

ООО «НПП «ПРИКЛАДНЫЕ БИОСИСТЕМЫ»

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ
ДЛЯ ШКОЛЬНИКОВ:
теоретическая часть,
практическая часть - лабораторные работы,
исследовательская часть**

Красноярск, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие

Раздел 1. Биолюминесценция как явление. Светящиеся организмы

- 1.1. История открытия светящихся организмов
- 1.2. Светящиеся организмы
 - Светляки
 - Кишечнополостные
 - Ракообразные
 - Динофлагелляты
 - Моллюски
 - Черви
- 1.3. О происхождении и биологическом смысле биолюминесценции
- 1.4. Биолюминесцентный анализ
- 1.5. Задание

Раздел 2. Работа в лаборатории

- 2.1. Техника безопасности при работе в научной лаборатории
- 2.2. Биолюминометр «LumiShot»
- 2.3. Инструкция по проведению измерений
- 2.4. Инструкция по работе с автоматическими пипетками
- 2.5. Правила обращения с реактивами
- 2.6. Правила соблюдения чистоты при проведении эксперимента

Раздел 3. Биолюминесцентный экологический практикум

- Лабораторная работа 1. Тестирование загрязнения воды*
- Лабораторная работа 2. Тестирование загрязнения снега*
- Лабораторная работа 3. Тестирование загрязнения почвы*
- Лабораторная работа 4. Оценка загрязнения лиственного покрова деревьев*
- Лабораторная работа 5. Оценка смываемости моющих средств с поверхности посуды*
- Лабораторная работа 6. Анализ чистоты поверхности фруктов и овощей*
- Лабораторная работа 7. Влияние газированных напитков на ферменты светящихся бактерий*
- Лабораторная работа 8. Доказательство вреда курения с помощью биолюминесцентного метода*
- Лабораторная работа 9. Доказательство вреда употребления алкоголя с помощью биолюминесцентного метода*

Раздел 4. Исследовательский практикум (введение в науку)

- 4.1. Научный метод
- 4.2. Правила написания и оформления научной работы
- 4.3. Темы научных исследований с использованием биолюминесценции

Словарь терминов

Предисловие



*Академик Российской академии наук
Иосиф Исаевич Гительзон*

Глубокоуважаемые учителя биологии и химии, работающие в школе, хочу горячо порекомендовать Вам этот практикум. Такое практическое руководство создано впервые. Феномен биолюминесценции, широко распространённый в природе можно использовать как новый и очень эффективный инструмент, позволяющий визуализировать, т. е. буквально сделать видимыми многие явления жизни с помощью относительно простых приборов – биолюминометров, которые вполне могут быть доступными по цене для обычных общеобразовательных школ.

О многих завораживающих явлениях жизни вам, преподавателям, приходится рассказывать, а вашим ученикам читать в учебниках и книгах, рекомендованных для дополнительного образования. Но справедлива мудрая поговорка «Лучше один раз увидеть, чем семь раз услышать», и у нее есть доказанное научное психофизиологическое объяснение: более 80 % информации поступает в мозг через глаза с помощью внешнего чувства зрения и только 20 % приходится на долю всех остальных органов чувств.

Биолюминесценция – это излучение света живыми организмами. Она издавна привлекала внимание пытливых людей своим таинственным существованием – свечением без выделения привычного нам для светящихся тел тепла, а впоследствии и ученых, благодаря которым уже раскрыты механизмы этого удивительного явления природы. Многообразие проявлений жизни поразительны, но только в этом явлении она предстаёт перед нами способной порождать свет. Искусством светиться обладают очень немногие живые организмы, не более нескольких тысяч видов из нескольких миллионов, существующих на Земле. Большинство живых излучателей света живет в море. На суше светятся лишь некоторые насекомые, черви и грибы. Остальные живые существа, увы, не умеют этого делать. Мы не можем непосредственно увидеть работу тех сложных механизмов, которые лежат в основе жизни – роста и

развития, дыхания и усвоения пищи, работы генов и ферментов. Они протекают в темноте. Легко понять, как важно было бы видеть фундаментальные процессы жизни, чтобы понимать их механизм и исправлять в случае поломки, т. е. помогать медицине.

Достижения современной науки – биофизики, физико-химической биологии, генетики – открыли молекулярные механизмы биолюминесценции (еще не все!) и возможность извлекать из светящихся организмов гены, определяющие эту способность, и ферменты, которые управляют биохимическими реакциями, излучающими свет.

Теперь их можно изучать в пробирке и, мало того, переносить в другие живые существа, ранее никогда не излучавшие, – и они начинают светиться. Уже созданы светящиеся бактерии, растения, рыбы, даже теплокровные – мыши. Эти удивительные существа созданы не для развлечения, хотя можно использовать их и в этих целях, а для визуализации процессов жизни. Ген, программирующий синтез светоизлучающей системы в клетке, можно выделить из нее – это так называемый lux-ген, его можношить с каким-либо иным геном, и тогда работа последнего становится видной. Излучающий фермент (люциферазу) можно связать с другим, неизлучающим ферментом, и тогда засветится и его работа. Во многих областях современной биологии и медицины используют элементы биолюминесцентных систем для визуализации и измерения процессов. Они как проявители, сделавшие возможным фотографию, высвечивают процессы жизни, делают видимыми невидимые без проявителя изображения.

Десятки тысяч статей с использованием биолюминесцентного анализа публикуются в научной литературе каждый год. А вот в преподавании биологии были лишь единичные примеры визуализации биологических процессов. Настоящее руководство является первым систематизированным практикумом для использования биолюминесценции в школьном преподавании биологии.

Биолюминесцентный практикум, который перед вами, создан благодаря многолетней совместной работе сотрудников кафедры биофизики Сибирского федерального университета (СФУ) и Института биофизики СО РАН. Это первый опыт такого рода в мировой практике. Надеюсь еще увидеть, как биолюминесцентная визуализация в преподавании биологии и биолюминометр – прибор для ее осуществления – станут такими же привычными инструментами в школе, как микроскоп.

С удовлетворением могу сказать, что началось это дело здесь в Красноярске. Мне особенно приятно отметить, что сделано это моими учениками и учениками моих учеников, и первой из них ныне заведующей кафедрой биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ профессором, доктором биологических наук Валентиной Александровной Кратасюк, вырастившей на этом деле целую школу своих учеников.

Практический опыт использования биolumинесценции в школе принадлежит энтузиастам – учителям биологии гимназии №1 «Универс» Денисовой Татьяне Сергеевне и Шатровой Виктории Борисовне, директору лицея № 8 Смирновой Нине Борисовне и учителю биологии Ситниковой Любви Борисовне, директору лицея № 1 Сетковой Ирине Николаевне, учителям биологии Березиной Марине Николаевне и Вагиной Татьяне Борисовне, директору Краевой станции юннатов Вчерашней Ольге Эдуардовне и ее коллегам, учителю биологии гимназии №13 Пахомовой Татьяне Анатольевне, директору Заочной физико-математической школы Осипенко Ольге Анатольевне и многим другим энтузиастам школьного и дополнительного образования. Никто не предписывал им этой «нагрузки». Они занимались этим новым делом увлеченно, по собственной инициативе. Авторы также благодарны заместителю министра образования и науки Красноярского края Анохиной Наталье Викторовне и КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» за финансовую поддержку в создании школьного практикума (грант № КФ-257), сотрудникам Краевого ресурсного центра по работе с одаренными детьми, начальнику управления профессиональной ориентации и координации довузовской подготовки СФУ Лученкову Андрею Владимировичу и его заместителю Холостовой Ольге Ивановне, работникам Межресурсных центров по работе с одаренными детьми г. Красноярска, Канска, Ачинска, Дудинки, Норильска, Минусинска за создание условий для апробации школьного практикума. Возможности биolumинесцентных методов для преподавания в школе только начинают использоваться, тут просторная дорога для инноваций. Присоединяйтесь! Не пожалеете.

Надо лишь преодолеть инерцию первых организационных трудностей – и наградой будет вам живой интерес и энтузиазм учеников на ваших уроках. Нет большей награды для учителя!

РАЗДЕЛ 1. Биolumинесценция как явление. Светящиеся организмы

1.1. История открытия светящихся организмов

Свечение живых организмов, или биolumинесценция, — одно из самых прекрасных проявлений жизни на нашей планете; оно распространено практически повсеместно — от экватора до полярных широт, от поверхностных вод до предельных глубин и обнаружено как у наземных, так и у морских организмов. Среди авторов, описавших многочисленные наблюдения биolumинесценции, многие отличались изумительной точностью и поэтичностью повествований. К ним принадлежат Александр Македонский и Ч. Дарвин, известный микробиолог Е.Н. Гарвей, а также некоторые другие, не менее известные люди. Помните, у К.Г. Паустовского: «Море горело... Мириады звезд, сотни Млечных путей плавали под водой»? А в «Прелюдии» Федерико Гарсиа Лорки: «А мир светляков нахлынет — и прошлое в нем потонет...»? Или совсем родное, из детства: «Налетели светляки, зажигали огоньки...» (К. Чуковский «Муха-цокотуха»).

На протяжении многих веков свечение ночного моря завораживало мореплавателей, естествоиспытателей-натуралистов и жителей прибрежных районов. Почему море «сияет», долгое время для всех оставалось загадкой. Суеверные мореплаватели даже верили, что это проделки злых морских духов, и опасались выходить в море ночью. Эта тайна была разгадана в 1753 г., когда впервые с помощью увеличительного стекла, красиво названного ещё братьями Янсенами «бисерным стёклышком», были обнаружены крохотные организмы диаметром около 2 мм. В ответ на любое раздражение они начинали светиться. За свою особенность эти микроорганизмы получили название «ночесветки» (рис.1.1).

Способность живых организмов светиться называют биolumинесценцией. Это название происходит от греческого слова «биос», что означает «жизнь», и латинского «люмен», что переводится как «свет». Однако обнаружение ночесветок нельзя назвать открытием биolumинесценции, так как не была понятна причина их свечения. Первым серьёзным исследователем этого явления стал Роберт Бойль (1627–1691), английский физик и химик, который является еще и одним из основоположников химии как науки. Говорят, что своему открытию Бойль обязан нерасторопности своих слуг. Однажды слуга пригласил его посмотреть на кусок протухшего мяса, который испускал неяркий

свет. Забыв про ужин, учёный немедленно приступил к изучению явления. Он проделал следующий опыт: поместил светящееся мясо в специальный сосуд и откачал из него воздух. При удалении воздуха из сосуда свечение прекратилось. Однако стоило вернуть воздух, как оно вновь появлялось. На основании этого Бойль сделал вывод о том, что какой-то компонент воздуха необходим для свечения. Позднее было выяснено, что это кислород.

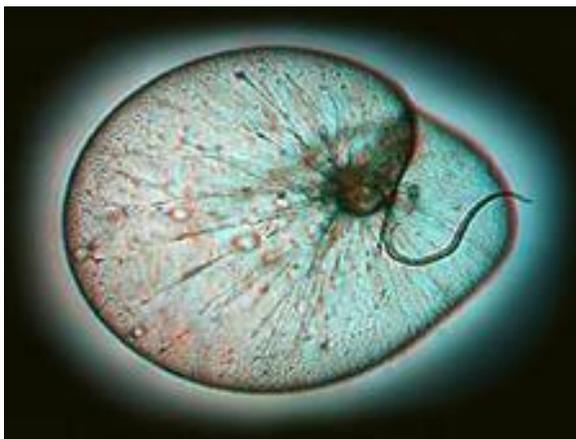


Рис. 1.1 Ночесветка. В. Лункевич. Светящиеся животные /Наука и жизнь, № 8, 2004 <http://www.nkj.ru/archive/articles/1981>

Пионером в исследовании механизмов биолюминесценции стал Рафаэль Дюбуа. В 1887 г. он поставил эксперимент с экстрактами из светящихся жуков *Pyrophorus*. Он обнаружил, что экстракт тканей фотофоров светляков, полученный гомогенизацией в холодной воде, светится в течение нескольких минут, при этом экстракт фотофоров в горячей воде, не светится. Вместе с тем Дюбуа обнаружил, что если добавить к потухшему холодному экстракту порцию несветящегося горячего экстракта, то свечение возобновляется. Аналогичные результаты Дюбуа получил и при эксперименте со светящимися двустворчатыми моллюсками *Pholas dactylus* (рис.1.2).

Таким образом, после опытов Дюбуа стало понятно, что для биолюминесценции необходимы два компонента, один из которых при нагревании разрушается. Одно вещество он назвал «люциферин» (от слова «Люцифер», по-латыни, буквально, «несущий свет»), а другое, которое разрушается при нагревании, – «люциферазой». Понятие «люцифераза» — это собирательное название ферментов. У разных организмов люциферазой являются различные по составу и структуре белки. То же самое касается и люциферина — люциферины разных светящихся организмов сильно отличаются по своей молекулярной структуре (рис. 1.3).

