



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2007135540/13**, **26.09.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.09.2007

(45) Опубликовано: **20.06.2009** Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2063630 C1**, 21.07.1992. **RU 2063035 C1**, 27.06.1996. **SU 865904**, 23.09.1981.

МЕЛЕХОВА О.П. и др. Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование. - М.: Издательский центр «Академия», 2007, с.33-38.

Адрес для переписки:

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Университет, Департамент интеллектуальной собственности, патентов и трансфера технологий, Т.И. Матвеевой

(72) Автор(ы):

**Васильев Валерий Юрьевич (RU),
Калацкий Юрий Михайлович (RU),
Стефанов Василий Евгеньевич (RU),
Петрова Татьяна Александровна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет" (СПбГУ) (RU)

(54) СПОСОБ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области экологии и может быть использовано для определения интегральной загрязненности воды, а также водных экстрактов органическими и неорганическими соединениями. Возможно использование изобретения для определения присутствия этих веществ в воздушной среде после ее барботирования через воду. Способ включает инкубацию водорастворенных поллютантов с биологической тест-системой и количественную их оценку по вызываемому ими 50%-ному снижению величины максимальной люминолзависимой

хемилюминесценции по сравнению с контролем. В качестве тест-системы используют комплексный полиферментный препарат из корня хрена, обладающий оксидазно-пероксидазной активностью, в комбинации с сульфгидрильным реагентом, который берут в конечной концентрации не менее 0,1 мкг/мл и не более 100 мкг/мл. Изобретение позволяет повысить чувствительность способа определения загрязнения окружающей среды, а также обеспечивает возможность интегральной и количественной оценки загрязненности объектов окружающей среды. 1 з.п. ф-лы, 1 ил., 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12Q 1/28 (2006.01)*G01N 33/18* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2007135540/13, 26.09.2007**(24) Effective date for property rights:
26.09.2007(45) Date of publication: **20.06.2009 Bull. 17**

Mail address:

**199034, Sankt-Peterburg, Universitetskaja nab.,
7/9, Universitet, Departament intellektual'noj
sobstvennosti, patentov i transfera tekhnologij,
T.I. Matveevoj**

(72) Inventor(s):

**Vasil'ev Valerij Jur'evich (RU),
Kalatskij Jurij Mikhajlovich (RU),
Stefanov Vasilij Evgen'evich (RU),
Petrova Tat'jana Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe obrazovatel'noe
uchrezhdenie vysshego professional'nogo
obrazovaniya Sankt-Peterburgskij gosudarstvennyj
universitet" (SPbGU) (RU)**

(54) **METHOD OF INTEGRAL EXPRESS-EVALUATION OF ENVIRONMENTAL POLLUTION**

(57) Abstract:

FIELD: ecology.

SUBSTANCE: invention relates to ecology field and can be used for definition of water integral pollution, and also of aqueous extracts by organic and inorganic compounds. It is possible usage of invention for definition of presence of these substances in air quality after its barbotage through the water. Method includes incubation of water-soluted pollutants with biological test-system and its quantitative assessment by caused by them 50% value reduction of maximal luminal - dependent chemiluminescence in comparison with control. In the

capacity of test-system it is usedc complex multienzyme preparation made of horseradish root, allowing oxidase - peroxidase activity, in combination with sulfhydic reactant, which is taken in a finite concentration not less than 0.1 mcg/ml and not more than 100 mcg/ml.

EFFECT: invention provides increasing of sensitiveness of detection method of environmental pollution and also ability of integral and quantitative assessment of surrounding objects pollution.

1 dwg, 1 tbl, 5 ex

Изобретение относится к области экологии и может быть использовано для определения интегральной загрязненности воды, а также водных экстрактов органическими и неорганическими соединениями. Предлагаемый способ отличаются интегральный характер количественной оценки загрязненности, экономичность, простота и быстрота процедуры ее определения, стабильность получаемых результатов и устойчивость работы тест-системы в широком диапазоне концентраций реагентов.

