотест с использованием генетически модифицированного *E. coli* был более чувствителен к присутствию в среде загрязнителей, чем биотест на *P. phosphoreum*. Это можно объяснить более высокой проницаемостью клеточной стенки *E. coli* и, возможно, высаливанием токсикантов (уменьшением концентрации ингибирующих веществ после добавления хлорида натрия в исследуемый раствор) при биотестировании с использованием морских светящихся бактерий *P. phosphoreum*.

Мониторинг вод реки Ангары биоломисцентным биотестом (рис. 5) позволил сделать заключение, что природная вода является нетоксичной на большем ее протяжении, так как ингибирования биоломисценции не обнаружено. Однако воду нельзя считать совершенно чистой – многие пробы стимулировали люминесценцию биотеста, иногда очень значительно. Этот факт свидетельствует о наличии в исследуемых образцах большого количества растворенных органических веществ природного и антропогенного происхождения.

### Заключение

Методы, основанные на биохемилюминесцентных реакциях, в настоящее время играют важную роль не только в экологических, но и в биомедицинских исследованиях, клинической медицине, иммунологии. Наиболее важным токсикологическим параметром ( $EC_{50}$ ) является концентрация вещества, уменьшающая бактериальную люминесценцию на 50% [35]. Исследования токсичности ведутся по нескольким направлениям: 1) исследование токсичности отдельных веществ; 2) исследование токсичности смеси большого количества известных веществ; 3) экологи-

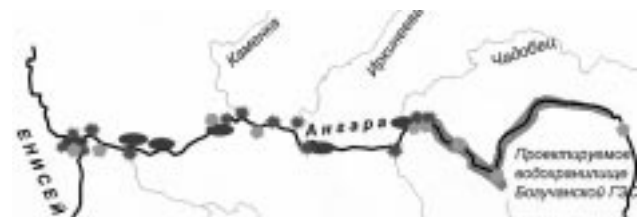


Рисунок 5. Зоны различного качества воды в реке Ангаре, определенные биоломисцентным биотестом. Пятиугольник – БИ = норма, овал – БИ около нормы (отклонение не больше 20% от нормы), звезда – увеличение БИ в 1,5-2,5 раза по сравнению с нормой.

ческие исследования, в которых определяется интегральное токсическое действие всех присутствующих в пробе поллютантов.

Биолюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий – Microtox, ToxAlert, LUMISTox производятся за рубежом [36-40]. Наибольшее применение нашел биотест Microtox, который используется в лабораторных и полевых исследованиях для контроля качества промышленных и природных вод, определения степени токсичности вновь создаваемых химических соединений и фармацевтических препаратов [20-23, 41-42].

Биотесты могут быть рекомендованы для непрерывного экспресс-контроля состояния окружающей среды промышленных районов и природно-хозяйственных комплексов, контроля залповых вредных выбросов предприятий, для оценки эффективности применяемых методов детоксикации окружающей среды и работы очистных сооружений, а также для экологической паспортизации предприятий и отдельных районов [22, 42-45].

Опытные образцы на основе лиофилизированных природных светящихся бактерий «Микробиосенсор В17-677F» и «Микробиосенсор ЕСК» на основе рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего *lux*-ген из природных светящихся бактерий, успешно использованы в определении токсичности сточных вод и очистных сооружений различных городов России и СНГ. Метод получил положительную оценку специалистов, гостирован и рекомендован как дополнительный метод экологического мониторинга. Один флакон

микробиосенсора может быть использован для измерения примерно 100 экспериментальных водных образцов. Активность микробиосенсора остается стабильной в течение 6 месяцев при хранении в бытовом холодильнике при температуре +5-10° С и более одного года при хранении при температуре –18° С. Чувствительность разработанных биосенсоров сравнима с зарубежными аналогами, цена значительно ниже имеющихся аналогов.

Наличие в институте Коллекции культур ИБСО, насчитывающей более 700 штаммов светящихся бактерий, открывает широкие возможности для поиска чувствительных к определенным токсикантам штаммов. Кроме того, коллекция ИБСО является базой для получения *lux*-генов для маркерных рекомбинантных организмов, а также для получения целевых мутантов, необходимых для разработки тест-метода на мутагенность. Выбранные в результате скрининга штаммы могут успешно использоваться для изготовления новых и совершенствования существующих микробиосенсоров, основанных на лиофилизированных бактериях, несущих маркерный *lux*-ген. Такие биосенсоры могут быть пригодны для биотестирования воды, воздуха, почвы, химических веществ, используемых в быту. Разработанный нами микробиосенсор ЕСК (на основе *E. coli*) избавляет от необходимости вводить в исследуемый образец дополнительные добавки в виде солей, что повышает его чувствительность по сравнению с использованием природных светящихся бактерий в качестве основы микробиосенсора.