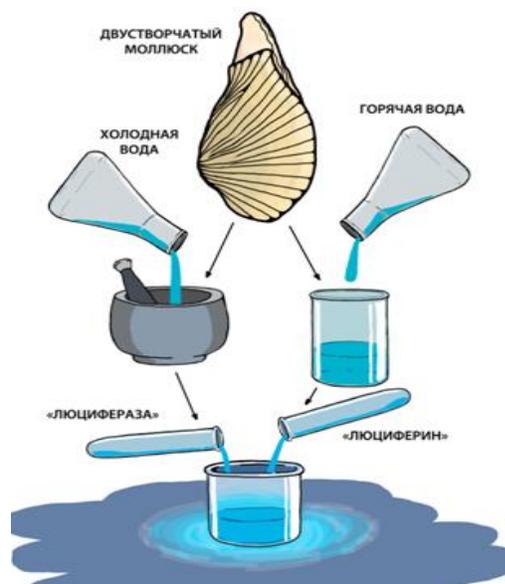


Рис.1.2. Эксперимент Рафаэля Дюбуа

Когда во второй половине XX века были получены необходимые для свечения компоненты, ученые научились использовать явление люминесценции живых организмов для измерения количества самых разнообразных веществ и метаболитов, а также для измерения активности ферментов по интенсивности протекания ферментативных реакций, порождающих свечение, к которым добавляют анализируемые вещества. Этот удобный аналитический метод назвали биолюминесцентным анализом.

1.2. Светящиеся организмы

Природной способностью светиться обладает относительно небольшое число видов животных и растений, принадлежащих почти всем крупным таксонам, кроме высших растений и млекопитающих. Светящиеся формы обнаружены среди бактерий, простейших, кишечнорастворимых, моллюсков, иглокожих, червей, ракообразных, оболочников, многоножек, насекомых и рыб (Рис. 1.3).

Как правило, в результате химической реакции энергия выделяется в виде тепла, но существуют реакции, в ходе которых выделяется только свет. К таким реакциям относятся биолюминесцентные реакции. Свечение всех светящихся организмов происходит благодаря наличию в их организме специальных ферментов — люцифераз, катализирующих хемилюминесцентные реакции окисления субстратов, называемых люциферинами (Рис. 1.4).

Ферменты – вещества, ускоряющие ход реакции в сотни раз и даже более. Они играют важнейшую роль во всех процессах жизнедеятельности. Дело в том, что некоторые биохимические реакции сами по себе протекают чрезвычайно медленно (например, для завершения таких реакций может потребоваться несколько десятков лет). Но стоит провести эту же реакцию в присутствии фермента, как время её протекания сокращается до долей секунды. Это всё равно, что, если бы вся ваша жизнь промелькнула у вас перед глазами за секунду и на этом закончилась. Не очень весело, неправда ли? Но живым организмам без такой высокой скорости протекания биохимических реакций не обойтись, поскольку для выживания в них должны протекать тысячи и тысячи реакций, обеспечивающих своевременное поступление и переработку очень многих веществ.

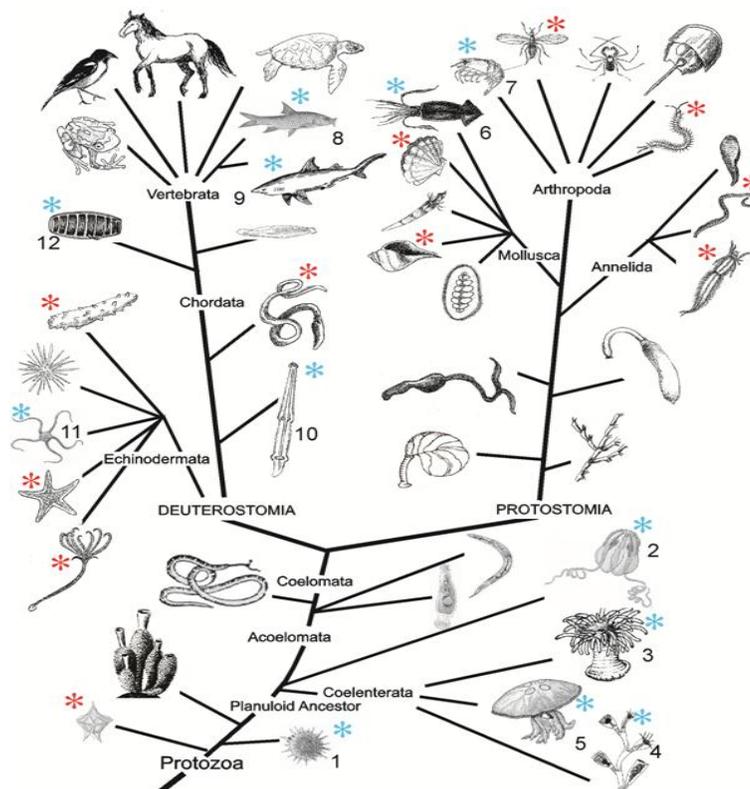
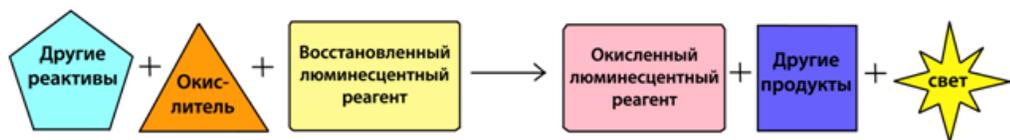


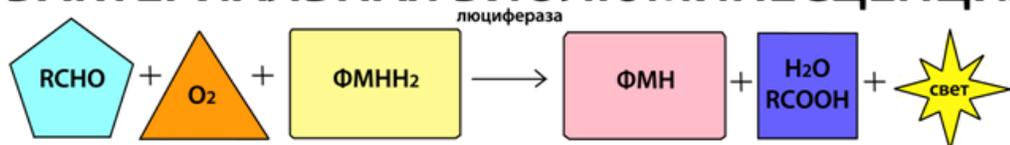
Рис. 1.3. Распространенность целентеразин-зависимых биолуминесцентных организмов. Таксоны филогенетического дерева, имеющие светящихся представителей, отмечены красной звездочкой. Целентеразин и другие имидазолпиразиновые производные в качестве биолуминесцентного субстрата используют представители (отмечено голубой звездочкой) как минимум девяти типов, включающие следующие филогенетические группы: радиолярии (1), ктенофоры (2), кишечнополостные: коралловые полипы (3), гидроиды (4), сцифоидные медузы (5), кальмары (6), ракообразные (7), некоторые костные рыбы (8) и акулы (9), щетинкочелюстные (10), офиуры (11), оболочники (10) (Физика и химия биолуминесценции: уч.пос. /В.Бондарь, Е.Высоцкий, Е.Есимбекова [и др.]; под ред. О.Шимомуры, И.Гительзона — Красноярск: СФУ, 2012 - 218с. — (Физика и химия биолуминесценции: УМКД /рук. творч. коллектива Л. А. Франк)



ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЛЮМИНОЛА



БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ



СВЕТЛЯКОВАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

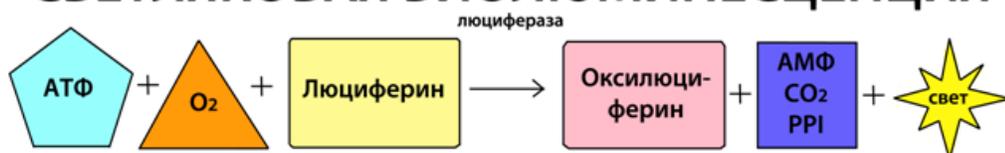


Рис. 1.4. Биолуминесцентные реакции разных светящихся организмов (по плакату фирмы ЛКБ-Валлак, Финляндия, Кратасюк, Гительзон, 1987)

У ферментов есть одна важная отличительная особенность: они специфичны. Это означает, что каждый фермент, как правило, ускоряет строго определённую биохимическую реакцию. Поэтому у каждого фермента есть свой субстрат, т.е. такое вещество, для которого данный фермент является специфическим катализатором. Другими словами, субстрат — это исходное вещество, преобразуемое с помощью фермента в другое вещество, называемое конечным продуктом. Реакцию биолуминесценции катализирует фермент люцифераза, а субстратом является люциферин. Это означает, что люцифераза ускоряет только те реакции, в которых присутствует люциферин. Но понятие «люцифераза» — это собирательное название ферментов. У разных организмов люциферазой являются различные по составу и структуре белки. То же самое касается и люциферина — люциферины разных светящихся организмов сильно отличаются по своей молекулярной структуре (рис. 1.4).

Таким образом, люциферины и люциферазы — это собирательно-функциональные, а не структурно-химические понятия; ими обозначаются субстраты и ферменты, при взаимодействии которых излучается свет.

Реакция биолюминесценции относится к окислительно-восстановительным реакциям. В ходе её происходит окисление субстрата — люциферина в присутствии фермента люциферазы. Люциферин в такой реакции передаёт свои электроны кислороду (окисляется), и в результате в конце реакции образуется молекула воды.



где LH_2 — восстановленный люциферин,
 L — окисленный люциферин

Отличительная особенность этого процесса заключается в том, что большая часть энергии реакции переходит не в тепло, а излучается в виде света. Процесс испускания света можно разбить на две стадии:

- 1) образование молекул в возбуждённом состоянии из исходных продуктов;
- 2) переход возбуждённой молекулы в основное состояние с выделением света.

Во время ферментативного окисления люциферина образуются большие количества энергии (40–80 ккал/моль), что приводит к переходу промежуточного продукта в возбужденное состояние. Молекула этого продукта либо сама излучает квант света, возвращаясь в основное состояние (прямая хемилюминесценция), либо осуществляет безызлучательный перенос энергии к другой светоизлучающей молекуле (непрямая хемилюминесценция). Что же такое возбуждённое состояние? Дело в том, что наиболее стабильным является состояние атома, молекулы или системы, в котором они обладают минимальной энергией, и к которому они стремятся. Любое иное состояние называется возбужденным. Рассмотрим это на примере атома.

Представим себе ядро атома, окружённое несколькими электронными орбитами (Рис. 1.5). Атом находится в основном состоянии (а). Придадим атому избыток энергии, облучив его светом (б). В результате атом перейдет в возбужденное состояние (в). Такое изменение состояния сопровождается переходом одного или нескольких электронов с занятых орбит (орбиталей) на свободные или занятые частично. Так как атом стремится к состоянию с минимальной энергией, электроны со временем возвращаются на свои исходные орбитали, выделяя при этом избыток энергии в виде света (г). После излучения света атом снова переходит в основное состояние (а).

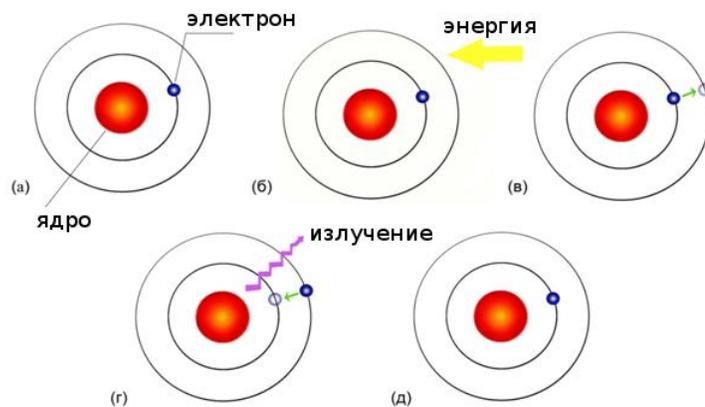


Рис. 1.5. Процесс возбуждения атома

Эффективность хемилюминесцентных реакций определяется квантовым выходом — отношением числа испущенных фотонов (квантов) к числу прореагировавших молекул, показывающим какая часть молекул излучила фотоны света. Для разных светоизлучающих систем квантовый выход варьирует в очень широком диапазоне (от 10–15 до 1). Квантовый выход люциферазных реакций сравнительно высок (0,1–1). Это означает, что в процесс светоизлучения вовлечены от 10 до 100% молекул. Такой высокий КПД (коэффициент полезного действия) биолюминесцентных реакций достигается благодаря обязательному участию специфических белков — люцифераз. Высокие квантовые выходы в биолюминесцентных реакциях связаны с образованием промежуточных продуктов в форме фермент-субстратных комплексов (люциферин-люциферазный комплекс), называемых интермедиатами. Интермедиаты далее распадаются с образованием продуктов реакции, одним из которых является свет (Рис. 1.6).

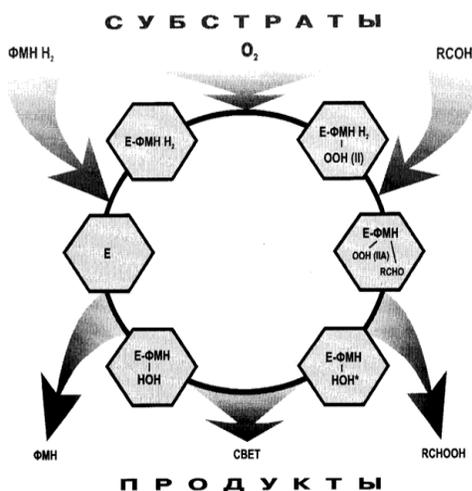


Рис. 1.6. Схема преобразования энергии в биолюминесцентной реакции светящихся бактерий (Кратасюк, Гительзон, 1987)

Оказалось, что механизмы биолюминесцентных реакций у разных светящихся организмов, у которых они были расшифрованы, во многом очень сходны. Рассмотрим это на примере некоторых групп светящихся организмов.