Возможно использование изобретения для определения присутствия токсикантов в воздушной среде после ее барботирования через воду. Способ может быть использован для экологического картирования загрязненности водного и воздушного бассейнов, производственных, сельскохозяйственных, жилых и иных объектов и территорий и поиска источников загрязненности, а также для экспресс-контроля за работой водо- и воздухоочистных устройств, для мониторинга среды обитания человека.

Для интегральной оценки состояния окружающей среды с давних времен используются биологические тест-объекты. Это позвоночные животные - мелкие грызуны, птицы, рыбы и др., беспозвоночные животные - раки, рыбы, черви, дафнии и др., а также клеточные культуры и отдельные клетки.

Однако с помощью такого подхода можно получить либо качественные, либо полуколичественные оценки, и в редких случаях это будет строго количественный результат.

Для количественной оценки присутствия отдельных поллютантов в окружающей среде в настоящее время широко применяются ферментативные тест-системы, в том числе - тест-системы на основе пероксидазы. В композицию таких тест-систем входит препарат пероксидазы и второй сопряженный с ним фермент, обеспечивающий индивидуальную количественную оценку содержания поллютанта или определенного класса близко родственных веществ-загрязнителей. Тест-системы используют в жидком виде, в иммобилизованной форме или в виде биосенсоров - так называемые ферментные электроды. В таких тест-системах используются ферментные препараты высокой степени очистки [1].

Эти тест-системы дороги, не всегда стабильны и могут быть использованы только в стационарных условиях или в специально оборудованных передвижных лабораториях.

Но главный недостаток состоит в том, что результатом такого анализа является количественная оценка только отдельных видов загрязнителей и без учета их взаимодействия и присутствия других поллютантов. То есть интегральная количественная оценка загрязнения окружающей среды отсутствует.

Известен способ определения ингибиторов биологической активности [2]. Этот способ включает обработку анализируемой пробы смесью, содержащей ферменты - люциферазу и ФМН-оксидоредуктазу и их субстраты с последующим измерением времени достижения максимума хемилюминесценции. Сущность известного технического решения состоит в том, что ингибиторы биологической активности увеличивают время достижения максимума хемилюминесценции, зависящее от содержания ингибитора в пробе. Содержание ингибитора (поллютанта) может быть определено с помощью предварительно построенного калибровочного графика. Однако известный способ включает сложные аналитические процедуры. В частности, для суспендирования труднорастворимого субстрата необходима обработка реакционной смеси ультразвуком, а для ее оксигенации - барботирование

воздухом. Для определения содержания ингибиторов в образце необходимо предварительное исследование кинетики реакции хемилюминесценции в отсутствие и в присутствии различных концентраций ингибитора, что усложняет определение и последующий расчет концентрации вещества. Помимо этого, известный способ

известен способ хемилюминесцентного определения содержания этанола в биологическом материале [3]. Содержание этанола в воздухе после его барботирования через воду определяют с помощью двуферментной системы пероксидаза - алкоголь-оксидаза и люминола. Расчеты производят на основании предварительных калибровочных экспериментов. В композиции тест-системы используются кристаллические высоко очищенные препараты ферментов. Способ отличается простотой, высокой чувствительностью и стабильностью. Однако он ограничен, избирательно применим для количественной оценки содержания только одного вещества - этанола. По аналогичному принципу устроены другие тест-системы для определения отдельных поллютантов или отдельных групп близкородственных поллютантов в окружающей среде.

Известен способ биотестирования токсичности воздушной среды, наиболее близкий по техническому решению задачи количественного определения интегральной загрязненности, выбранный в качестве прототипа [4].

