

А.Н.Спицын, Н.А.Осина, В.Г.Германчук, Д.В.Уткин, И.Н.Шарова, В.Е.Куклев, С.А.Портенко

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В обзоре представлен анализ современных методов и средств проведения неспецифической индикации патогенных биологических агентов в объектах окружающей среды. Рассмотрены технологические особенности применения этих методов, направленных на выявление в пробах биологических веществ белковой природы. В группе средств неспецифического обнаружения ПБА представлены отечественные и зарубежные полевые устройства, основанные на выявлении белкового загрязнения с помощью различных вариантов колориметрии. Из технологий, применяемых для дистанционного и недистанционного мониторинга состояния окружающей среды на наличие аэрозолей биологической природы, представлены гибридные лидарные системы (биолидары) и биодетекторы. Для детекции нуклеиновых кислот ПБА рассмотрены комплексы, основанные на связывании молекул ДНК с флуорофорами с последующей детекцией флуоресценции. Приведены примеры использования технологий хемилюминесцентного анализа в разработанных автоматических сигнализаторах примесей, а также показаны примеры систем с применением биолюминесценции. На основании анализа литературных данных представлен возможный алгоритм индикации патогенных биологических агентов при осуществлении мониторинга состояния окружающей среды в зонах возможного возникновения чрезвычайных ситуаций и при проведении массовых мероприятий.

Ключевые слова: неспецифическая индикация, патогенные биологические агенты, колориметрия, флуоресценция, хемилюминесценция, биолюминесценция, биодетекторы.

Корреспондирующий автор: Спицын Алексей Николаевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.N.Spitsyn, N.A.Osina, V.G.Germanchuk, D.V.Utkin, I.N.Sharova, V.E.Kuklev, S.A.Portenko

Non-Specific Indication of Microorganisms in Environmental Samples

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

The review presents an analysis of modern methods and instruments for performing nonspecific detection of pathogenic biological agents in environmental objects. Discussed are technological characteristics of application of these methods for the detection of biological substances of protein nature in samples. The spectrum of means for non-specific PBA detection includes home-produced and foreign field devices based on protein contamination indication using various colorimetry variants. Technologies for remote and direct monitoring of environment for the presence of aerosols of biological nature are represented by hybrid lidar systems (biolidars) and biodetectors. For PBA nucleic acids tracing, the complexes based on DNA molecule binding with fluorophore with further fluorescence detection are described. Given are the examples of chemiluminescent analysis application in the developed automatic impurity detectors, as well as systems using bioluminescence. Based on the literature data analysis, put forward is a possible algorithm for indication of pathogenic biological agents when carrying out monitoring of the environment in zones of possible emergency situation occurrence and mass events holding.

Key words: nonspecific indication, pathogenic biological agents, colorimetry, fluorescence, chemiluminescence, bioluminescence, biodetectors.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksey N. Spitsyn, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Spitsyn A.N., Osina N.A., Germanchuk V.G., Utkin D.V., Sharova I.N., Kuklev V.E., Portenko S.A. Non-Specific Indication of Microorganisms in Environmental Samples. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 1:66–71. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-66-71

Угроза совершения актов биотерроризма с применением патогенных биологических агентов (ПБА) остается важной проблемой мирового сообщества [9, 12, 13, 29]. Одной из главных задач биомониторинга объектов окружающей среды в зонах возможного возникновения чрезвычайных ситуаций (ЧС), а также в местах проведения массовых мероприятий является обнаружение веществ белковой природы, что определяет необходимость разработки экспрессных методов индикации и создания на их основе современных технических средств для своевременного обеспечения санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий. Первоочередной зада-

чей в таких ситуациях является проведение неспецифической индикации с целью обнаружения факта применения ПБА в пробах без определения видовой принадлежности возбудителя. В данном обзоре нами представлен анализ современных методов и средств, а также состояние вопросов неспецифической индикации ПБА в объектах окружающей среды.

В настоящее время для неспецифической индикации микроорганизмов в объектах окружающей среды нашли применение методы, направленные на выявление биологических молекул, характерных для бактерий (белки и нуклеиновые кислоты), и определение ферментативной активности (рис. 1).