Светляки

Различные виды светляков (насекомые семейства *Lampyridae*) встречаются на юге Северной Америки, в Японии, Юго-Восточной Азии, а также на Черноморском побережье Кавказа и в Приморском крае (рис. 1.11).



Рис. 1.11. Светляки

Несмотря на то, что люциферазы разных видов светляков немного отличаются по строению и составу аминокислот, максимуму длины волны излучаемого света (554–582 нм) и по pH-зависимости, они катализируют одну и ту же реакцию (рис. 1.4). Люминесцентная реакция светляков осуществляется в два этапа. На первом происходит активация субстрата – люциферина молекулой аденозин-3-фосфата (АТФ) при участии люциферазы. Затем образовавшийся на данной стадии комплекс фермента-люциферазы и люцифериладенилата реагирует с одной молекулой O_2 и образует возбужденный интермедиат, который излучает квант света и переходит в неактивное основное состояние. На каждую молекулу люциферина или АТФ потребляется одна молекула кислорода и образуется одна молекула углекислого газа. Квантовый выход реакции очень высок и равен 1,0.

Люцифераза светляков состоит из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой 50000 каждая. Люцифераза светляков имеет высокую избирательность или специфичность к своим субстратам: люциферину и АТФ. Уровень свечения с аналогами АТФ обычно в 50–100 раз ниже по сравнению с АТФ; при этом во многих случаях происходит изменение цвета светоизлучения.

Кишечнополостные

Биолюминесценция многих видов морских кишечнополостных, к которым относятся светящиеся медузы и кораллы, обусловлена специфическими белками, получившими название Ca^{2+} -активируемых фотопротеинов. Это стабильные предварительно заряженные фермент-субстратные комплексы белка и люциферина, носящего в данном случае название целентеразина. Поэтому при взаимодействии с ионами кальция вся аккумулированная в комплексе энергия излучается в виде вспышки света.

В настоящее время известно более 25 видов люминесцирующих морских кишечнополостных, включающих семейства *Cnidaria* и *Ctenophora* и обладающих фотопротеиновым типом люминесцентной системы. Из многих видов выделены и частично охарактеризованы фотопротеины.

Наиболее изучены из фотопротеинов обелин из гидроидных полипов рода *Obelia* и акворин из гидромедуз рода *Aequorea* (рис. 1.12). Обелин – мономерный белок с молекулярной массой 30 000. Для обелина характерен спектр люминесценции с максимумом при 469 нм. Оптимум рН люминесценции обелина приходится на интервал 9,0–10,5. По основным физико-химическим свойствам обелин сходен с акворином.

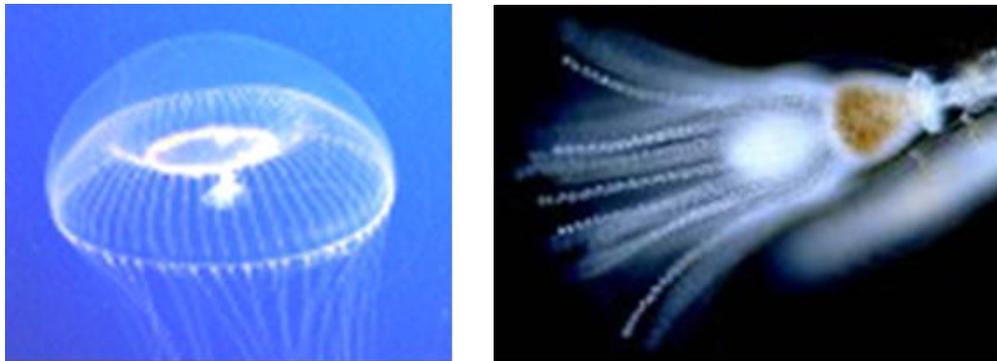


Рис. 1.12. Светящиеся кишечнополостные: гидромедуза рода *Aequorea* (слева) и гидроидные полипы рода *Obelia* (справа)

Ракообразные

Ракушковый рачок *Cypridina* имеет длину тела 3 мм и обитает вдоль южного берега Японии (рис. 1.13). При раздражении он выбрасывает в морскую воду из отдельных желез люциферин и люциферазу. Его биолюминесцентная реакция представляет собой окисление люциферина кислородом, катализируемое люциферазой. Образовавшееся в реакции четырехчленное перекисное соединение (диоксиэтан), разлагаясь, дает квант синего света (462 нм) и продукты — оксилуциферин и углекислый газ CO_2 . Люциферин этого рачка имеет много общего с люциферинотом кишечника (рис.1.5в).



Рис.1.13. Ракушковый рачок *Cypridina*

Динофлагелляты

Динофлагелляты рода *Goniaulax* относятся к группе протистов и получили свое название за то, что каждая их клетка снабжена двумя жгутиками. Особенностью люциферальной системы динофлагеллят является регулирование люминесценции с помощью скачка pH, обеспечивающее проявление циркадных ритмов свечения. В этих организмах существует два типа люцифераз: высокомолекулярная (м.в. 100000) люцифераза с pH-оптимумом действия 6,6 и низкомолекулярная люцифераза, активная в широком диапазоне pH (6,0–9,0).

Моллюски

Моллюски — одни из самых многочисленных животных на Земле. Среди моллюсков также встречаются немногочисленные светящиеся формы. Самый известный из них — сверлящий моллюск *Pholas dactylus*, живущий в береговой зоне многих морей. Этот моллюск имеет органы свечения в виде дуги на переднем крае мантии, а также в виде двух неправильно-треугольных пятен при основании сифона и двух продольных полос на верхней стороне сифона. Все эти места выделяют светящуюся слизь. Этот моллюск стал известным благодаря [экспериментам Рафаэля Дюбуа](#), после которых стало известно о люциферазе и люциферине.

Оба компонента биолюминесцентной системы моллюска *Pholas dactylus* - люциферин и люцифераза - гликопротеиды. Люцифераза - высокомолекулярный металлогликопротеид с молекулярной массой 310 000. Молекула состоит из двух субъединиц и содержит два атома меди. Люциферин – мономерный гликопротеид с молекулярной массой 3 400 (рис. 1.5e). Биолюминесцентная реакция *Pholas dactylus* протекает в несколько этапов: на первом формируется стабильный фермент — субстратный комплекс, который взаимодействует с O₂ и образует возбужденный продукт, последний переходит в основное состояние с излучением кванта света (490 нм).

Самые интересные среди моллюсков — головоногие. Свое название эти животные получили за необычное строение тела-ноги у них растут прямо из головы. К головоногим моллюскам принадлежат каракатицы, кальмары и осьминоги. Живущие в теплых морях светящиеся моллюски имеют на своем теле многочисленные голубоватые светящиеся точки — светящиеся органы, называемые фотофорами. Фотофоры рассеяны по всему телу и на щупальцах, но светящееся вещество не выделяется наружу в виде слизи, а остается в клетках (рис. 1.13). У некоторых головоногих моллюсков светилось все тело животного и руки, кроме их внутренней поверхности.

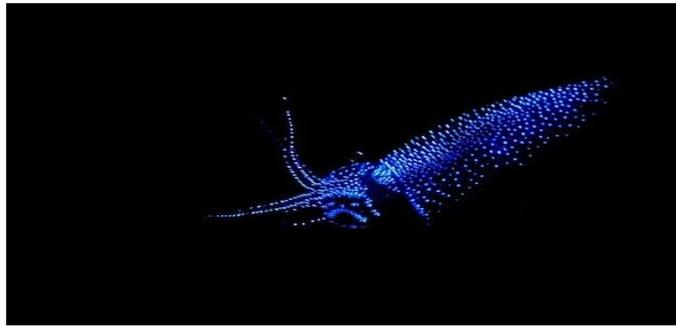


Рис. 1.13. Светящийся кальмар

Фотофоры каракатиц — самые экономные в мире «лампочки». Светятся фотофоры благодаря живущим внутри фотофора светящимся бактериям. Когда нужно «потушить свет», каракатица выделяет несколько капель чернил, они покрывают тонкой пленкой мешочек с бактериями и свет гаснет.

Cephalopod Photophore

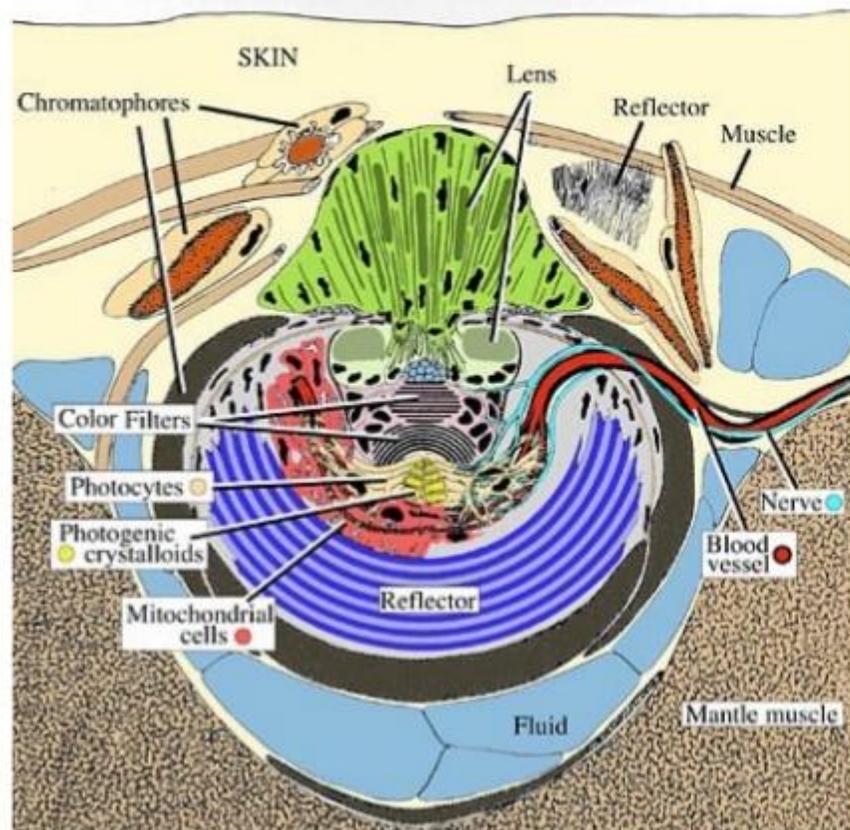


Рис. 1.14. Строение фотофора

Черви

В некоторых случаях в качестве окислителя люциферина выступает не молекулярный кислород, а перекись водорода. Примером может служить биolumинесцентная реакция земляного червя *Diplocardia*.

О ферментах и биolumинесцентных системах многих других светящихся организмов (рыб, грибов, червей и т.п.) мало что известно.

1.3. О происхождении и биологическом смысле биolumинесценции

До настоящего времени непонятно, каким образом и для какой биологической цели создан и работает сложный механизм излучения света живыми организмами. Какие селективные преимущества обеспечены в эволюции организмам, способным излучать свет? Все известные или предполагаемые функции биolumинесценции так или иначе связаны со зрительным поведением многоклеточных животных в темноте (привлекающий эффект статического света бактериальных колоний и плодовых тел грибов, пугающее, дезориентирующее или сигнальное назначение вспышек, освещение ближнего пространства, светомаскировка снизу на светлом фоне водной поверхности и т.д.).

Существует большое количество гипотез о происхождении и смысле биolumинесценции, но все эти представления можно свести к двум группам, реализуемым у разных светящихся организмов:

1. Излучение света само является биологической функцией, и энергетические затраты на излучаемый свет оплачиваются некими экологическими преимуществами для светящихся организмов.

2. Люминесцентная система из люциферазы и сопряженных ферментов выполняет какую-то метаболическую функцию, а свечение является ее побочным продуктом и не играет собственной роли.

Рассмотрим подробнее гипотезы, принадлежащие к первому классу.

Большинство светящихся существ морские, среди них много глубоководных. Самые известные и хорошо изученные из них: удильщик, медузы и кальмары. К биolumинесценции также способны грибы, отдельные виды земляных червей, улиток, комаров и жуков. Некоторые животные способны испускать свет самостоятельно, но большинство светятся за счёт живущих в них бактерий. Живые бактериальные светильники иногда использовали даже для освещения: в 1935 г. этими микроорганизмами был освещен большой зал Международного конгресса в Париже. Советский микробиолог А. Егорова

использовала такие бактерии для освещения лаборатории во время войны. Микробиологи Р. Чумакова и Ю. Сорокин во время встречи Нового года в одной из экспедиций в Индийском океане создали из светящихся бактерий живую картину заснеженного леса в лунную ночь. Это впечатляющее зрелище навсегда осталось в памяти участников рейса.