Сущность известного способа заключается в том, что оценивают эффект различных веществ на зимозан-стимулированную люминол-зависимую билюминесценцию лейкоцитов из донорской крови. Тест-объект инкубируют в физиологически уравновешенной среде с водорастворимыми токсикантами воздушной среды, баботированной через физиологический раствор в стандартных условиях. Токсичность воздушной среды определяют по уменьшению максимума билюминесценции по сравнению с контролем, не содержащим токсикантов. Известный способ осуществляется следующим образом. Лейкоциты периферической крови человека выделяют по стандартной схеме. Инкубационная среда для определения токсичности исследуемого образца содержит 50-100 мкл взвеси лейкоцитов в растворе Хенкса с цитратом натрия и глюкозой (конечная концентрация 1%) и люминол в конечной концентрации 1×10^{-5} М. Билюминесценцию клеток вызывают добавлением 100 мкл суспензии опсонизированного зимозана (1 мг/мл). Конечный объем пробы 1 мл, температура 37°C . Контрольная и опытная пробы содержат физиологический раствор или материал исследуемого образца соответственно. Пробы переносят в кюветодержатель хемилюминометра и измеряют интенсивность билюминесценции клеток, регистрируя показания прибора каждые 10 с. Максимум билюминесценции достигается обычно через 15-20 мин. Величину максимума билюминесценции в контрольной пробе принимают за 100%, а интенсивность билюминесценции в опытных пробах выражают в процентах относительно максимума билюминесценции в контрольной пробе. Найденные величины используют при расчете токсичности исследуемого образца. За условную единицу токсичности принимают такое количество водорастворенных токсикантов воздушной среды, которое вызывает 50% ингибирование билюминесценции клеток. При определении токсичности исследуемого образца строят полулогарифмический график зависимости интенсивности билюминесценции (% от контроля) от логарифма объема внесенного в аналитическую систему раствора токсикантов исследуемой среды. По графику определяют объем раствора токсикантов, вызывающий 50%

ингибирование биолюминесценции.

Недостатками известного способа является то, что для его осуществления требуется свежая донорская кровь, не подлежащая длительному хранению, а также необходимость выполнения дополнительной процедуры по получению лейкоцитарной фракции. Кроме того, возможны колебания чувствительности и нестабильность количественных оценок при изменении функционального состояния клеток (повреждение клеток) и это обстоятельство требует принятия специальных мер для поддержания их в интактном состоянии. Но главное, что барьеры в виде клеточных и внутриклеточных мембран заведомо снижают возможность взаимодействия тест-объекта с анализируемым образцом и тем самым понижают чувствительность системы. Известный способ достаточно дорог, неудобен и не пригоден для использования в полевых условиях.

Технический результат заявляемого способа заключается в оптимизации способа определения загрязненности образца воды или водного экстракта, позволяющей за счет использования простой, стабильной и дешевой тест-системы быстро и количественно оценивать интегральную загрязненность среды; повышении чувствительности способа, позволяющей определять присутствие в анализируемых образцах низких концентраций веществ-загрязнителей, а также в возможности количественной оценки за счет использования интегральной загрязненности среды.

Указанный технический результат достигается тем, что известном способе интегральной экспресс-оценки, заключающемся в инкубации водорастворенных поллютантов с биологической тест-системой и оценке степени вызываемого ими снижения величины максимальной люминол-зависимой хемилюминесценции по сравнению с контролем в соответствии с предлагаемым изобретением в качестве тест-системы используют комплексный полиферментный препарат из корня хрена, обладающий оксидазно-пероксидазной активностью, в комбинации с сульфгидрильным реагентом.

Кроме того, указанный технический результат достигается тем, что сульфгидрильный реагент берут в конечной концентрации не менее 0,1 мкг/мл и не более 100 мкг/мл.

Комплексный полиферментный препарат, обладающий оксидазно-пероксидазной активностью, представляет собой обессоленный и лиофилизированный препарат белков из корня хрена с показателем $RZ=0,2-2,0$.