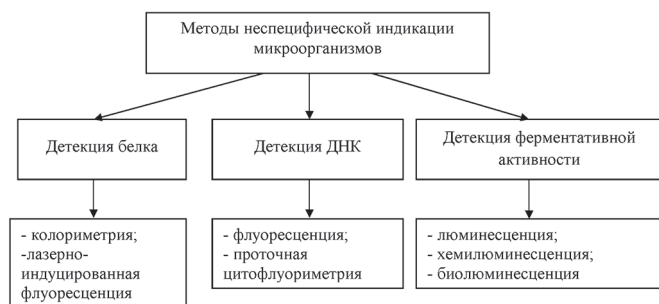


Рис. 1. Принципы и методы проведения неспецифической индикации

К средствам неспецифического обнаружения микроорганизмов по наличию белкового фона относят полевые переносные комплекты для определения спецпримесей в пробах (КСП-11) и комплекты средств для анализа проб (КСАП) из объектов окружающей среды (почва, растительность, вода, смывы с техники и т.п.), производство ФГУП «ГосНИИБП», РФ. Основной задачей использования комплектов является быстрое, в течение 10–15 мин, выявление в пробах веществ белковой природы и установление принадлежности микроорганизмов к вирусной, риккетсиозной и бактериальной (вегетативная форма) группам.

Обнаружение в пробах белковых веществ с использованием комплекта КСП-11 осуществляется по результатам проведения десяти параллельных тестов. В основу принципа действия данного комплекта положены капельный метод с использованием качественных колориметрических реакций и нефелометрический тест. Аналитический сигнал при этом регистрируется визуально, а положительный результат свидетельствует о наличии белка в исследуемой пробе. Время подготовки комплекта к работе составляет 15–20 мин, время анализа не превышает 3–5 мин при температуре окружающей среды от 15 до 35 °С и относительной влажности от 45 до 75 %. Запас реактивов в комплекте КСП-11 обеспечивает проведение анализа 50 проб.

Комплект КСАП предназначается для обнаружения и дифференциации биологических агентов (с отнесением обнаруживаемых микроорганизмов к вирусной, риккетсиозной и бактериальной (вегетативная форма) группам) в анализируемых пробах по комплексу характерных аналитических эффектов (развивающихся окрасок) в тестах. Тест-системы, входящие в состав КСАП, основаны на постановке капельных колориметрических реакций с использованием модифицированных подложек для хроматографического анализа. Время подготовки комплекта к работе не превышает 20 мин, время анализа одной пробы – не более 5 мин при температуре окружающей среды от -20 до 30 °С и относительной влажности от 45 до 90 %. Запас реактивов в комплекте обеспечивает проведение анализа 40 проб.

Среди зарубежных аналогов средств неспецифической индикации, основанных на выявлении белка с помощью колориметрического метода ана-

лиза, можно выделить тест-набор The Indipro Test Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Германия), предназначенный для контроля обсемененности поверхностей и инструментов предприятий пищевой промышленности и исследования подозрительных порошков, а также тест-набор The BioCheck® Powder Screening Kits (20/20 GeneSystems Inc., США), применяемый для определения белка в нативных пробах (кроме проб почвы).

Стандартный протокол проведения анализа с помощью The Indipro Test Kit включает смачивание тест-полоски раствором «indipro-1» с последующим нанесением смыва с исследуемой поверхности, затем тест-полоска обрабатывается путем прямого нанесения одной капли раствора «indipro-2». Изменение цвета от желтого до зеленого свидетельствует о присутствии белка в пробе. При проведении анализа с использованием The BioCheck® Powder Screening Kit образец отбирается тампоном, помещается в пробирку, содержащую тестовый раствор, и инкубируется в течение 5 мин. При содержании в исследуемой пробе белка, жидкость в пробирке становится синей. В случае получения отрицательного результата проводят дополнительный анализ, для чего контрольный тампон помещают в тестовую пробирку и, если набор работает верно, раствор в ней становится синим. Положительная детекция белка дает предварительный ответ о присутствии в пробе биологического агента или токсина.

Для дистанционного мониторинга загрязнений окружающей среды аэрозолями, содержащими вещества белковой природы, разработаны гибридные лидарные системы (биолидары), основанные на комплексном применении методов активной и пассивной лазерной локации и регистрации изменения электромагнитного излучения при наличии в воздухе бактериальных клеток [14, 15]. Примером гибридного лидара является многоволновой лидарный комплекс (МЛК) (ООО «НПП «Лазерные системы», РФ), дистанционно зондирующий атмосферу в диапазоне длин волн от ближнего ультрафиолетового (266 нм) до дальнего инфракрасного (11 мкм). Рабочая высота лидарного зондирования МЛК равна 15 км [1].