Тем не менее вряд ли какой-нибудь организм может позволить себе роскошь светиться без надобности. Энергетически это слишком дорогое удовольствие. Большинство биолюминесцентных существ испускают световые вспышки в ответ на внешнее раздражение или при необходимости. Чаще всего такой свет дезориентирует зрячих хищников, отпугивает быстро движущихся крупных животных, приманивает особей своего вида и т.д.

Например, медуза Акворея (рис. 1.9) реагирует на внешнее раздражение. Чаще всего, такой свет при приближении крупных животных, способных повредить желеобразный организм при случайном столкновении с ним. Поэтому свет появляется, когда медуза чувствует опасность.

Жуки-светляки испускают свет, чтобы найти себе пару. Разные виды этих насекомых испускают свет с различной частотой, поэтому каждый светлячок уверен, что он спаривается с самкой именно своего вида. Но самки некоторых видов, например американского светляка *Photuris versicolor*, сначала подманивают специфичной «световой морзянкой» самцов своего вида и спариваются с ними, а затем начинают генерировать «морзянку» для самцов чужого вида, чтобы пообедать ими.

Внешность светящейся рыбы-удильщика (рис. 1.6) малопривлекательна — непропорционально большая голова оснащена огромными зубами и специальной удочкой, которой она приманивает себе добычу, откуда и происходит название. На конце удочки находится прозрачный мешочек, в нем живут бактерии, которые светятся строго по желанию своего хозяина. Подманивая добычу, удильщик постепенно придвигает светящуюся приманку ко рту, пока не захватит свою жертву. Такая прожорливость подчас приводит к гибели. Иногда на поверхности моря находят мертвых удильщиков, подавившихся рыбой, превышающей их по размерам более чем в два раза: выпустить ее хищник не может из-за строения своих зубов.

На теле светящихся моллюсков (кальмаров) расположены многочисленные голубоватые точки — светящиеся органы — фотофоры,

напоминающие по конструкции автомобильную фару. Некоторые кальмары буквально усеяны ими не только снаружи, но и изнутри. Фотофоры — самые экономные в мире лампочки, а светятся они за счёт бактерий, которые в них живут. У «фонарика» есть и выключатель — когда нужно «потушить» свет, моллюск выделяет несколько капель чернил. Они покрывают тонкой пленкой мешочек с бактериями, как бы набрасывая на него черное покрывало, и свет гаснет. Но фотофоры нужны моллюскам не для красоты, на самом деле они используют их для того, чтобы скрываться от хищников. Например, когда на кальмара нападает акула-барракуда, он начинает светиться. Таким образом он привлекает внимание более крупного хищника — рыбы-меч. Естественно, что большая и вкусная барракуда для рыбы-меч привлекательнее, чем кальмар. Поэтому рыба-меч нападает на барракуду, а у кальмара в это время есть шанс скрыться.



Рис. 1.10. Светящийся кальмар

Понятно, что возникновение такого рода гипотез происходит в результате использования исследователями антропоморфного подхода: «Что бы я сделал, если бы был светящейся бактерией или рыбой?».

Теперь рассмотрим гипотезы, связанные с участием люминесцентной системы в обмене веществ.

Мозаичное распределение светящихся форм на филогенетическом древе (рис. 1.2) свидетельствует, скорее всего, о полифилетическом, т. е.

многократном и независимом, происхождении биолюминесценции как жизненно важной функции. Вот только какой? Сравнение между собой биолюминесцентных систем разных светящихся организмов убедило нас в том, что люциферазы сильно отличаются друг от друга по структуре и свойствам, хотя и выполняют одну и ту же функцию – катализируют реакцию светоизлучения. Из сходных функций проистекает сходство люциферинов — субстратов разных люцифераз. Так, химически идентичные люциферины встречаются среди большого числа филогенетически отдаленных типов, таких как рак-отшельник *Cypridina*, костистые рыбы *Apogon*, *Parapriscantus*, *Porichthys*. Свечение гидромедуз *Aequorea*, *Halistaura* и *Obelia* связано с «фотопротеиновым» комплексом и запускается следовыми количествами Ca^{+2} , а входящий в «фотопротеин» хромофор имеет ту же структуру, что и природный люциферин из морских анютиных глазок *Renilla*, и функционирует у различных неродственных видов, восстанавливаясь на свету и окисляясь O_2 . Однако известен ряд биолюминесцентных систем, в которых люциферин окисляется не молекулярным кислородом, а его активными формами — перекисью водорода — H_2O_2 или супероксидом (O^{2-}), причем в первом случае с участием субстрат-специфичной пероксидазы, а во втором, по-видимому, даже без фермента. С окислением активными формами кислорода разных органических соединений связано и сверхслабое свечение. Однако его квантовый выход несравненно ниже, чем у специализированной биолюминесценции. Даже для фотопротеинов постулировано, что они содержат стабилизированное кислород-содержащее соединение, в связи с чем для завершения реакции не требуются дополнительные количества кислорода, а нужен только Ca^{+2} .

Из всех гипотез наиболее вероятна та, согласно которой биолюминесценция возникла независимо у разных организмов как способ защиты от окисления клеточных субстратов свободным кислородом в момент его первичного накопления в атмосфере и сохранилась у некоторых видов живых организмов до настоящего времени, так как давала им какие-то селективные преимущества перед другими несветящимися организмами.

Функцией люциферинов могла быть детоксикация активных форм кислорода, образуемых в морской воде при действии УФ-компонента солнечной радиации или как «неизбежное зло» при аэробном дыхании. Эта функция состояла в защите от самоуничтожения клеток, почему-либо в повышенных количествах продуцирующих свободные радикалы (фагоциты, эпителиальные железы водных животных и т.д.). Это подтверждается происхождением

большинства специализированных фотогенных структур. Биолюминесценцию, вероятно, порождали нейтральные мутации, приводившие к появлению в клетках, секретлирующих в среду свободные радикалы для каких-либо целей (защиты от эндопаразитов или от внешних врагов, у паразитических фотобактерий – для деструкции тканей хозяина и т.д.), — новых антиоксидантов, необычайно ярко светящихся при окислении. Дальнейший отбор появившихся *de novo* биолюминесцентных систем мог быть направлен на уменьшение риска окислительного стресса через замещение активных форм кислорода молекулярным кислородом при ферментативном окислении. В пользу этого представления существует немного данных, но они весомы. Известно, что люциферазы обладают необычайно высоким сродством к кислороду. Так, люцифераза бактерий, например, сохраняет способность функционировать при его концентрации ниже 10^{-8} молей, когда кислород уже не может использоваться в дыхании. Темновые мутанты, более чувствительные к дефициту кислорода, погибают при его недостатке, теряют устойчивость к окислительному стрессу, вызванному свободными радикалами, в то время как светящиеся штаммы при данных условиях выживают. В этом случае наличие люциферазной системы проявляется прямым преимуществом для светящихся организмов.

Такой механизм был необходим миллиарды лет назад, когда формировалась атмосфера (в составе атмосферы стал появляться кислород, в то время ядовитый для живых существ). Сейчас кислород перестал быть для организмов токсичным веществом и свечение сохранилось как рудимент (орган, утративший своё основное значение в процессе эволюции) у некоторых видов бактерий. Но наличие сложного механизма регуляции заставляет некоторых исследователей считать это представление маловероятным. Если расходы на функционирование этой системы не оплачиваются какими-то выгодами, то они бы давно исчезли, следовательно, свечение даёт неоспоримые преимущества. Сегодня многие учёные предполагают, что люминесцентная система участвует в обмене веществ, а свечение является её побочным продуктом. Например, существует гипотеза, что в условиях недостатка кислорода для дыхания светящиеся организмы используют люциферазную систему. Это предположение находит подтверждение у светящихся бактерий видов *Photobacterium fischeri* и *Photobacterium phosphoreum*. Синтез люциферазы у них усиливается при снижении концентрации кислорода. И, несмотря на его недостаток, они выживают. Представители же, потерявшие способность к свечению, более чувствительны к дефициту кислорода и погибают при тех же условиях.

Также есть и другие гипотезы, например, о том, что биолюминесценция дает защиту от перегрева. В пользу гипотезы свидетельствуют некоторые соображения о том, что так как большинство химических реакций протекают с выделением тепла, а значит, тело рыбы должно нагреваться. Однако этого не происходит. Причиной этому может служить преобразование химической энергии в энергию биолюминесценции, т.е. свечение.

Интересно, что биолюминесценция была вторично использована некоторыми светящимися организмами для организации на ее основе поведенческих признаков. Чаще всего биолюминесценции приписывают сигнальную функцию. У некоторых видов рыб излучение может играть роль стайного сигнала, полезного в раннем возрасте. У глубоководных удильщиков свет может служить приманкой для добычи, средством отпугивания или дезориентации хищников. Назначение свечения у светляков — внутривидовая, в частности, межполовая сигнализация. Можно привести примеры маскирующей роли излучения: тень рыбы на фоне солнечного света, падающего сверху, маскируется светом, излучаемым брюшной поверхностью тела рыбы. Кальмары регулируют собственное излучение в зависимости от интенсивности и спектрального состава солнечного света.

Вернемся к вопросу о симбиозе. Проявление симбиоза многоклеточных животных с фотобактериями очень разнообразно, но в основе лежит также метаболическое взаимодействие, через которое обмен веществ несхожих организмов сочетается в такое гармоническое единство, что бактерии существуют в теле животного как его собственная ткань в специально для этого созданном органе. По-видимому, бактерии получают от рыбы вещества, удовлетворяющие пищевым потребностям бактерий в виде некоего стимула свечения. Несомненно также, что симбиоз с бактериями очень важен для нормальной жизнедеятельности рыбы, что подтверждается развитием столь сложной структуры фотофора у рыб (рис. 1.6). Основная функция бактериофотофора состоит в инактивации и выбросе некоторых метаболитов рыб. Эти метаболиты и стимулируют свечение бактерий. Мутанты по гену люциферазы имеют слабую симбиотическую способность. Более того, светящиеся бактерии в фотофорах могут выполнять роль датчиков химической информации об окружающей рыб среде, наличия в ней различных питательных веществ и феромонов, так как вещества среды обитания должны быть регуляторами свечения бактерий. Другими словами, это возвращение к сигнальной функции биолюминесценции, основанной на стимулировании или

ингибировании (уменьшении) свечения под действием разных физиологически активных веществ. Подтверждением выполнения метаболической функции светящимися бактериями в фотофоре рыб служит происхождение фотофоров из тех же зародышевых структур, что и пищеварительная и выделительная системы, строение и гистологические особенности фотофоров и локализация бактериофотофоров рыб вблизи пищеварительного тракта: вокруг пищевода, под пилорическим отделом желудка и печенью, вокруг прямой кишки и вблизи анального отверстия. Светящиеся бактерии называют «морскими энтеробактериями» за их сходство в свойствах с несветящимися бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, что указывает на их эволюционное происхождение из кишечной микрофлоры, а также на сходство биологических функций. Важным подтверждением участия светящихся бактерий в пищеварении рыб является обнаружение у бактерий ферментов, участвующих в пищеварении – хитиназ, декарбоксилаз аминокислот, альгиназ и других.

Таким образом, скорее всего, биолюминесценция возникла как система, выполняющая какую-то важную для организма функцию. Вторично она была использована некоторыми организмами для выполнения разнообразных поведенческих реакций. Каков будет окончательный ответ на вопрос о происхождении и биологическом смысле биолюминесценции, покажут дальнейшие исследования ферментов светящихся организмов.

1.4. Биолюминесцентный анализ

В окружающем нас мире находится огромное количество веществ, токсичных для всего живого. Современный человек сталкивается с вредными веществами в своей среде обитания (почва, воздух, природные водоёмы), в условиях производства (газовые выбросы и сточные воды предприятия), при питании (пищевые продукты и питьевая вода). Поэтому крайне важным является поиск методов анализа для быстрой оценки токсичности. В этом отношении весьма перспективен биолюминесцентный анализ, основанный на способности разных видов живых организмов излучать видимый свет. Однако чаще всего для анализа используют светящихся бактерий и светляков.

Для изучения токсичности к светящимся бактериям добавляют исследуемое вещество, а затем регистрируют изменение интенсивности свечения. Различные вещества ведут себя в ходе реакции по-разному. Это напрямую влияет на интенсивность свечения: загрязнители и токсины уменьшают способность излучать свет. Так, свечение уменьшается при

добавлении наркотиков, отравляющих и лекарственных средств. Если сравнивать интенсивность свечения системы с участием загрязнителя и без него, то в первом случае излучаемый свет будет слабее. К веществам, стимулирующим свечение бактерий, относятся компоненты питательных сред, например, такие как жирные кислоты.

Интенсивность свечения измеряют с помощью специального прибора — биолюминометра. Результат работы прибора представляет собой интенсивность свечения, зарегистрированную через определенные промежутки времени. Этот результат удобно рассматривать в виде графика, где по оси X отложено время, а по оси Y — интенсивность свечения.