#### Список использованной литературы:

1. Гительзон И.И., Родичева Э.К., Медведева С.Е. и др. «Светящиеся бактерии». Новосибирск: Наука, 1984. – 277 с.
2. Hastings J.W., Johnson C.H. Bioluminescence and Chemiluminescence // *Methods Enzymol.*, 2003, 360. P. 75-104.
3. Arfsten D.P., Davenport R., Schaeffer D.J. 1994. Reversion of bioluminescent bacteria (*Mutatox*) to their luminescent state upon exposure to organic compounds, munitions, and metal salts // *Biomed Environ Sci*, 7(2), 144-149.
4. Ruiz M.J., Lopez-Jaramillo L., Redondo M.J., Font G., Toxicity assessment of pesticides using the Microtox test: application to environmental samples, // *Bull Environ Contam Toxicol*, 1997, 59(4), P.619-625.
5. Kudryasheva N., Vetrova E., Kuznetsov A., Kratasyuk V. and Stom D. Bioluminescence Assays: Effects of Quinones and Phenols // *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, 53(3), P. 198-203.
6. Roda A, Guardigli M, Pasini P, Mirasoli M. Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening // *Anal Bioanal Chem.*, 2003, 377(5), P. 826-33.
7. Isenberg D.L, Bulich A. / In: Environmental monitoring: use of luminescent bacteria, Chemical Safety 1994, Richardson M, editor, Weinheim VCH, 1994, P. 211-226.
8. Gellert G. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence // *Ecotoxicol Environ Saf.* 2000. 45(1). P. 87-91.
9. Ulitzur S, Lahav T, Ulitzur N. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity // *Environ Toxicol*, 2002, 17(3), P. 291-296.
10. Kaiser K.L. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // *Environ Health Perspect.* 1998; 106 Suppl 2, P. 583-91. Review
11. Jennings V.L.K., Rayner-Brandes M.H., Bird D.J. Assessing Chemical Toxicity With The Bioluminescent Photobacterium (*Vibrio fischeri*): A Comparison Of Three Commercial Systems // *Wat.Res.*, 2001, 35(14), P. 3448-3456.
12. Hemming J. M., P. K. Turner, B. W. Brooks, W. T. Waller, T. W. La Point. Assessment of Toxicity Reduction in Wastewater Effluent Flowing Through a Treatment Wetland Using *Pimephales promelas*, *Ceriodaphnia dubia*, and *Vibrio fischeri* // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2002, 42, P. 9-16.
13. Nyholm S.V., Deplancke B., Gaskins H.R., Apicella M.A., McFall-Ngai M.J. Roles of *Vibrio fischeri* and Nonsymbiotic Bacteria in the Dynamics of Mucus Secretion during Symbiotic Colonization of the *Euprymna scolopes* Light Organ // *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10) P. 5113-5122.
14. Choi S.H., Gu M.B. A portable toxicity biosensor using freeze-dried recombinant bioluminescent bacteria // *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, 17 P. 433-440.