В ультрафиолетовом флуоресцентно-аэрозольном лидаре «ФАРАН-М1» (Институт оптики атмосферы СО РАН, РФ) использована схема одновременного наблюдения лидарных сигналов упругого рассеяния и флуоресценции при облучении среды на лазерных длинах волн 1064 и 266 нм соответственно. Сигнал в ИК-канале формируется аэрозолями любой природы, а в УФ-канале – только биогенными аэрозолями, что позволяет лидару «ФАРАН-М1» детектировать аэрозоли биогенного происхождения в полевых условиях на фоне аэрозолей другой природы. Дальность действия УФ-канала лидара по биогенным аэрозолям достигает 4 км, ИК-канала по облакам – превышает 50 км [8].

К недистанционным средствам обнаружения биоаэрозолей относят ультрафиолетовый аэродина-

мический анализатор частиц различных размеров – спектрометр UV-APS™ (TSI Inc., США), способный измерять аэродинамический диаметр частиц с помощью двух гелий-неоновых лазеров с длиной волны 633 нм частиц в режиме реального времени. Биологическая природа частиц устанавливается путем измерения эмиссионного флуоресцентного излучения в диапазоне 420–575 нм, возбуждаемого импульсным ультрафиолетовым лазером на длине волны 355 нм [22]. Прибор позволяет определять характеристики частиц в диапазоне размеров от 0,5 до 15 мкм.

Данный принцип реализован при разработке биодетекторов FLAPS™-III (TSI Inc., США), IBAC™ (FLIR Systems Inc., США), Vero Tect (BIRAL, Великобритания) [25]. Флуоресцентная сенсорная система анализа аэрозольных частиц (FLAPS-III)™ модели 3317 измеряет интенсивность рассеянного света, интенсивность флуоресцентного эмиссионного излучения на двух разных длинах волн (580 и 430 нм) для аэрозольных частиц размером от 0,8 до 10 мкм, позволяя дифференцировать биологические частицы от небактериальных в реальном времени за несколько секунд [23]. Сигналы флуоресценции и рассеяния света возбуждаются лазерным диодом на длине волны 405 нм.

Детектор IBAC предназначен для непрерывного мониторинга состояния воздуха в режиме реального времени и использует индуцированную лазером на длине волны 405 нм УФ-флуоресценцию, что позволяет определять наличие в воздухе биологических веществ среди фоновых частиц [26]. Апробированная в Vero Tect-биодетекторе технология Biral ASAS™ (Aerosol Size And Shape) позволяет измерять форму, размер, общую концентрацию частиц и возбуждаемое флуоресцентное излучение на длине волны 280 нм с помощью двух каналов в диапазоне 330–650 нм и 420–650 нм.

Важно отметить, что наличие в воздухе аэрозолей, содержащих белковые контаминанты немикробной природы (ароматические углеводороды, пыльцу растений, споры грибов), может приводить к ложноположительным результатам. Для исключения подобных ложных ответов и выявления только клеток микроорганизмов нашел применение метод спектроскопии в видимом диапазоне, основанный на определении маркера метаболической активности живых клеток – никотинамидадениндинуклеотида (НАД) [24, 32]. Однако, данный метод не позволяет обнаружить споры бактерий и токсины биологического происхождения, не обладающие метаболической активностью. Для решения данной проблемы используется многоволновая спектроскопия в УФ, видимом и ближнем ИК диапазоне (UV-VIS-NIR спектроскопия), которая регистрирует наличие как белковых молекул в УФ диапазоне, так и маркеров метаболической активности (НАД, рибофлавина) в видимом диапазоне и рассеяния в ИК диапазоне [21, 27].

Для определения ДНК возбудителей разработаны тесты, основанные на связывании молекул ДНК с флуоресцентным красителем и определении флуоресценции с помощью флуориметра в течение 5–10 мин. Флуориметрический метод заключается в возбуждении электронов в молекулах определяемого вещества при внешнем УФ-облучении и измерении интенсивности их фотолюминесценции [19]. Для выполнения данного анализа предложен комплект The Prime Alert® (GenPrime Inc., США) [28]. Помимо детекции бактериальной ДНК на этапе неспецифической индикации с помощью этого набора возможно определение токсинов: рицина, ботулотоксина А, стафилококкового энтеротоксина В (SEB) в одном картридже с помощью иммунохроматографии [4].