Кривая на рис. 1.11 имеет максимум, который соответствует самому сильному испусканию света. Для того чтобы оценить влияние загрязнителя, нужно сначала получить значения интенсивности свечения в отсутствие токсичных веществ, а затем в их присутствии. Проанализировав спад силы свечения, можно судить о загрязняющих свойствах исследуемого вещества. Таким же образом можно сравнивать между собой токсичность разных веществ.

Снижение интенсивности свечения при добавлении токсичных веществ может происходить по разным причинам. Рассмотрим основные из них.

1. Инактивация фермента

Ферменты могут работать только при особых условиях. Для их активности нужна определённая температура, кислотность и др. Инактивировать («выключить») фермент способны также и некоторые токсичные вещества, они нарушают структуру фермента, и он больше не может выполнять свою функцию. Чем больше концентрация токсичных веществ, тем большее количество ферментов «сломается», а следовательно, не смогут участвовать в биолюминесцентной реакции. В результате интенсивность свечения падает.

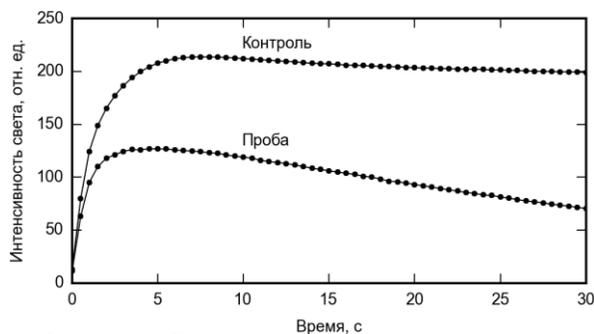


Рис. 1.11. График интенсивности свечения

2. Конкуренция между люциферазой и токсичным веществом, присутствующим в системе, за право соединения с люциферинном.

Некоторые вещества способны реагировать с люциферинном, но такие реакции не будут протекать. При добавлении этих веществ в систему, они будут конкурировать с люциферазой за право взаимодействовать с люциферинном. Какая-то часть люциферина всё-таки вступит в реакцию с люциферазой, поэтому свечение будет, но его интенсивность уменьшится.

3. Разрушение промежуточных люциферин-люциферазных комплексов.

Когда люциферин и люцифераза соединяются, они превращаются в очень нестабильный короткоживущий комплекс. Этот комплекс может или прореагировать дальше, испустив свет, или просто распасться. Токсичные вещества провоцируют распад части таких комплексов, поэтому не все люциферины и люциферазы вступят в биoluminesцентную реакцию, а значит, снизится интенсивность свечения.

1.5. Задание

1. Подготовьте презентацию о какой-либо группе светящихся организмов.
2. Предложите гипотезу о том, как появилось свечение в эволюции у светящихся организмов (светящиеся бактерии, светящиеся рыбы и т.п.).
3. Подготовьте схему экспозиции о каком-либо светящемся организме в Музей светящихся бактерий.
4. Напишите историю жизни какого-либо светящегося организма.
5. Составьте словарь терминов, которые вы встретили в тексте.

РАЗДЕЛ 2. Работа в лаборатории

2.1. Техника безопасности при работе в научной лаборатории

Находясь в лаборатории, необходимо выполнять следующие общие требования:

- Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.
- Открывать окна в лаборатории можно только по разрешению преподавателя.
- В лабораторию запрещается приносить и употреблять напитки и продукты.
- Не разрешается приносить в лабораторию хищных животных и жалящих насекомых.
- Запрещается пользоваться открытым огнем.
- Включать и выключать тумблеры в электрическом щитке можно только с разрешения преподавателя.

При работе в лаборатории необходимо соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил:

1. На каждом лабораторном занятии назначается дежурный из числа учащихся, который отвечает за санитарное состояние лаборатории на время занятия.
2. При работе с оборудованием при обнаружении неисправности приборов, электропроводки или розеток нужно сообщить преподавателю. Запрещается самому производить ремонт неисправностей.
3. Запрещается выбрасывать сломанные предметы в мусоросборник, осколки необходимо складывать в специальный контейнер.
4. При работе с препаратами следует соблюдать осторожность, чтобы брызги при сжимании тканей не попали в лицо и на руки. При попадании жидкостей на кожу немедленно смыть ее обильной струей воды.
5. После окончания работы руки вымыть с мылом.
6. По окончании работы сдать инструменты и отработанные препараты преподавателю. Приборы отключить от сети и накрыть чехлами. Навести порядок на рабочем месте, сдать дежурному.

2.2. Биолюминометр «LumiShot»

Руководство пользователя

Биолюминометр "LumiShot" представляет собой портативный прибор для измерения малых потоков светового излучения (Рисунок 3.1).

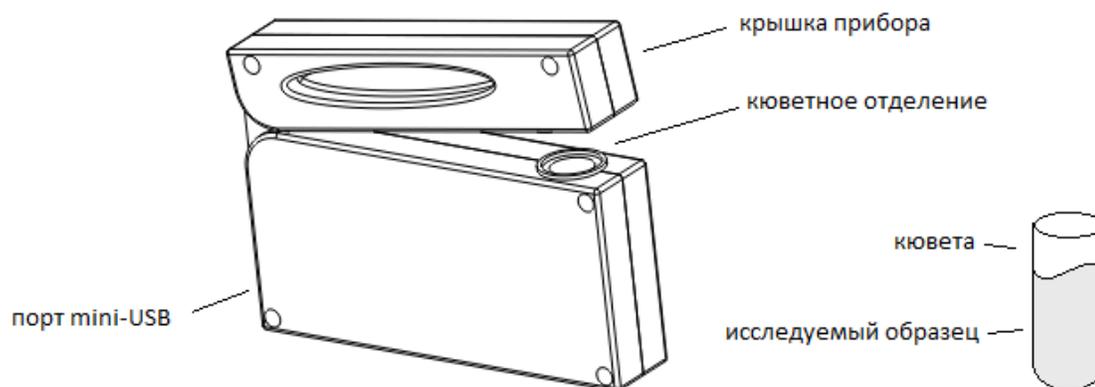


Рисунок 3.1 – Общий вид биолуминометра "LumiShot" с кюветой.

ТРАНСПОРТИРОВКА

Транспортировку прибора требуется осуществлять в специальной коробке, которая обеспечивает фиксацию прибора и кювет в подставке. Допускается перевозка любым видом транспорта при температурах от -40 до $+40$ °С, относительной влажности до 80%.

ХРАНЕНИЕ

Хранение прибора должно производиться при температуре от $+5$ до $+40$ °С. Подготовка к хранению заключается в опустошении кюветного отделения, размещении прибора и кювет на подставке. Чтобы кюветы не пылились, рекомендуется хранить подставку в коробке или пакете, либо накрывать кюветы металлической фольгой. Хранение прибора в пыльных помещениях без упаковки может привести к запылению детектора и потере чувствительности прибора.

ПОДКЛЮЧЕНИЕ

Подключение прибора к компьютеру осуществляется при помощи USB-кабеля. Не рекомендуется использовать USB-разветвители, а также подключать прибор к USB-портам на передних панелях настольных ПК в связи с их более низким напряжением. Лучше всего подключать кабель к USB-выходам непосредственно на материнской плате ПК и при этом в ходе проведения измерений не включать дополнительных устройств, особенно с высоким энергопотреблением.

ПРОГРЕВ

В приборе используются компактные детекторы света. У этих детекторов есть особенность — количество темновых пробоев существенно зависит от температуры, поэтому для качественного измерения необходимо обеспечить следующие условия:

1. После транспортировки прибор должен находиться в помещении 1-2 часа перед экспериментом, чтобы все его детали имели температуру близкую к комнатной.
2. Перед экспериментом запустите пробное измерение, чтобы прибор вышел в рабочий режим термостатирования детектора. Процесс может занять от 5 минут до получаса в зависимости от температуры эксплуатации.
3. В ходе измерений образцы должны иметь температуру близкую к комнатной, чтобы при помещении в кюветное отделение не происходило охлаждение детектора.

Глава 2.3. Инструкция по проведению измерений

1. В приложении выберите меню **Файл** → **Новый** или нажмите на ссылку **Создать новый документ для измерений** во вкладке **Руководство**.
2. Выберите меню **LumiShot** → **Новое измерение** (или нажмите комбинацию клавиш **Ctrl + 1**, или нажмите клавишу **Enter** и выберите появившуюся пиктограмму нового измерения ). Появится диаграмма измерения (рис.3.2).
3. Подключите прибор при помощи USB-кабеля к ПК и дождитесь сообщения об успешном соединении снизу на диаграмме измерения.
4. Установите период измерения (суммирования сигнала), вызвав пункт **Период измерения** в меню **LumiShot**. Стандартное используемое значение 0,2 секунды.
5. Запустите пробное измерение, чтобы прибор прогрелся. Для этого нажмите кнопку **Старт** на диаграмме измерения. Прогрев детектора может занять от 5 минут до получаса в зависимости от температуры эксплуатации. Когда показания выйдут на стабильный уровень, а именно когда колебания значений будут находиться в пределах ± 1000 относительных световых единиц (RLU), прибор можно считать готовым к работе. Нажмите кнопку **Завершить**.

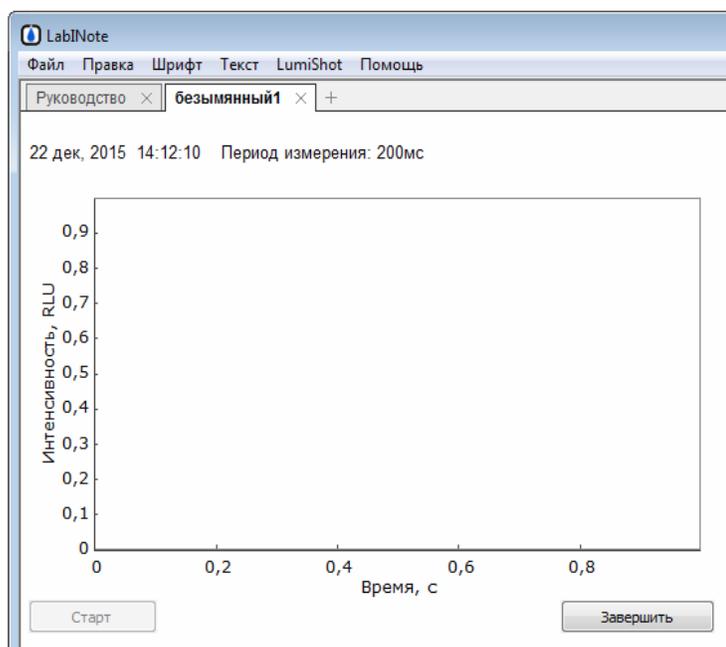


Рисунок 3.2 – Окно приложения с открытой диаграммой измерения.

6. Создайте новое измерение так же, как в пункте 2. Появится новая диаграмма измерения.
7. Запустите измерение, нажав кнопку **Старт**. Показания без исследуемого образца в кюветном отделении необходимо принимать за базовую линию, поэтому после фиксации нескольких точек нажмите кнопку **Вычислить фон**. Показания станут отображаться на графике в окрестности нуля RLU.
8. Поместите в кювету все необходимые компоненты реакционной смеси, которая указана в тексте выполняемой вами лабораторной работы. Диск реагента "Энзимолюм" следует доставать из упаковки чистым сухим шпателем (или пинцетом). Жидкие компоненты добавляются в кювету при помощи автоматических пипеток. Непосредственно перед помещением в прибор кювету следует немного встряхнуть для лучшего перемешивания всех компонентов.
9. Не останавливая измерение, откройте крышку прибора, поместите кювету в кюветное отделение и закройте крышку. Интенсивность свечения исследуемого образца будет отображаться на той же диаграмме измерения.
10. Результатом измерения является кинетическая кривая интенсивности свечения (Рисунок 3.3), которая характеризует изменение интенсивности свечения исследуемого образца с течением времени. В верхней части диаграммы автоматически отображается значение максимальной зарегистрированной интенсивности свечения в относительных световых единицах (RLU).

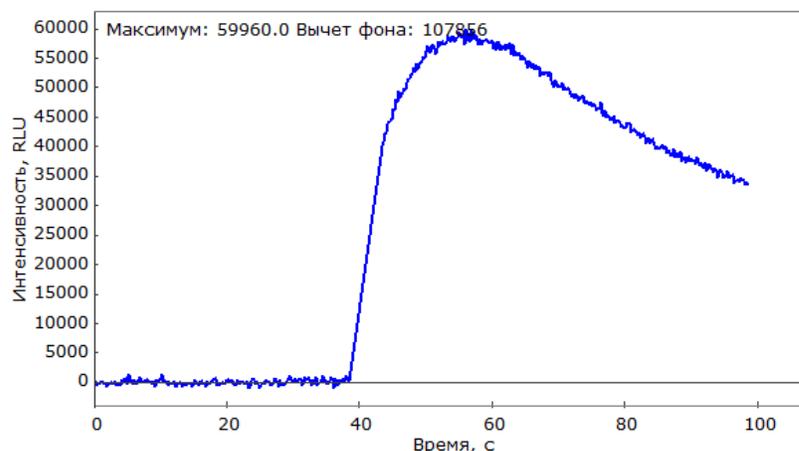


Рисунок 3.3 – Пример кинетической кривой интенсивности свечения.