Поскольку биохимические фирмы в коммерческих целях из корня хрена производят только один целевой ферментный продукт - пероксидазу хрена разной степени чистоты с показателями RZ до 3,0 и выше, то для практического выполнения предлагаемого способа в качестве полиферментного препарата можно использовать в том числе и коммерческие препараты пероксидаз хрена с показателями RZ не более 2,0.

Показатель RZ характеризует степень чистоты препарата пероксидазы и определяется как соотношение A_{403}/A_{275} . При длине волны 403 нм поглощает протетическая порфириновая группа фермента, при длине волны 275 нм - белок-апофермент и другие белки, присутствующие в препаратах пероксидазы. RZ кристаллических препаратов пероксидаз хрена соответствует значению 3,0 и выше, что хорошо известно, например, из каталогов любых фирм, производящих ферментные препараты. Именно такие высоко очищенные препараты пероксидаз в композиции с другими высоко очищенными ферментами применяются для анализа отдельных поллютантов в окружающей среде.

Используемый в предлагаемом изобретении полиферментный препарат из корня хрена является открытой многомишеневой тест-системой и эффективно реагирует на присутствие разнообразных поллютантов. Если в контрольной пробе добавление к ферментной системе субстрата-флуорогена вызывает световую эмиссию, то введение поллютантов уменьшает свечение либо путем ингибирования активности самого фермента, либо путем взаимодействия с промежуточными продуктами ферментативной реакции, либо выступая в качестве квазисубстрата, лишенного способности сообщать ферментной системе возможность генерировать кванты света. То, каким путем осуществится ингибирование, определяется конкретной химической природой каждого поллютанта и их композицией.

Исходя из представлений о сходстве механизма действия растительных пероксидаз и оксидаз из разных источников, а также растительных оксидаз и пероксидаз, полученных генно-инженерным путем (рекомбинантные белки), можно предположить, что все они с различной степенью эффективности могут быть использованы для реализации предлагаемого способа.

В соответствии с предлагаемым изобретением в среду инкубации при проведении анализа добавляют также сульфгидрильный реагент. В качестве сульфгидрильного реагента может быть использован дитиотрейтол, глутатион или другой SH-реагент. Добавление сульфгидрильного реагента к полиферментной системе резко повышает ее чувствительность по отношению к различным поллютантам. Сульфгидрильный реагент действует двояким образом: он является одновременно и субстратом окисления в цепи оксидазно-пероксидазных реакций, и стабилизатором активности полиферментной системы.

Являясь субстратом окисления для полиферментной оксидазно-пероксидазной системы, сульфгидрильный реагент запускает цепь реакций, результатом действия которой является световая эмиссия, регистрируемая методом хемилуминометрии. В присутствии и в отсутствие сульфгидрильного реагента уровень регистрируемой световой эмиссии различается на несколько порядков.

Кроме того, сульфгидрильный реагент стабилизирует полиферментную систему в целом, не давая окисляться функционально активным SH-группам белков (именно в таком качестве обычно и используются сульфгидрильные реагенты).

В соответствии с теорией ферментативного катализа для успешной реализации любого способа, основанного на применении ферментных систем, определяющим моментом является выбор оптимальной концентрации субстрата реакции с учетом конкретных условий выполнения анализа. При этом диапазон варьирования концентрации субстрата может быть весьма велик. В предлагаемом способе использование низких концентраций сульфгидрильного реагента приводит к тому, что субстрат расходуется слишком быстро и время достижения максимума хемилуминесценции слишком мало (от нескольких секунд до 1 мин), вследствие чего ошибка измерений возрастает в несколько раз, а в предельном варианте момент достижения максимума хемилуминесценции вообще не удается установить. Если же концентрация сульфгидрильного реагента слишком велика, то велика и интенсивность светового потока, на фоне которого трудно уловить изменения, вызванные присутствием незначительных количеств веществ-загрязнителей, что также снижает чувствительность предлагаемого способа.