Одним из явлений, сопровождающих химические реакции в биологических системах, является хемилюминесценция (ХЛ), которая заключается в эмиссии электромагнитного излучения в диапазоне видимого света [11]. Поскольку собственное свечение биологической пробы обладает низкой интенсивностью, то для его усиления используются химические активаторы ХЛ [2]. Эти соединения вступают в химические реакции с активными формами кислорода или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы, находящиеся в нестабильном возбужденном электронном состоянии. При переходе их в обычное состояние происходит выброс фотонов и свечение. Химические активаторы ХЛ, нашедшие наибольшее применение в аналитической практике – люминол, люцигетин, лафин и силаксен [17]. Существуют также физические активаторы ХЛ, которые, не вступая в химические реакции и не оказывая влияния на их ход, способны многократно усиливать интенсивность ХЛ [3]. В основе их действия лежит физический процесс переноса энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор. Самым эффективным физическим активатором ХЛ является производное кумарина С-525, способное усиливать свечение более чем в 1500 раз при добавлении к системе, где происходит реакция липидной пероксидации [3, 31].

На основе хемилюминесцентного люминольного метода анализа отечественными специалистами разработан автоматический сигнализатор примесей (АСП) (ФГУП «ГосНИИБП», РФ), предназначенный для обнаружения биологических средств в аэрозольном состоянии [6]. Наличие биоаэрозоля в приземном слое атмосферы устанавливается в случае превышения амплитуды аналитического сигнала, регистрируемого фотоэлектронным умножителем в процессе протекания хемилюминесцентной люминольной реакции, катализируемой аэрозольными частицами, обладающими пероксидазной активностью. К недостаткам сигнализатора АСП относятся ограниченный спектр обнаруживаемых биоаэрозолей из-за низкого уровня пероксидазной активности или ее отсутствия у ряда биологических агентов (БА), ухудшение порога чувствительности при об-

нарушении биоаэрозоля в запыленной атмосфере, а также большой расход индикаторных средств (для непрерывной работы в течение 1 сут требуется 4 л индикаторного реактива).

Люминесцентный анализ успешно применен при разработке автоматических сигнализаторов АСП-11, АСП-12 (ФГУП «ГосНИИБП», РФ). Принцип индикации на основе регистрации собственной люминесценции аэрозоля получил применение при разработке сигнализатора АСП-11, а в приборе АСП-12 реализован люминесцентно-цитохимический метод анализа.

В последней модификации прибора АСП-13 использован проточно-аэрозольно-цитохимический способ установления условной групповой принадлежности микроорганизмов (разделение на бактерии, отдельно вегетативная и споровая формы, риккетсии, вирусы, бактериальные токсины) за счет определения белков, ЛПС и нуклеиновых кислот путем внесения в аликвоты пробы люминесцентных маркеров, специфичных для каждой группы компонентов, последующим их диспергированием до аэрозоля и определения оптических параметров образовавшихся частиц. Для связывания с белком предложено использовать 1,8-анилино-нафталиносulfонат (1,8 АНС), с ЛПС – 2-[2-(4-этоксифенил)-6-бензимидазоил]-6-(4-метил-1-пиперазинил)-бензимидазол (бисбензimid Н 33342), с нуклеиновыми кислотами – 4-фенилпиро-(фуран-2,1'-фталан)-3,3'-дион (флуорескамин, ФСК), а сканирование аэрозольных частиц осуществлять до набора статистически значимого количества откликов, позволяющего рассчитать параметры эллипса рассеяния с достоверностью не менее 0,95 (координаты центра рассеяния совокупности зарегистрированных откликов частиц m_x и m_y , средние значения большой и малой осей эллипса рассеяния b_x и b_y , а также угол ориентации большой оси эллипса рассеяния, относительно ординаты ϕ).

Одной из разновидностей хемилюминесцентной реакции является биолюминесценция [16]. Выделение световой энергии излучения при биолюминесценции происходит в результате окисления субстрата (люциферина) кислородом воздуха, катализируемого ферментами – люциферазой в присутствии внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) живых клеток. Интенсивность свечения регистрируется люминометром и выражается в относительных световых единицах – RLU (Relative Light Units). Образование АТФ характерно только для живых микробных клеток. Чем больше содержание бактерий в образце, тем выше интенсивность свечения за счет присутствия АТФ микроорганизмов. Следует отметить, что явление бактериальной люминесценции нашло широкое применение для экологического мониторинга воды открытых водоемов, сточных вод и проб почвы на наличие органических соединений, таких как фенол, бензол и др., а также солей тяжелых металлов. Для проведения исследований предложено использовать биолюми-