11. Для завершения измерения нажмите кнопку **Завершить**. Извлеките кювету из кюветного отделения прибора.
12. Как во время, так и после проведения измерения вы можете добавлять в документ комментарии в виде текста.
13. Чтобы провести следующее измерение, повторите пункты 6 – 11.
14. Для экспорта измерений в виде данных или изображения дважды щелкните на диаграмме левой кнопкой мыши и воспользуйтесь пунктом **График** верхнего меню.
15. Для того чтобы сохранить весь документ с измерениями в формате **ods**, выберите **Файл** → **Сохранить как**.
16. Завершите работу: отсоедините USB-кабель от прибора и ПК, закройте приложение.

2.4. Инструкция по работе с автоматическими пипетками

Автоматическая пипетка (дозатор) – это высокотехнологичное устройство поршневого типа, предназначенное для точного дозирования жидкостей, проб и реагентов при проведении лабораторных исследований.

1. Основные компоненты



1 – сменный наконечник; 2 – дисплей; 3 – упор для пальца; 4 – операционная кнопка.

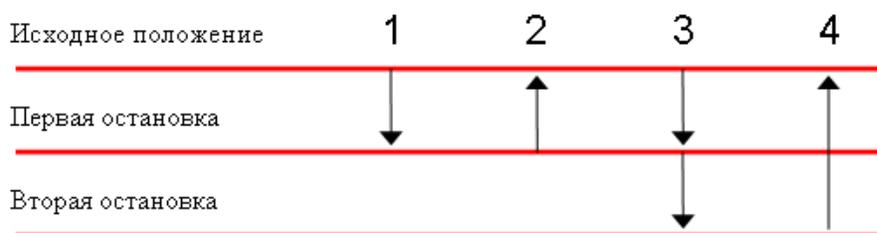
2. Подготовка к работе

1. Установите желаемый объем в микролитрах, повернув операционную кнопку вокруг своей оси; значение отобразится на дисплее.
2. Наденьте чистый сменный наконечник.

ВНИМАНИЕ! Выставляемый объем должен находиться в пределах рабочего диапазона, указанного на корпусе пипетки.

3. Техника и правила дозирования

1. Нажмите операционную кнопку до первого упора.
2. Погрузите наконечник в жидкость на 3-5 мм и медленно отпустите операционную кнопку. Выньте наконечник из жидкости.
3. Дозируйте жидкость в приемный резервуар (кювету), плавно нажав операционную кнопку до первого упора. Через секунду нажмите операционную кнопку до второго упора; это приведет к опорожнению наконечника. Выньте наконечник из резервуара.
4. Отпустите операционную кнопку; она вернется в положение готовности к работе.



ВНИМАНИЕ! Избегайте наклона дозатора вбок при нахождении жидкости в наконечнике. Жидкость может попасть во внутреннюю камеру дозатора и загрязнить ее.

ВНИМАНИЕ! Соблюдайте чистоту эксперимента. Не допускайте загрязнения растворов и проб. Для каждой жидкости используйте отдельный сменный наконечник. Во время дозирования не касайтесь наконечником жидкости, находящейся в приемном резервуаре (кювете). В случае попадания посторонних веществ замените наконечник. По окончании работы утилизируйте использованные наконечники.

Глава 2.5. Правила обращения с реактивами

РЕАГЕНТ "ЭНЗИМОЛЮМ"

1. Правила хранения

Реагент "Энзимолюм" должен храниться в плотно закрытой упаковке при температуре от 0 до +4 °С.

2. Правила использования

Перед проведением измерений упаковку с реагентом следует достать из холодильника и выдержать при комнатной температуре не менее 10 минут.

Для проведения измерения необходимо аккуратно достать чистым сухим шпателем (или пинцетом) из упаковки с реагентом один диск и поместить его на дно сухой измерительной кюветы.

Не допускать попадания влаги внутрь упаковки!

ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИД (ФМН)

1. Правила хранения

Порошок ФМН должен храниться в плотно закрытом флаконе из темного стекла в морозильной камере при температуре -18 °С.

Раствор ФМН должен храниться в плотно закрытом флаконе из темного стекла при температуре от 0 до +4 °С.

2. Правила использования

Для приготовления раствора ФМН необходимо добавить во флакон с порошком ФМН требуемое количество дистиллированной воды, указанное на упаковке.

Перед проведением измерений флакон с раствором ФМН следует выдержать при комнатной температуре не менее 10 минут.

Избегать попадания прямых солнечных лучей!

Глава 2.6. Правила соблюдения чистоты при проведении эксперимента

Не следует хранить пробы (воды, снега, почвы и др.) слишком долго при комнатной температуре. Если отбор проб осуществляется более чем за сутки до проведения измерений – пробы необходимо поместить в холодильник.

Нельзя допускать загрязнения растворов и проб. Дозирование каждой жидкости необходимо производить при помощи отдельного сменного наконечника для

автоматической пипетки. Во время дозирования нельзя касаться наконечником жидкости, находящейся в приемном резервуаре (кювете). В случае попадания посторонних веществ следует заменить наконечник. Сменные наконечники во время работы не должны касаться поверхности рабочего стола и других предметов; следует использовать специальные подставки для автоматических пипеток или положить на стол чистые листы бумаги.

Использованные кюветы, сменные наконечники и другую лабораторную посуду после проведения эксперимента необходимо тщательно вымыть. Для этого можно воспользоваться щеточкой и моющим средством. Вымытую посуду необходимо сполоснуть 20 раз проточной водой, затем 10 раз дистиллированной водой и оставить сушиться на чистой поверхности (например, на чистом листе бумаги).

РАЗДЕЛ 3. БиOLUMИНЕСЦЕНТНЫЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ

Одной из важнейших проблем современности является загрязнение окружающей среды. Заводской дым, выхлопы автомобилей, опасные выбросы при пожарах – все это отравляет воздух. В моря, реки и озера с заводов и ферм постоянно сливаются опасные для жизни человека и животных химикаты. Земля загрязнена свалками, промышленными отходами и прочим мусором нашей цивилизации. Современный человек сталкивается с токсичными веществами почти повсеместно в среде своего обитания. Поэтому в настоящих условиях контроль загрязнения окружающей среды приобретает особенно важное значение.

Существует два принципиально разных подхода к оценке уровня загрязненности, каждый из которых имеет свои особенности, область использования, достоинства и недостатки. Первый из них основан на непосредственном определении концентраций токсичных веществ и сравнении полученных значений с известными значениями предельно допустимых концентраций (ПДК) для этих веществ. Если концентрация анализируемого вещества оказывается больше ПДК, то делается заключение о токсичности. При этом анализ каждого конкретного соединения производится с помощью своего конкретного химического, физического или физико-химического метода.

К достоинствам такого подхода можно отнести то, что в итоге всегда получается точный результат. Однако у него есть и свои недостатки. Например, химический состав среды не всегда известен, и определить, на какие именно токсичные вещества следует ее анализировать, довольно сложно. Более того, тестируемая среда может содержать не одно потенциально опасное вещество, а множество таких веществ. Также возможен эффект синергизма, когда концентрация каждого отдельного соединения находится в пределах нормы, а их совместное действие оказывается опасным для живых систем.

Второй подход к оценке степени загрязнения основан на биологических методах, с помощью которых анализируется влияние среды непосредственно на живые организмы. Данные методы наглядно показывают общий эффект воздействия всех химических соединений, находящихся в анализируемой среде, однако не позволяют определить ее точный химический состав.

Биологические методы делятся на две большие группы: методы биоиндикации и методы биотестирования. Биоиндикацией называется оценка

качества природной среды по состоянию ее биоты. То есть в данном случае заключение о наличии или отсутствии экологической нагрузки делается на основе реакций живых организмов, находящихся в своей среде обитания. Под биотестированием обычно понимают процедуру установления токсичности среды с помощью тест-объектов – специально отобранных и выращиваемых живых организмов – в лабораторных условиях.

В настоящее время известно более 200 методов биологического тестирования, основанных на разных живых объектах: водорослях, микроорганизмах, беспозвоночных, рыбах, растениях. В любых биотестах контролируется влияние факторов токсичности среды на определенные параметры жизнедеятельности – тест-функции. В зависимости от выбранного тест-объекта тест-функциями могут быть разные параметры, такие как выживаемость, плодовитость, средняя скорость роста, интенсивность дыхания и прочие. В частности, в экологическом мониторинге широко используется тест на светящихся бактериях, в котором тест-функцией является функция люминесценции.

Кроме того, в биотестировании в качестве тест-объектов могут использоваться ферментативные системы, выделенные из живых организмов и отвечающие за их важнейшие функции. К преимуществам ферментативных биотестов по сравнению с классическими тестами на живых объектах можно отнести чувствительность, быстроту и высокую надежность анализа.

Одним из таких тестов является тест, основанный на ферментах из светящихся бактерий. В нем по изменению интенсивности биолюминесценции оценивается токсическое воздействие на ферменты веществ, содержащихся в водной среде.

В этом разделе вам предлагается освоить ферментативный биолюминесцентный метод биотестирования в наиболее простом формате: с использованием реагента «Энзимолум». Данный реагент включает в себя все необходимые компоненты для наблюдения свечения, кроме одного – FMN. Таким образом, для проведения анализа к реагенту «Энзимолум» нужно добавить тестируемый образец и раствор FMN для запуска ферментативной реакции, а затем измерить интенсивность люминесценции с помощью биолюминометра.



Лабораторная работа 1.

Тестирование загрязнения воды

Цель: определить степень загрязнения воды, взятой из разных источников, при помощи биолюминесцентного метода тестирования.

Для работы вам потребуется:

1. Биолюминометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолюм"
3. Дистиллированная вода
4. Флавинмоноклеотид (ФМН)
5. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
6. Шпатель или пинцет
7. Три емкости для проб воды

Ход работы

1. Для начала выберите, какую воду вам бы хотелось проанализировать. В теплое время года это может быть, например, вода из ближайшего пресного водоема или реки. Можно протестировать водопроводную воду, воду из кулера, из лужи после дождя, бутылированную воду из магазина. Пофантазируйте и приготовьте для анализа небольшое количество воды из трех разных источников. У вас должно получиться три емкости, которые назовем условно "проба 1", "проба 2" и "проба 3".

ВНИМАНИЕ! Во время измерений все пробы должны быть комнатной температуры.

2. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.
3. Подготовьте реагент "Энзимолюм" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.
4. Проведите измерения контрольной пробы, т.е. дистиллированной воды. Для этого выполните пункты 6 – 11 *Инструкции по проведению измерений*. Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:
 - а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
 - б) 300 мкл дистиллированной воды;
 - в) 10 мкл ФМН.

Всего проведите 4 – 5 одинаковых измерений контрольной пробы.

ВНИМАНИЕ! Выполняйте все операции четко последовательно согласно Инструкции по проведению измерений. Ни в коем случае не

вносите в кювету компоненты реакционной смеси заранее. Все компоненты должны быть смешаны непосредственно перед помещением в прибор. В противном случае измерение будет проведено некорректно.

5. Запишите значения максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех значений к их количеству (в нашем случае 4 или 5). Обозначим полученное среднее значение I_k . Это будет контрольное эталонное значение, соответствующее чистой воде без каких-либо примесей.

6. Аналогичным образом проведите по 4 – 5 измерений для каждой пробы воды.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимоллюм";
- б) 300 мкл пробы;
- в) 10 мкл ФМН.

7. Посчитайте средние арифметические максимальной интенсивности свечения для каждой из проб. Полученные средние значения обозначим I_1 , I_2 и I_3 .

8. Вычислите люциферазный индекс токсичности (ЛИТ) для каждой из проб по формуле:

$$\text{ЛИТ}_n = \frac{I_k - I_n}{I_k} \times 100\%, \text{ где } n = 1, 2, 3.$$

Если ЛИТ > 30 %, то пробу следует считать загрязненной, если ЛИТ < 30 % – незагрязненной.

9. На основе полученных значений ЛИТ сделайте вывод о том, загрязнены проанализированные пробы или нет.

Пример:

Предположим, что после усреднения значений максимальной интенсивности биолюминесценции в дистиллированной воде получили $I_k = 100\,000$ RLU, для первой исследуемой пробы воды получили $I_1 = 82\,600$ RLU, а для второй пробы – $I_2 = 42\,400$ RLU. Тогда $\text{ЛИТ}_1 = ((100000 - 82600)/100000) \times 100\% = 17,4\%$; $\text{ЛИТ}_2 = ((100000 - 42400)/100000) \times 100\% = 57,6\%$. В таком случае первую пробу воды следует считать незагрязненной, а вторую – загрязненной.