При реализации предлагаемого способа стабильные результаты анализа получаются при использовании сульфгидрильного реагента в конечной концентрации не менее 0,1 мкг/мл и не более 100 мкг в мл инкубационной среды. При

таким размахом варьирования концентраций субстрата экспериментальная ошибка составляет не более 10%.

В целом же предлагаемая тест-система устойчиво работает в широком диапазоне концентраций реагентов, входящих в реакционную смесь, и широком диапазоне pH инкубационной среды и температуры (область положительных значений температур вплоть до +40°C и выше, что позволяет использовать тест-систему в полевых условиях разных географических широт).

При длительном хранении тест-системы возможны незначительные колебания ферментативной активности, однако они не сказываются на конечных оценках, поскольку загрязненность среды определяют не в абсолютных, а в относительных единицах. Выбор конкретных условий проведения анализа определяется особенностями физической и химической природы исследуемого образца.

Способ осуществляется следующим образом. В измерительную кювету люминометра вносят либо 0,6 мл дистиллированной воды (контрольная проба), либо 0,6 мл исследуемого образца, смешанного в различных соотношениях с дистиллированной водой (опытная проба). Затем в кювету добавляют реакционную смесь, содержащую комплексный полиферментный препарат из корня хрена с показателем $RZ=0,2-2,0$ в конечной концентрации 0,1-10 мкг/мл, а также дитиотрейтол 0,1-100 мкг/мл (или глутатион 1-100 мкг/мл), люминол в концентрации $10^{-6}-10^{-4}$ М, растворенные в 0,02-0,2 М глициновом буфере, pH 7,0-10,0. Конечный объем пробы 1,0 мл.

Измерения проводят в течение нескольких минут при температуре окружающей среды. Занесенные в таблицу результаты определения светосуммы хемилюминесценции в контрольной и нескольких опытных пробах служат основой для расчета интегральной загрязненности исследуемого образца, выражаемой в условных единицах.

За условную единицу загрязненности принимают такое количество вещества-загрязнителя (загрязнителей), которое вызывает 50%-ное гашение хемилюминесценции относительно контроля. Загрязненность образца выражают количеством условных единиц загрязненности, содержащихся в 1 единице объема образца.

Для количественной оценки загрязненности используют метод линейной регрессии, поскольку зависимость относительной светосуммы хемилюминесценции опытных проб, выраженной в процентах от контроля (Y), от логарифма объема образца (X), хорошо описывается уравнением вида $(Y=a+bX)$ в пределах варьирования Y от 10% до 90%. Коэффициент детерминации модели R^2 , характеризующий долю объясненной моделью дисперсии, близок к 1,0, уровень значимости модели $p \leq 0,05$. По найденным параметрам уравнения регрессии рассчитывают уровень интегральной загрязненности в условных единицах на 1 единицу объема образца. Расчет можно производить в автоматическом режиме.

Примеры конкретной реализации приведены ниже. В примерах 1-3 приведены результаты исследований загрязненности воды проводились в проточном городском водоеме Санкт-Петербурга.

Пример 1

Технология интегральной экспресс-оценки осуществлялась следующим образом. В измерительную кювету люминометра вносили либо 0,6 мл дистиллированной воды (в качестве контрольной пробы), либо 0,6 мл исследуемого образца исходной воды, смешанного в различных соотношениях с дистиллированной водой (в качестве

опытной пробы). Затем в кювету добавляли реакционную смесь, содержащую препарат пероксидазы хрена производства фирмы "Sigma" (США) с показателем $RZ=1$ в количестве 1 мкг/мл, дитиотрейтол в концентрации 5 мкг/мл, люминол в концентрации 10^{-5} М, растворенные в 0,1 М глициновом буфере, pH 8,5. Конечный объем пробы 1,0 мл. Измерения проводили при комнатной температуре $+22^{\circ}\text{C}$ в течение 3 минут.