несцирующие бактерии. В случае наличия в пробе вредных веществ в течение 5–30 мин происходит гибель клеток и снижение уровня биолюминесценции, которое может быть измерено с помощью люминометра [5]. В системе Microtox® (AquaTox Research Inc., США) [20] и LUMISTox (Hach Company, США) [33] в качестве индикаторного микроорганизма выступают лиофилизированные клетки *Vibrio fischeri* в концентрации $1 \cdot 10^6$ м.к. Отечественными исследователями предложены «Микробиосенсор В17-677F» (Институт биофизики СО РАН, РФ) на основе морских светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum*, «Микробиосенсор ЕСК» на основе рекомбинантного штамма *Escherichia coli* Z905, несущего плазмиду с *lux*-опероном *Photobacterium leiognathi*, биосенсор «Эколюм-8» на основе рекомбинантного штамма *E. coli* TG1 с клонированным *lux*-опероном *Photobacterium luminescens* ZM1 [7, 10, 18]. Получен положительный опыт по использованию данных микроорганизмов и биосенсоров при тестировании проб воды в различных городах Российской Федерации и странах СНГ [16].

С целью возможности применения биолюминесценции для выявления жизнеспособных бактериальных клеток корпорацией New Horizons Diagnostics, Inc. (США) разработана система PROFILE®-1 [30]. Для проявления люминесценции в состав набора включен реагент люцеферин/люцефераза. Помимо этого, для устранения неспецифического свечения АТФ эукариотических клеток предусмотрен их лизис с последующим удалением путем фильтрации. Осуществление этапов концентрирования микробных клеток и удаления химических примесей предусмотрено с использованием «filtravette», представляющих собой комбинации фильтра и кюветы, а регистрации люминесцентного сигнала – с помощью биомикролюминометра [30].

На основании проведенного анализа методов и средств неспецифической индикации представляется перспективным следующий алгоритм индикации патогенных биологических агентов при проведении мониторинга состояния окружающей среды в зонах ЧС и в местах массовых мероприятий (рис. 2): 1 – обнаружение в пробе белка с помощью лидаров («Фаран-М1») и автоматизированных и ручных биодетекторов (UV-APS™, FLAPS™-III, IBAC™, Vero Tect, АСП, АСП-11, АСП-12, АСП-13, КСП-11, КСАП, The Indipro Test Kits, BioCheck®); 2 – подтверждение присутствия в пробе жизнеспособных форм микроорганизмов на основании определения ферментативной активности с помощью системы PROFILE-1®; 3 – направление проб, положительных по тесту ферментативной активности, для проведения последующей специфической индикации с целью определения родовой и видовой принадлежности ПБА.

Таким образом, в настоящее время предложен ряд методических приемов и средств для неспецифической индикации патогенных биологических