Примечание: Может получиться так, что значение I_n для анализируемой пробы окажется больше контрольного значения I_k , и, соответственно, значение ЛИТ будет отрицательное. Данный эффект может наблюдаться вследствие

погрешности измерений, и в таком случае пробу воды следует считать незагрязненной.

Вопросы для обсуждения:

1. Назовите основные источники загрязнения воды.
2. Что такое экология?
3. Какие виды экологических загрязнений вы знаете?

Лабораторная работа 2.

Тестирование загрязнения снега

Цель: определить степень загрязнения снежного покрова при помощи биолюминесцентного метода тестирования; сравнить пробы снега, взятые в чистой местности и загрязненных районах.

Для работы вам потребуется:

1. Биолюминометр "LumiShot"
2. Кюветы
3. Реагент "Энзимолум"
4. Флавинмоноклеотид (FMN)
5. Дистиллированная вода
6. Две автоматические пипетки
7. Шпатель или пинцет
8. Три емкости для отбора проб снега
9. Бумажные фильтры

Ход работы

1. Наберите небольшое количество снега в таком районе, который можно было бы считать незагрязненным: например, в лесу, парке, вдали от автомобильных дорог, железнодорожных путей и промышленных предприятий. Также наберите ещё две пробы снега, уровень загрязнения которого вам бы хотелось оценить. Например, вы можете взять для анализа снег рядом с проезжей частью дороги, вблизи предприятий, ТЭЦ или просто в разных районах города. У вас должно получиться три емкости, которые назовем условно "проба 1", "проба 2" и "проба 3".

2. В помещении дайте пробам снега растаять (для этого можно поместить емкости со снегом на батарею или в теплую воду).

ВНИМАНИЕ! Во время измерений все пробы должны быть комнатной температуры.

3. Профильтруйте каждую из проб через бумажный фильтр.
4. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.
5. Подготовьте реагент "Энзимоллюм" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.

6. Проведите измерения контрольной пробы (дистиллированной воды). Для этого выполните пункты 6 – 11 *Инструкции по проведению измерений*.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимоллюм";
- б) 300 мкл дистиллированной воды;
- в) 10 мкл ФМН.

Всего проведите 4 – 5 одинаковых измерений контрольной пробы.

ВНИМАНИЕ! Выполняйте все операции четко последовательно согласно Инструкции по проведению измерений. Ни в коем случае не вносите в кювету компоненты реакционной смеси заранее. Все компоненты должны быть смешаны непосредственно перед помещением в прибор. В противном случае измерение будет проведено некорректно.

7. Запишите значения максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех значений к их количеству (в нашем случае 4 или 5). Обозначим полученное сред. значение I_k .

8. Аналогичным образом проведите по 4 – 5 измерений для каждой пробы снега. Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимоллюм";
- б) 300 мкл пробы;
- в) 10 мкл ФМН.

9. Посчитайте средние арифметические максимальной интенсивности свечения для каждой из проб. Полученные средние значения обозначим I_1 , I_2 и I_3 .

10. Вычислите люциферазный индекс токсичности (ЛИТ) для каждой из проб по формуле:

$$\text{ЛИТ}_n = \frac{I_k - I_n}{I_k} \times 100\%, \text{ где } n = 1, 2, 3.$$

Если ЛИТ > 30 %, то пробу следует считать загрязненной, если ЛИТ < 30 % – незагрязненной.

11. На основании полученных результатов сделайте вывод о степени загрязнения снежного покрова. Имеются ли различия между пробами снега, взятыми в чистой местности и в других исследованных районах?

Вопросы для обсуждения:

1. Назовите основные источники загрязнения снега.
2. Как вы думаете, может ли снежный покров на одной и той же территории иметь разную степень загрязнения в разное время? Например, в начале и в конце зимы? От чего это зависит?
3. Что можете сделать вы для улучшения экологического состояния в вашем городе?

Лабораторная работа 3.

Тестирование загрязнения почвы

Цель: определить степень загрязнения почвы при помощи биOLUMиНесцентного метода тестирования; сравнить результаты, полученные для почвы из чистой местности и загрязненных районов.

Для работы вам потребуется:

1. БиOLUMинометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолум"
3. Дистиллированная вода
4. Флавинмононуклеотид (ФМН)
5. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
6. Шпатель или пинцет
7. Три емкости для проб почвы
8. Ложка-шпатель (для отбора проб почвы)
9. Ступка и пестик
10. Сито
11. Лабораторные весы
12. Три колбы с крышками

13. Мерный цилиндр
14. Стаканы
15. Бумажные фильтры

Ход работы

1. Наберите небольшое количество почвы в таком районе, который можно было бы считать незагрязненным: например, в лесу, парке, вдали от автомобильных дорог, железнодорожных путей и промышленных предприятий. Также наберите ещё две разные пробы в местах, уровень загрязнения которых вам бы хотелось оценить. Это могут быть, например, участки, расположенные рядом с проезжей частью дороги, вблизи предприятий, ТЭЦ, животноводческих хозяйств. Таким образом, у вас должно получиться три емкости с почвой, которые назовем "проба 1", "проба 2" и "проба 3".

2. Уберите из полученных проб все камни, корни и прочий мусор. Дайте пробам высохнуть при комнатной температуре.

3. Затем для каждой из проб почвы проведите следующую процедуру пробоподготовки:

- а) разотрите почву в ступке;
- б) просейте через сито;
- в) тщательно перемешайте;
- г) отмерьте небольшое количество почвы при помощи лабораторных весов (не менее 5 граммов, но можно больше);
- д) поместите почву в колбу и прилейте мерным цилиндром пятикратный объем дистиллированной воды (то есть, например, если вы взяли 5 г образца почвы, то к нему нужно добавить 25 мл воды);
- е) закройте колбу крышкой и как следует взболтайте в течение 10-15 минут (воспользуйтесь механической мешалкой, если есть такая возможность);
- ж) профильтруйте полученный почвенный экстракт через бумажный фильтр;
- з) повторите фильтрацию несколько раз, чтобы цвет и мутность были такими, как после многократной заварки чайного пакетика.

4. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.

5. Подготовьте реагент "Энзимолум" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.

6. Проведите измерения контрольной пробы (дистиллированной воды). Для этого выполните пункты 6 – 11 *Инструкции по проведению измерений*. Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолум";

- б) 300 мкл дистиллированной воды;
- в) 10 мкл ФМН.

Всего проведите 4 – 5 одинаковых измерений контрольной пробы.

ВНИМАНИЕ! *Выполняйте все операции четко последовательно согласно Инструкции по проведению измерений. Ни в коем случае не вносите в кювету компоненты реакционной смеси заранее. Все компоненты должны быть смешаны непосредственно перед помещением в прибор. В противном случае измерение будет проведено некорректно.*

7. Запишите значения максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех значений к их количеству (в нашем случае 4 или 5). Обозначим полученное среднее значение I_k .

8. Аналогичным образом проведите по 4 – 5 измерений для каждого почвенного экстракта.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимоллюм";
- б) 300 мкл почвенного экстракта;
- в) 10 мкл ФМН.

9. Посчитайте средние арифметические максимальной интенсивности свечения для каждого из трех анализируемых почвенных экстрактов. Полученные средние значения обозначим I_1 , I_2 и I_3 .

10. Вычислите люциферазный индекс токсичности (ЛИТ) для каждой из проб почвы по формуле:

$$\text{ЛИТ}_n = \frac{I_k - I_n}{I_k} \times 100\%, \text{ где } n = 1, 2, 3.$$

Если ЛИТ > 30 %, то пробу следует считать загрязненной, если ЛИТ < 30 % – незагрязненной.

11. На основе полученных значений ЛИТ сделайте вывод о том, загрязнены проанализированные пробы или нет. Есть ли различия между результатами, полученными для почвы из чистой местности и других исследованных районов?

Примечание: Допустимо разбиение хода работы на два этапа, то есть пункты 1-3 и 4-9 могут быть выполнены в разные дни. При этом приготовленные почвенные экстракты следует хранить в холодильнике в закрытых емкостях, время хранения не должно превышать 5 дней.

Вопросы для обсуждения:

1. Назовите основные источники загрязнения почвы.
2. Попробуйте объяснить, почему в работе в качестве контрольного образца использовалась дистиллированная вода.
3. Что нужно было бы использовать в контрольном измерении, если бы во время процедуры экстракции к почве добавлялся какой-нибудь органический растворитель, например, ацетон?

Лабораторная работа 4.

Оценка загрязнения лиственного покрова деревьев

Цель: с помощью биолюминесцентного метода тестирования сравнить степень загрязнения лиственного покрова деревьев на различном удалении от автомобильной дороги.

Для работы вам потребуется:

1. Биолюминометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолюм"
3. Дистиллированная вода
4. Флавинмоноклеотид (ФМН)
5. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
6. Шпатель
7. Пинцет
8. Три емкости для смыва с листьев (стаканы)
9. Мерный цилиндр

Ход работы

1. Соберите листья с трех деревьев, растущих в разной степени удаления от автомобильной дороги: непосредственно возле проезжей части, на расстоянии 10-15 метров и на достаточно большом расстоянии (не менее 100 метров). Желательно, чтобы выбранные вами деревья были одной лиственной породы (например, только тополя или только березы), а собранные листья были неповрежденные и примерно одинакового размера. С каждого дерева сорвите по десять листьев и поместите в отдельные полиэтиленовые или бумажные пакеты.
2. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.
3. Подготовьте реагент "Энзимолюм" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.

4. Возьмите листья, сорванные с дерева возле дороги, и произведите смыв с их поверхности. Для этого мерным цилиндром налейте в стакан 10 мл дистиллированной воды и тщательно прополощите в ней по очереди каждый из десяти листьев с помощью пинцета. Проследите, чтобы во время данной процедуры листья сохраняли свою целостность, не рвались, и в воду попадали только вещества с их поверхности.

Таким же образом произведите смывы с листьев, сорванных с двух других деревьев.

5. Проведите измерения контрольной пробы (дистиллированной воды). Для этого выполните пункты 6 – 11 *Инструкции по проведению измерений*.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл дистиллированной воды;
- в) 10 мкл ФМН.

Всего проведите 4 – 5 одинаковых измерений контрольной пробы.

ВНИМАНИЕ! Выполняйте все операции четко последовательно согласно Инструкции по проведению измерений. Ни в коем случае не вносите в кювету компоненты реакционной смеси заранее. Все компоненты должны быть смешаны непосредственно перед помещением в прибор. В противном случае измерение будет проведено некорректно.

6. Запишите значения максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех значений к их количеству (в нашем случае 4 или 5). Обозначим полученное сред. значение I_k .

7. Аналогичным образом проведите по 4 – 5 измерений для каждого из трех полученных смывов с листьев.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл смыва;
- в) 10 мкл ФМН.

8. Посчитайте средние арифметические максимальной интенсивности свечения для каждого из трех анализируемых смывов. Полученные средние значения обозначим I_1 , I_2 и I_3 .

9. Вычислите люциферазный индекс токсичности (ЛИТ) для каждого смыва по формуле:

$$\text{ЛИТ}_n = \frac{I_k - I_n}{I_k} \times 100\%, \text{ где } n = 1, 2, 3.$$

Если ЛИТ > 30 %, то следует сделать вывод о наличии загрязнения, если ЛИТ < 30 % – об отсутствии загрязнения

10. Проанализируйте полученные результаты. Удалось ли вам выявить загрязнение на поверхности листьев деревьев с помощью биолюминесцентного метода тестирования? Уменьшается ли степень загрязнения листьев по мере удаления от проезжей части дороги? Сделайте выводы.

Вопросы для обсуждения:

1. Какие вредные вещества выбрасываются в атмосферу автомобильным транспортом?
2. Как вы думаете, какие из этих веществ могут быть обнаружены на поверхности листьев?
3. Поразмышляйте, могут ли изменяться результаты эксперимента в зависимости от погодных условий. Будут ли различия, если проанализировать загрязнение листьев с одних и тех же деревьев после дождя и после продолжительной засухи?
4. Объясните, какое значение имеют зеленые насаждения для экологического состояния городов.

Биолюминесценция в быту

Лабораторная работа 5.

Оценка смываемости моющих средств с поверхности посуды

Цель: определить необходимое число ополаскиваний посуды после использования моющего средства при помощи биолюминесцентного метода.

Для работы вам потребуется:

1. Биолюминометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолюм"
3. Дистиллированная вода
4. Флавинмононуклеотид (ФМН)
5. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
6. Шпатель или пинцет
7. Моющее средство для посуды
8. Емкость объемом 15-20 мл с крышкой

Ход работы

1. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.
2. Подготовьте реагент "Энзимолюм" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.
3. Проведите измерения контрольной пробы (дистиллированной воды). Для этого выполните пункты 6 – 11 *Инструкции по проведению измерений*.
Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл дистиллированной воды;
- в) 10 мкл ФМН.

Всего проведите 4 – 5 одинаковых измерений контрольной пробы.