15. Van Dyk, T. K. LuxArray, a High-Density, Genomewide Transcription Analysis of Escherichia coli Using Bioluminescent Reporter Strains // *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(19). P. 5496-5505.
16. Korpela M.T., Kurittu J.S., Karvinen J.T., Karp M.T. A recombinant Escherichia coli sensor strain for the detection of tetracyclines // *Anal Chem.*, 1998, 70(21). P. 4457-4462.
17. Kurittu J., Karp M., Korpela M. Detection of tetracyclines with luminescent bacterial strains // *Luminescence*, 2000, 15. P. 291-297.
18. Tenhami M., Hakila K. and Karp K. Measurement of effects of antibiotics in bioluminescent *Staphylococcus aureus* RN4220 // *Antimicrob Agents and Chemother*, 2001, 45. P. 3456-3461.
19. Simon L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo, J.-M. Berjeaud. Luminescent method for the detection of antibacterial activities. // *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2001, 57. P. 757-763.
20. Ren S., Frymier P.D. The use of a genetically engineered pseudomonas species (Shk1) as a bioluminescent reporter for heavy metal toxicity screening in wastewater treatment plant influent // *Water Environ Res.*, 2003, 75(1). P. 21-29.
21. Elke R., Rettberg P., Baumstark-Khan C., Horneck G. SOS-LUX- and LAC-FLUORO-TEST for the quantification of genotoxic and/or cytotoxic effects of heavy metal salts // *Analytica Chimica Acta*, 2002, 456. P. 31-39.
22. Ritchie J. M., Cresser M., Cotter-Howells J. Toxicological response of a bioluminescent microbial assay to Zn, Pb and Cu in artificial soil solution: relationship with total metal concentrations and free ion activities // *Environ. Pollut.*, 2001, 114. P. 129-136.
23. Wang C., Yediler A., Lienert D., Wang Z., Ketrup A. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri* // *Chemosphere*, 2002, 46(2). P. 339-344.
24. Bechor O., Smuski D.R., Van Dyk T.K., LaRossa R.A., Belkin S. Recombinant microorganisms as environmental biosensors pollutants detection by *E.coli* bearing *fabA:lux* fusion // *Biotechnology*, 2002, 94. P. 125-132.
25. Ben-Israel O., Ben-Israel H., Ulitzur S. Identification and quantification of toxic chemicals by use of Escherichia coli carrying *lux* genes fused to stress promoters // *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64. P. 4346-4352.
26. Belkin, S., D. R. Smulski, S. Dadon, A. C. Vollmer, T. K. Van Dyk and R. A. LaRossa. A panel of stress-responsive luminous bacteria for toxicity detection // *Water Res.*, 1997, 31. P. 3009-3016.
27. Tauriainen S., Karp M., Chang W., Virta M. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead // *Biosens. Bioelectron.*, 1998, 13(9). P. 931-938.
28. Hay A.G., Rice J.F., Applegate B.M., Bright N.G., Saylor G.S. A Bioluminescent Whole-Cell Reporter for Detection of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2,4-Dichlorophenol in Soil // *Applied And Environmental Microbiology*, 2000, 66(10). P. 4589-4594.
29. Abd-El-Haleem D., Ripp S., Scott C., Saylor G.S. A *luxCDABE*-based bioluminescent bioreporter for the detection of phenol // *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 2002, 29(5). P. 233-237.
30. Попова Л.Ю., Медведева С.Е., Могильная О.А., Пузырь А.П., Печуркин Н.С. Исследование светящихся бактерий в качестве тест-системы на гексахлоранциклогексан // *Прикл. биохим. микробиол.*, 1991, т. 27(6). С. 905-910.
31. Кратасюк В.А., Макурина В.И., Кузнецов А.М., Плотникова Н.Б., Медведева С.Е., Гриценко И.С., Черных В.П. Изучение действия на бактериальную люминесценцию активных сульфопроизводных янтарной кислоты // *Прикладн. биохим. микробиол.*, 1991, 27(1). С. 127-133.
32. Stom D.I., Geel T.A., Balayan A.E., Kuznetsov A.M., Medvedeva S.E. Bioluminescent method in studying the complex effect of sewage components // *Arch Environ Contam Toxicol*, 1992, 22. P. 203-208.
33. Kuznetsov A., Primakova G., Fish A. Lyophilized luminous bacteria as a toxicity biotest // *Biological Bioluminescence*. В. Jezowska-Trzebiatowska, В. Kochel, J. Slawinski, W. Strek (Edts), World Scientific. 1990. P. 559-563.
34. Кузнецов А.М., Медведева С.Е., Родичева Э.К. Использование генетически модифицированного светящегося штамма *Escherichia coli* в биотестировании // *Проблемы окружающей среды и природных ресурсов*, 2000, 10. С. 67-73.
35. Drzyzga O., Jannsen S., Blotvogel K.H. Toxicity of diphenylamine and some of its nitrated and aminated derivatives to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* // *Ecotoxicol Environ Saf.*, 1995, 31(2). P. 149-152.
36. Bulich A.A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples // *Process Biochem.*, 1982, 17. P. 45-47.
37. Ziesenis K., Grabert E. A novel method for determining chronic toxicity with the LUMISTox luminescent bacteria test / In: *Bioluminescence and chemiluminescence: fundamental and applied aspects*. Campbell AK, Kricka LJ, Stanley PE, editors, Chichester: Wiley, 1994. P. 76-78.
38. Blaise C., Forghani R., Legault R., Guzzo J., Dubow M.S. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent // *Biotechniques*, 1994, 16(5). P. 932-937.
39. Corbisier P. Bacterial metal-lux biosensors for a rapid determination of the heavy metal bioavailability and toxicity in solid samples. // *Res.Microbiol.*, 1997, 148(6). P. 534-536.
40. Shao C.Y., Howe C.J., Porter A.J., Glover L.A. Novel cyanobacterial biosensor for detection of herbicides // *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(10). P. 5026-5033.
41. Hill P.J., Denyer S.P., Stewart GSAB. Rapid assays based on in vivo bacterial bioluminescence // *Microbiol Europe*, 1993, 1. P. 16-21.
42. Richardson M. Ecotoxicity monitoring-use of *Vibrio fischeri* // *Arh Hig Rada Toxicol*, 1996, 47(4). P. 389-396.
43. Rathinam K., Mohanan P.V. Microtox system, a new approach to the safety evaluation of medical devices // *Biomater Appl*, 1998, 13(2). P. 166-171.
44. Wolska L., Polkowska Z. Bacterial luminescence test screening of highly polluted areas in the Odra River // *Bull Environ Contam Toxicol.*, 2001, 67(1). P. 52-58.
45. Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E., 1999. Analysis of river water by bioluminescent biotests // *Luminescence*, 14 (5). P. 263-265.