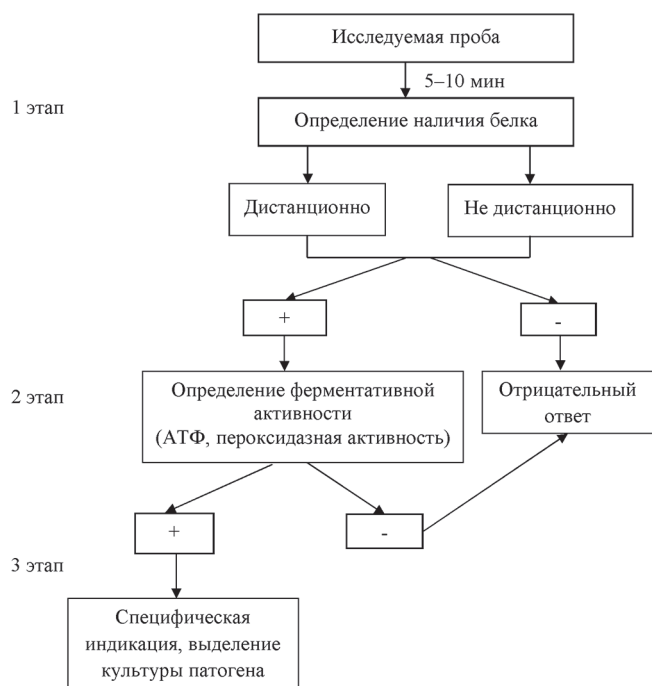


Рис. 2. Блок-схема алгоритма неспецифической индикации ПБА

агентов, которые, при комплексном использовании, позволят быстро определить факт наличия веществ белковой природы в пробах при мониторинге объектов окружающей среды в зонах возможного возникновения ЧС и в местах проведения массовых мероприятий и отобрать образцы для последующего осуществления специфической индикации патогенов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борейшо А.С., Коняев М.А., Морозов А.В., Пикулик А.В., Савин А.В., Трилис А.В., Чакчир С.Я., Бойко Н.И., Власов Ю.Н., Никитаев С.П., Рожнов А.В. Мобильные многоволновые лидарные комплексы. *Квантовая электроника*. 2005; 35(12):1167–78.
2. Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции. *Соросовский образоват. журн.* 1999; 6:25–32.
3. Владимиров Ю.А., Проскура Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биол. химии*. 2009; 49:341–88.
4. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Щербаклова С.А. Анализ современных методов и средств экспрессной индикации токсинов. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 2(112):51–4.
5. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г., Каримов И.Ф. Особенности использования тест-систем при исследовании абиотических сред и биологических жидкостей. *Вестник Оренбургского ГУ*. 2005; 5:101–4.
6. Злобин В.И., Евстигнеев В.И. Специфическая и неспецифическая индикация микроорганизмов в окружающей среде. *Вестн. РАМН*. 2002; 11:37–42.
7. Илларионов Б.А., Протопопова М.В. Клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 1987; 8:41–6.
8. Коханенко Г.П., Макогон М.М. Мобильный сканирующий флуоресцентно-аэрозольный лидар «Фаран-М1». *Фотоника*. 2010; 4:50–3.
9. Мальшев В.П. Состояние и перспективы развития способов и средств радиационной, химической и биологической защиты. *Стратегия гражданской защиты: пробл. и исслед.* 2013; 3(2):54–67.
10. Манухов И.В., Завильгельский Г.Б., Данилов В.С. Клонирование LuxAB-генов термостабильной люциферазы *Photobacterium luminescens* ZM1 в *Escherichia coli* K12. *Биотехнология*. 1999; 1: 40–3.

11. Образцов И.В., Годков М.А. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика. *Мол. мед.* 2013; 4:3–9.
12. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В., Иванов А.А., Киселев В.И., Нетесов С.В., Северин С.Е., Семенов Б.Ф., Сергиев В.П., Шелкунов С.П. Биологическая безопасность. М.: Медицина; 2006. 304 с.
13. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестн. РАН*. 2003; 73(3):195–204.
14. Палатов Ю.А., Антохин А.М., Втюрин С.А., Князев Н.А., Коробкин А.И., Фатеев В.Н. Направления совершенствования методов испытаний гибридных лидарных систем дистанционного мониторинга загрязнений окружающей среды физиологически активными веществами. *Совр. пробл. дистанционн. зондирования Земли из космоса*. 2007; 4(1):236–43.
15. Палатов Ю.А., Антохин А.М., Втюрин С.А., Казанцев В.И., Князев Н.А. Радиолокатор бокового обзора для экологического мониторинга из космоса. *Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса*. 2010; 7(4):249–253.
16. Родичева Э.К., Кузнецов А.М., Медведева С.Е. Биоломинесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга. *Вестн. Оренбургского ГУ*. 2004; 5:96–100.