Результаты определения светосумм хемилюминесценции в контрольной и 5 опытных пробах приведены в таблице (раздел «А»).

Расчеты выполнены методом линейной регрессии.

Полулогарифмический график зависимости относительной светосуммы, выраженной в процентах, от логарифма объема образца в пробах, построенный по данным таблицы (раздел «А»), представлен на чертеже. Тонкой сплошной линией на чертеже указаны 95% доверительные интервалы для линии регрессии (внутренний коридор), пунктиром - 95% доверительные интервалы для отдельных экспериментальных точек (наружный коридор). По оси X: логарифм объема образца пробы; по оси Y: относительная светосумма хемилюминесценции (% от контроля). Коэффициент детерминации модели $R^2=0,999$, уровень значимости модели $p<0,01$.

Логарифм объема образца, вызвавшего 50% гашение хемилюминесценции, равен 1,76, а сам объем составил 57,6 мкл. Следовательно, определенная расчетным способом загрязненность воды городского водоема равнялась 17,4 усл.ед/мл (в сравнении, например, в среднем по районам города с водопроводной водой 3-4 усл.ед/мл). В примере 1 приведена оптимальная концентрация дитиотрейтол 5 мкг/мл.

Пример 2

Технология интегральной экспресс-оценки осуществлялась следующим образом. В измерительную кювету люминометра вносили либо 0,6 мл дистиллированной воды (контрольная проба), либо 0,6 мл исследуемого образца воды, смешанного в различных соотношениях с дистиллированной водой (опытная проба). Затем в кювету добавляли реакционную смесь, содержащую препарат пероксидазы хрена производства фирмы "Sigma" (США) с показателем $RZ=1$ в количестве 1 мкг/мл, дитиотрейтол в концентрации 0,1 мкг/мл, люминол в концентрации 10^{-5} М, растворенные в 0,1 М глициновом буфере, pH 8,5. Конечный объем пробы 1,0 мл. Измерения проводили при комнатной температуре $+22^{\circ}\text{C}$ в течение 3 минут.

Результаты определения светосумм хемилюминесценции в контрольной и 5 опытных пробах приведены в таблице (раздел «А»).

Расчеты выполнены методом линейной регрессии.

Логарифм объема образца, вызвавшего 50% гашение хемилюминесценции, равен 1,71, а сам объем составил 51,3 мкл. Следовательно, определенная расчетным способом загрязненность воды городского водоема равнялась 19,5 усл.ед/мл. В примере 2 приведена минимальная концентрация дитиотрейтол 0,1 мкг/мл.

Пример 3

Технология интегральной экспресс-оценки осуществлялась следующим образом. В измерительную кювету люминометра вносили либо 0,6 мл дистиллированной воды (контрольная проба), либо 0,6 мл исследуемого образца воды, смешанного в различных соотношениях с дистиллированной водой (опытная проба). Затем в кювету добавляли реакционную смесь, содержащую препарат пероксидазы хрена производства фирмы "Sigma" (США) с показателем $RZ=1$ в количестве 1 мкг/мл, дитиотрейтол в концентрации 100 мкг/мл, люминол в концентрации 10^{-5} М, растворенные в 0,1 М глициновом буфере, pH 8,5. Конечный объем пробы 1,0 мл.

Измерения проводили при комнатной температуре +22°C в течение 3 минут.

Результаты определения светосумм хемиллюминесценции в контрольной и 5 опытных пробах приведены в таблице (раздел «А»).

Расчеты выполнены методом линейной регрессии.

5 Логарифм объема образца, вызвавшего 50% гашение хемиллюминесценции, равен 1,8, а сам объем составил 63,1 мкл. Следовательно, определенная расчетным
10 способом загрязненность воды городского водоема равнялась 15,9 усл.ед/мл. В примере 3 приведена минимальная концентрация дитиотрейтол в концентрации 100 мкг/мл.