17. Суковатая И.Е. Фотобиофизика. Красноярск: ИПК СФУ; 2008; 438 с.
18. Холоимова А.С. Биологические методы экологической диагностики как эффективный способ оценки качества природной среды. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология*. 2013; 4:33–7.
19. Якунина И.В., Попов Н.С. Методы и приборы контроля окружающей среды. *Экологический мониторинг: учебное пособие*. Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та; 2009. 188 с.
20. 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):932–937.
21. Farsund Ø., Rustad G., Skogan G. Standoff detection of biological agents using laser induced fluorescence – a comparison of 294 nm and 355 nm excitation wavelengths. *Biomed. Opt. Express*. 2012; 3(11):2964–75. DOI: 10.1364/BOE.3.002964.
22. Huffman J.A., Treutlein B., Poschl U. Fluorescent biological aerosol particle concentrations and size distributions measured with an Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer (UV-APS) in Central Europe. *Atmos. Chem. Phys.* 2010; 10(7):3215–33. DOI: 10.5194/acp-10-3215-2010.
23. Jamriska M., DuBois T.C., Skvortsov A. Statistical characterisation of bio-aerosol background in an urban environment. *Atmospheric Environment*. 2012; 54:439–48. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2012.02.049.
24. Jeys T.H., Herzog W.D., Hybl J.D., Czerwinski R.N., Sanchez A. Advanced trigger development. *Lincoln Laboratory Journal*. 2007; 17(1):29–62.
25. Ruzer L.S., Harley N.H., editors. *Aerosols handbook: measurement, dosimetry, and health effects*. 2nd ed. CRC Press; 2013. 656 p.
26. Saari S., Reponen P., Keskinen J. Performance of two fluorescence-based real-time bioaerosol detectors: BioScout vs. UVAPS. *Aerosol Science and Technology*. 2014; 48(4):371–8. DOI: 10.1080/02786826.2013.877579.
27. Sivaprakasam V., Huston A.L., Scotto C., Eversole J.D. Multiple UV wavelength excitation and fluorescence of bio-aerosols. *Optics Express*. 2004; 12(19):4457–66. DOI: 10.1364/OPEX.12.004457.
28. Svabenska E. Systems for Detection and Identification of Biological Aerosols. *Defence Science Journal*. 2012; 62(6):404–411. DOI: 10.14429/dsj.62.1251.
29. Thavaselvam D., Vijayaraghavan R. Biological warfare agents. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2010; 2(3):179–88. DOI: 10.4103/0975-7406.68499.
30. Trudil D., Loomis L., Pabon R., Hasan J.A.K., Trudil C.L. Rapid ATP method for the screening and identification of bacteria in food and water samples. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2000; 41(6):27–9.
31. Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18(4):739–745.
32. Zhang P., Zhao Y., Liao X., Yang W., Zhu Y., Huang H. Development and calibration of a single UV LED based bioaerosol monitor. *Opt. Express*. 2013; 21(22):26303–10. DOI: 10.1364/OE.21.026303.
33. Ziesenis K., Grabert E. A novel method for determining chronic toxicity with the LUMiStox luminescent bacteria test. In: Campbell A.K., Kricka L.J., Stanley P.E., editors. *Bioluminescence and chemiluminescence: fundamental and applied aspects*. Chichester: Wiley; 1994. P. 76–8.

References

- Boreisho A.S., Konyaev M.A., Morozov A.V., Pikulik A.V., Savin A.V., Trilis A.V., Chakchir S.Ya., Boiko N.I., Vlasov Yu.N., Nikitaev S.P., Rozhnov A.V. [Mobile multi-wave lidar complexes]. *Kvantovaya Elektronika*. 2005; 35(12):1167–78.
- Vladimirov Yu.A. [Luminescence accompanying biochemical reactions]. *Sorosovskiy Obrazovatel. Zh.* 1999; 6:25–32.
- Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. [Free radicals and cellular chemiluminescence]. *Uspekhi Biol. Khimii*. 2009; 49:341–88.
- Germanchuk V.G., Utkin D.V., Shecherbakova S.A. [Analysis of the modern methods and means for rapid toxin indication]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 2(112):51–4.
- Deryabin D.G., Polyakov E.G., Karimov I.F. [Peculiarities of the test-system usage when studying abiotic media and biological fluids]. *Orenburg State University Bulletin*. 2005; 5:101–4.
- Zlobin V.I., Evstigneev V.I. [Specific and non-specific indication of microorganisms in environment]. *RAMS Bulletin*. 2002; 11:37–42.
- Illarionov B.A., Protopyova M.V. [Cloning and gene expression of luminescent system *Photobacterium leiognathi*]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 1987; 8:41–6.
- Kokhanenko G.P., Makogon M.M. [Mobile scanning fluorescent-aerosol lidar “Faran-M1”]. *Fotonika*. 2010; 4:50–3.
- Malyshev V.P. [The state and the prospects of the development of methods and means of radiation, chemical, and biological protection]. *Strategiya Grazhdan. Zashchity: Probl. i Issledovaniya*. 2013; 3(2):54–67.
- Manukhov I.V., Zavit'skiy G.B., Danilov V.S. [Cloning of LuxAB genes of thermally stable luciferase *Photobacterium luminescens* ZM1 in *Escherichia coli* K12]. *Biotechnologia*. 1999; 1:40–3.
- Obraztsov I.V., Godkov M.A. [Chemiluminescent analysis of blood cells in medicine: history, theory and practice]. *Mol. Meditsina*. 2013; 4:3–9.
- Onishchenko G.G., Pal'tsev M.A., Zverev V.V., Ivanov A.A., Kiselev V.I., Netesov S.V., Severin S.E., Semenov B.F., Sergiev V.P., Shchelkunov S.P. [Biological Safety]. M.: “Meditsina”; 2006. 304 p.
- Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martynyuk R.A. [Bioterrorism: national and global threat]. *RAS Bulletin*. 2003; 73(3):195–204.
- Palatov Yu.A., Antokhin A.M., Vtyurin S.A., Knyazev N.A., Korobkin A.I., Fateenkov V.N. [Trends in enhancement of methods for testing the hybrid lidar systems for the remote monitoring of environmental contamination with physiologically active substances]. *Sovrem. Probl. Distantionnogo Zondir. Zemli iz Kosmosa*. 2007; 4(1):236–43.
- Palatov Yu.A., Antokhin A.M., Vtyurin S.A., Kazantsev V.I., Knyazev N.A. [Side-looking radar for ecological monitoring from the space]. Радиолокатор бокового обзора для экологического мониторинга из космоса. *Sovrem. Probl. Distantionnogo Zondir. Zemli iz Kosmosa*. 2010; 7(4): 249–53.
- Rodicheva E.K., Kuznetsov A.M., Medvedeva S.E. [Bioluminescent bio-tests on the base of luminous bacteria, utilized for ecological monitoring]. *Orenburg State University Bulletin*. 2004; 5:96–100.
- Sukovataya I.E. [Photobiophysics. Version 1.0 [Electronic resource]: Electronic Study Guide]. Krasnoyarsk; 2008. 438 p.
- Kholoimova A. S. [Biological methods of ecological diagnostics as an effective means of natural environment quality assessment]. *Moscow University Bulletin. Series 16. Biology*. 2013; 4:33–7.
- Yakunina I.V., Popov N.S. [Methods and Devices for Environmental Control. Ecological Monitoring: Study Guide]. Tambov; 2009. 188 p.
- Blaise C., Forghani R., Legault R., Guzzo J., Dubow M.S. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminescence and Microtox reagent. *Biotechniques*. 1994; 16(5):932–937.
- Farsund Ø., Rustad G., Skogan G. Standoff detection of biological agents using laser induced fluorescence – a comparison of 294 nm and 355 nm excitation wavelengths. *Biomed. Opt. Express*. 2012; 3(11):2964–75. DOI: 10.1364/BOE.3.002964.
- Huffman J.A., Treutlein B., Poschl U. Fluorescent biological aerosol particle concentrations and size distributions measured with an Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer (UV-APS) in Central Europe. *Atmos. Chem. Phys.* 2010; 10(7):3215–33. DOI: 10.5194/acp-10-3215-2010.
- Jamriska M., DuBois T.C., Skvortsov A. Statistical characterization of bio-aerosol background in an urban environment. *Atmospheric Environment*. 2012; 54:439–48. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2012.02.049.
- Jeys T.H., Herzog W.D., Hybl J.D., Czerwinski R.N., Sanchez A. Advanced trigger development. *Lincoln Laboratory Journal*. 2007; 17(1):29–62.
- Ruzer L.S., Harley N.H., editors. *Aerosols handbook: measurement, dosimetry, and health effects*. 2nd ed. CRC Press; 2013. 656 p.
- Saari S., Reponen P., Keskinen J. Performance of two fluorescence-based real-time bioaerosol detectors: BioScout vs. UVAPS. *Aerosol Science and Technology*. 2014; 48(4):371–8. DOI: 10.1080/02786826.2013.877579.
- Sivaprakasam V., Huston A.L., Scotto C., Eversole J.D. Multiple UV wavelength excitation and fluorescence of bioaerosols. *Optics Express*. 2004; 12(19):4457–66. DOI: 10.1364/OPEX.12.004457.
- Svabenska E. Systems for Detection and Identification of Biological Aerosols. *Defence Science Journal*. 2012; 62(6):404–411. DOI: 10.14429/dsj.62.1251.
- Thavaselvam D., Vijayaraghavan R. Biological warfare agents. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2010; 2(3):179–88. DOI: 10.4103/0975-7406.68499.
- Trudil D., Loomis L., Pabon R., Hasan J.A.K., Trudil C.L. Rapid ATP method for the screening and identification of bacteria in food and water samples. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2000; 41(6):27–9.
- Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18(4):739–745.
- Zhang P., Zhao Y., Liao X., Yang W., Zhu Y., Huang H. Development and calibration of a single UV LED based bioaerosol monitor. *Opt. Express*. 2013; 21(22):26303–10. DOI: 10.1364/OE.21.026303.
- Ziesenis K., Grabert E. A novel method for determining chronic toxicity with the LUMISTox luminescent bacteria test. In: Campbell A.K., Kricka L.J., Stanley P.E., editors. *Bioluminescence and chemiluminescence: fundamental and applied aspects*. Chichester: Wiley; 1994. P. 76–8.

Authors:

Spitsyn A.N., Osina N.A., Germanchuk V.G., Utkin D.V., Sharova I.N., Kuklev V.E., Portenko S.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Спицын А.Н., Осина Н.А., Германчук В.Г., Уткин Д.В., Шарова И.Н., Куклев В.Е., Портенко С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 12.01.18.

Отправлена на доработку 17.01.18.

Принята к публ. 20.02.18.