Пример 4

Заявленная технология была апробирована на уровень интегральной
загрязненности воздуха выхлопными газами двигателя внутреннего сгорания (пробы
воздуха брались в разных районах Санкт-Петербурга).

15 Подготовку пробы проводили по стандартной методике путем барботаж
загрязненного воздуха через дистиллированную воду и исследовали влияние
полученного раствора, содержащего водорастворимые компоненты газа, на
хемиллюминесценцию.

20 Апробирование проводилось следующим образом. В контрольную пробу
вносили 0,6 мл дистиллированной воды и помещали в измерительную кювету
люминометра. В опытные пробы вносили 250, 375 или 500 мкл образца воды,
содержащего водорастворимые компоненты газа, и дистиллированной водой
доводили объем до 0,6 мл.

25 Затем в кювету добавляли реакционную смесь, содержащую препарат
пероксидазы хрена производства фирмы "Sigma" (США) с показателем RZ=1 в
количестве 1 мкг/мл, дитиотрейтол в концентрации 5 мкг/мл, люминол в
концентрации 10^{-5} М, растворенные в 0,1 М глициновом буфере, pH 8,5. Конечный
30 объем пробы 1,0 мл. Измерения проводили при комнатной температуре +22°C в
течение 3 минут.

Результаты определения светосумм хемиллюминесценции в контрольной и 3
опытных пробах приведены в разделе «Б» таблицы.

35 Расчеты, выполненные методом линейной регрессии, показали, что коэффициент
детерминации модели $R^2=0,999$, уровень значимости модели $p<0,05$. Логарифм
объема образца воды, вызвавшего 50% гашение люминесценции, был равен 2,58, а
сам объем составил 380 мкл. Следовательно, интегральная загрязненность
исследуемого образца воды оказалась равной 2,7 усл.ед/мл. В пересчете на 1 л
40 загазованного воздуха интегральная загрязненность составила 0,9 усл.ед., что
характеризует состояние загрязненности воздушной среды современного
мегаполиса.

Пример 5

45 Исследовали уровень интегральной загрязненности, создаваемой
водорастворимыми компонентами сырой нефти.

Подготовку исследуемого образца производили, смешивая 1 мл нефти с 9 мл
дистиллированной воды. Смесь встряхивали на шейкере, фильтровали и из водной
фазы отбирали аликвоты для анализа.

50 Апробацию заявленной технологии осуществляли следующим образом. В
контрольную пробу вносили 0,6 мл дистиллированной воды и помещали в
измерительную кювету люминометра. В опытные пробы вносили соответственно 30,
50, 80 или 100 мкл загрязненного нефтью образца воды и дистиллированной водой

доводили объем до 0,6 мл, после чего в кювету добавляли реакционную смесь, содержащую препарат пероксидазы хрена производства фирмы "Sigma" (США) с показателем $RZ=1$ в количестве 1 мкг/мл, дитиотрейтол в концентрации 5 мкг/мл, люминол в концентрации 10^{-5} М, растворенные в 0,1 М глициновом буфере, pH 8,5. Конечный объем пробы 1,0 мл. Измерения проводили при комнатной температуре $+22^{\circ}\text{C}$ в течение 3 минут.

Результаты определения светосумм хемилюминесценции в контрольной и 4 опытных пробах представлены в разделе «В» таблицы.

Расчеты, выполненные методом линейной регрессии, показали, что коэффициент детерминации модели $R^2=0,971$, уровень значимости модели $p<0,05$.

Логарифм объема образца, вызвавшего 50% гашение люминесценции, был равен 1,86, а сам объем образца составил 72 мкл. Следовательно, интегральная загрязненность, создаваемая водорастворимыми компонентами 1 мл сырой нефти, соответствует 138 усл.ед., что характеризует высокую загрязненность исследуемой пробы.

Одним из значимых преимуществ заявляемого способа по сравнению с известными аналогами является невысокая его стоимость как реализации, так и в обслуживании, поскольку для этого не требуется уникальное и дорогостоящее оборудование, а также длительные по времени и трудоемкие операции. Действительно, процедура интегральной экспресс-оценки загрязнения окружающей среды состоит лишь в смешивании анализируемой пробы жидкости с ферментной тест-системой в комбинации с сульфгидрильным реагентом и последующем краткосрочном (в течение нескольких минут) определении светосуммы фотохимической реакции. Для получения конечной оценки интегральной загрязненности среды достаточно определить три - четыре величины светосуммы, измеренные при различных концентрациях исследуемого образца, и светосумму контроля.

Технический результат заявленного изобретения заключается в повышении чувствительности способа за счет определения в анализируемых образцах низких концентраций веществ-загрязнителей, в возможности интегральной и количественной оценки загрязненности объектов окружающей среды, что позволяет считать заявленный способ перспективным для первичного и оперативного контроля состояния окружающей среды. Кроме того, в силу его простоты в обслуживании заявленный способ может применяться в любых полевых условиях, поскольку измерения исследуемых проб и расчеты могут проводиться в автоматическом режиме с помощью портативного хемилюминометра.

Используемые источники информации

1. Казарян И.Г. и др. Журнал «Успехи биологической химии», т.46, 2006, с.303-322.
2. Кратасюк В.А. и др., А.с. №865904, 1981.
3. Васильев В.Ю., Агеева О.Г., Патент РФ №2063035, 1996.
4. Васильев В.Ю., Калацкий Ю.М., Патент РФ №2063630, 07.10.1996 (прототип).

Экспериментальные данные, используемые для расчета интегральной загрязненности среды.

№ пробы	Содержание материала образца в пробе (мкл)	X Логарифм содержания материала образца в пробе ($\lg V$)	Абсолютная светосумма хемилюминесценции ($\text{имп} \times 10^6$)	Y Относительная светосумма хемилюминесценции (% от контроля)
1	2	3	4	5
А. Определение загрязненности воды в городском водоеме				

Пример 1				
Контроль	-	-	28,2	100
1	250	2,40	5,4	19
2	150	2,18	8,0	28
3	100	2,00	11,0	39
4	30	1,48	17,8	63
5	15	1,18	22,0	78
Пример 2				
Контроль	-	-	1,37	100
1	250	2,40	0,22	16
2	150	2,18	0,40	29
3	100	2,00	0,52	38
4	30	1,48	0,80	58
5	15	1,18	1,04	76
Пример 3				
Контроль	-	-	436,0	100
1	250	2,40	56,7	13
2	150	2,18	130,8	30
3	100	2,00	165,7	38
4	30	1,48	300,8	69
5	15	1,18	379,3	87
Б. Определение загрязненности воды выхлопными газами				
Пример 4				
Контроль	-	-	28,8	100
1	500	2,70	9,7	34
2	375	2,57	14,7	51
3	250	2,40	21,9	76
В. Определение загрязненности воды нефтью				
Пример 5				
Контроль	-	-	26,4	100
1	30	1,48	18,0	68
2	50	1,70	16,2	61
3	80	1,90	12,6	48
4	100	2,00	10,8	41

Формула изобретения

1. Способ интегральной экспресс-оценки загрязнения окружающей среды, заключающийся в инкубации водорастворенных поллютантов с биологической тест-системой и количественной их оценке по вызываемому ими 50%-му снижению величины максимальной люминолзависимой хемилюминесценции по сравнению с контролем, отличающийся тем, что в качестве тест-системы используют комплексный полиферментный препарат из корня хрена, обладающий оксидазно-пероксидазной активностью, в комбинации с сульфгидрильным реагентом, который берут в конечной концентрации не менее 0,1 мкг/мл и не более 100 мкг/мл.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что обессоленный и лиофилизированный препарат белков из корня хрена берут с показателем $RZ=0,2\div 2,0$.