ВНИМАНИЕ! Выполняйте все операции четко последовательно согласно Инструкции по проведению измерений. Ни в коем случае не вносите в кювету компоненты реакционной смеси заранее. Все компоненты должны быть смешаны непосредственно перед помещением в прибор. В противном случае измерение будет проведено некорректно.

4. Запишите значения максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех значений к их количеству (в нашем случае 4 или 5). Обозначим полученное среднее значение I_k .

5. Смоделируйте процесс мытья посуды с использованием моющего средства. Для этого в пустую емкость объемом 15-20 мл поместите одну каплю любого моющего средства, наполните емкость дистиллированной водой на 3/4, закройте крышкой и как следует взболтайте до образования пены.

Проанализируйте полученную жидкость с помощью биolumинесцентного метода. Зарегистрируйте максимальную интенсивность биolumинесценции по схеме, описанной в пункте 3, добавляя вместо 300 мкл дистиллированной воды 300 мкл пробы из емкости, на примере которой моделируется процесс мытья посуды.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл пробы;
- в) 10 мкл ФМН.

Повторите измерения 4 – 5 раз.

6. Посчитайте среднее значение максимальной интенсивности биolumинесценции для анализируемой жидкости. Обозначим его I_0 .

Внимание! *Будьте аккуратны при дозировании: в процессе отбора жидкости погружайте наконечник автоматической пипетки достаточно глубоко во избежание попадания в него пены или воздуха..*

7. Теперь смоделируйте однократное ополаскивание посуды после мытья. Для этого вылейте всю жидкость из емкости и вновь наполните ее дистиллированной водой на 3/4, закройте крышкой и как следует взболтайте.
8. Проанализируйте содержимое емкости аналогично пункту 3. Посчитайте среднее значение максимальной интенсивности биолюминесценции, которое обозначим I_1 .
9. Совпадает ли значение I_1 с контрольным значением I_k ? Если $I_1 < I_k$, то смоделируйте повторное ополаскивание посуды после мытья, повторив последовательность действий, описанных в п.7. После чего проанализируйте содержимое емкости аналогично пункту 3. Посчитайте среднее значение максимальной интенсивности биолюминесценции, которое обозначим I_2 .
10. Продолжайте ополаскивать емкость и анализировать ее содержимое до тех пор, пока среднее значение максимальной интенсивности биолюминесценции не сравняется с контрольным значением I_k .
11. Проанализируйте полученные результаты. Сколько раз необходимо ополоснуть посуду после использования данного моющего средства?

Вопросы для обсуждения:

1. Как вы думаете, всегда ли необходимо при мытье посуды использовать моющее средство?
2. Какие вещества входят в состав моющих средств?
3. Одинаково ли, на ваш взгляд, смываются моющие средства с разных поверхностей: стекла, керамики, пластика? Из чего была изготовлена емкость, которую вы использовали в лабораторной работе?

Лабораторная работа 6.

Анализ чистоты поверхности фруктов и овощей

Цель: с помощью биолюминесцентного метода тестирования оценить чистоту поверхности фруктов и овощей.

Для работы вам потребуется:

1. БиOLUMинометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолюм"
3. Дистиллированная вода
4. Флавинмоноклеотид (ФМН)
5. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
6. Шпатель или пинцет
7. Чашка или блюдце
8. Мерный цилиндр
9. Маленький ершик или щеточка

Ход работы

1. Выберите фрукты или овощи для анализа. Это могут быть любые фрукты, кроме цитрусовых, например: яблоки, груши, сливы, виноград; а также любые овощи, кроме корнеплодов, например: помидоры, огурцы, перцы, баклажаны. В первую очередь нас интересуют такие плоды, которые советуют мыть перед употреблением в пищу. То есть, например, бананы, с которых снимают шкурку, нам не подойдут. Вы можете взять для сравнения фрукты и овощи, купленные в разных магазинах, привезенные из разных мест, а также выращенные на дачных участках.

2. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.

3. Подготовьте реагент "Энзимолюм" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.

4. Произведите смывы с поверхности выбранных фруктов или овощей по следующей методике. Поместите анализируемый плод в чистую чашку, блюдце или любую другую емкость, в которой было бы удобно его помыть. Прилейте с помощью мерного цилиндра 10 мл дистиллированной воды и смочите в ней плод. Затем аккуратно потрите плод щеточкой в местах соприкосновения с водой, для того чтобы лучше смыть все вещества с его поверхности. Помойте весь анализируемый фрукт или овощ таким образом, поворачивая его рукой. Достаньте плод из емкости. Смыв готов. В итоге у вас должно получиться несколько разных смывов (по количеству фруктов и овощей).

5. Проведите измерения контрольной пробы (дистиллированной воды). Для этого выполните пункты 6 – 11 *Инструкции по проведению измерений* (Глава 3.2).

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";

- б) 300 мкл дистиллированной воды;
- в) 10 мкл ФМН.

Всего проведите 4 – 5 одинаковых измерений контрольной пробы.

ВНИМАНИЕ! Выполняйте все операции четко последовательно согласно Инструкции по проведению измерений. Ни в коем случае не вносите в кювету компоненты реакционной смеси заранее. Все компоненты должны быть смешаны непосредственно перед помещением в прибор. В противном случае измерение будет проведено некорректно.

6. Запишите значения максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех значений к их количеству (в нашем случае 4 или 5). Обозначим полученное среднее значение I_k

7. Аналогичным образом проведите по 4 – 5 измерений для каждого полученного смыва.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимоллюм";
- б) 300 мкл смыва;
- в) 10 мкл ФМН.

8. Посчитайте средние арифметические максимальной интенсивности свечения для каждого смыва. Полученные средние значения обозначим I_1, I_2, I_3 и так далее.

9. Вычислите люциферазный индекс токсичности (ЛИТ) по формуле:

$$\text{ЛИТ}_n = \frac{I_k - I_n}{I_k} \times 100\%, \text{ где } n = 1, 2 \text{ и т. д.}$$

Чем больше значение ЛИТ, тем грязнее поверхность тестируемого фрукта или овоща. Чем меньше значение ЛИТ - тем чище.

10. Проанализируйте полученные результаты. Какие рекомендации вы можете дать, исходя из них, своим друзьям и знакомым? Какие фрукты и овощи следует мыть особенно тщательно? Сделайте выводы.

Вопросы для обсуждения:

1. Почему важно тщательно мыть фрукты и овощи перед едой?
2. Какие вредные соединения могут находиться на поверхности фруктов и овощей?
3. Как вы думаете, обрабатывают ли специально овощи и фрукты при транспортировке и перед продажей? И зачем?

Лабораторная работа 7.

Влияние газированных напитков на ферменты светящихся бактерий

Цель: определить степень негативного воздействия газированных напитков на ферменты светящихся бактерий.

Для работы вам потребуется:

1. БиOLUMинометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолюм"
3. Дистиллированная вода
4. Флавиномононуклеотид (ФМН)
5. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
6. Шпатель или пинцет

Ход работы

1. Выберите газированные напитки для анализа. Лучше всего, если это будут напитки разных производителей, разных цветов, разных вкусов.
2. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.
3. Подготовьте реагент "Энзимолюм" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.
4. Измерения проводите следующим образом. Выполните пункты 6 – 9 *Инструкции по проведению измерений*.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл дистиллированной воды;
- в) 10 мкл ФМН.

В тот момент, когда интенсивность биOLUMинесценции достигнет максимального значения, откройте крышку прибора и добавьте в кювету 80 мкл анализируемого газированного напитка. Для этого выставьте на автоматической пипетке с рабочим диапазоном 5 - 50 мкл объем, равный 40 мкл, и дозируйте жидкость в кювету 2 раза подряд. Закройте крышку прибора.

В итоге у вас должна получиться кинетическая кривая с двумя экстремумами, подобная той, которая изображена на Рисунке 4.1.

Первый экстремум соответствует максимальной интенсивности свечения в дистиллированной воде. Примем его за контрольное значение и обозначим $I_{к1}$. Второй экстремум соответствует максимальной интенсивности свечения при добавлении газированного напитка. Обозначим это экспериментальное значение $I_{э1}$. Для того чтобы узнать точное значение $I_{э1}$, щелкните дважды на диаграмме и затем один раз в области экстремума.

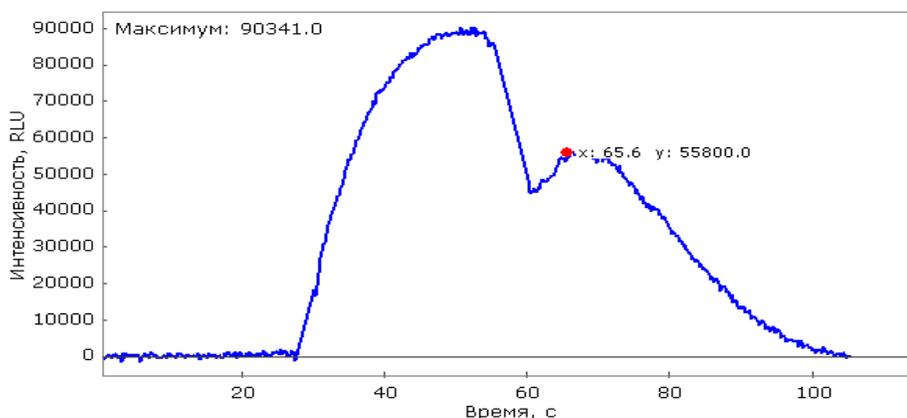


Рисунок 4.1 – Пример кинетической кривой, полученной в результате измерения по методике, описанной в пункте 4 лабораторной работы 7. На 55 секунде в кювету было добавлено 80 мкл газированного напитка.

Если у вас сразу не получилась кинетическая кривая с двумя экстремумами, попробуйте поварьировать количество добавляемого газированного напитка. Сначала проведите измерения, последовательно уменьшая добавляемый объем: 75 мкл, 70 мкл, 65 мкл и т. д. А затем, в случае неудачи, последовательно увеличивая добавляемый объем: 85 мкл, 90 мкл и т. д. Запомните значение объема, при добавлении которого получается кинетическая кривая нужной формы.

5. Вычислите люциферазный индекс токсичности для полученной кинетической кривой (ЛИТ₁) по формуле:

$$\text{ЛИТ}_n = \frac{I_{кn} - I_{эn}}{I_{кn}} \times 100\%, \text{ где } n = 1, 2 \text{ и т. д.}$$

6. По методике, описанной в пункте 4, проведите еще 3 – 4 измерения для данного газированного напитка, каждый раз регистрируя соответствующие контрольное и экспериментальное значения: $I_{к2}$ и $I_{э2}$, $I_{к3}$ и $I_{э3}$, и т. д. При этом добавляйте в кювету именно то количество газированного напитка, которое вы подобрали, выполняя первое измерение. Вычислите люциферазный индекс токсичности для каждой кинетической кривой: ЛИТ₂, ЛИТ₃ и т. д.

7. Посчитайте среднее значение люциферазного индекса токсичности для всех измерений, то есть отношение суммы всех значений (ЛИТ₁, ЛИТ₂ и т. д.) к их количеству (в нашем случае 4 или 5). Обозначим полученное среднее значение <ЛИТ>. Чем больше <ЛИТ>, тем сильнее негативное воздействие, оказываемое газированным напитком на ферменты светящихся бактерий.

8. Прodelайте всю процедуру (пункты 4 – 7) для других газированных напитков, выбранных для анализа. При этом во время измерения добавляйте в кювету именно то количество анализируемого газированного напитка, которое вы подобрали, работая с первым газированным напитком.

9. Сравните значения <ЛИТ>, соответствующие разным газированным напиткам. На основе сравнения сделайте вывод о том, какие газированные напитки в большей степени угнетают активность ферментов светящихся бактерий, а какие в меньшей. Попробуйте объяснить полученные результаты.

Вопросы для обсуждения:

1. Что входит в состав газированных напитков? И какой они имеют pH?
2. Как вы думаете, какие компоненты из газированных напитков в большей степени угнетают ферменты светящихся бактерий?
3. Является ли, на ваш взгляд, воздействие газированных напитков на пищеварительные ферменты человека таким же пагубным?

Биолюминесценция в медицине

«Медицина, взятая в плане теории, - это прежде всего общая биология», - писал один из крупнейших теоретиков медицины И.В. Давыдовский. Успехи медицины связаны с биологическими исследованиями, поэтому врач постоянно должен быть осведомлен о новейших достижениях биологии. Если вспомнить основные биологические открытия, то становится очевидным, что позже все они находили применение в медицине: клеточная теория дала начало клеточной патологии, генетика подталкивает на исследование генетики человека и т.д. Таким образом, медицина является прикладной частью биологии. Следующие лабораторные работы позволят понять, каким образом биолюминесцентные биотесты, представляющие собой биологическую часть, могут применяться в медицине.

Лабораторная работа 8.

Доказательство вреда курения с помощью биолюминесцентного метода

Цель: наглядно продемонстрировать негативное воздействие на живые организмы веществ, содержащихся в табаке, на примере биолюминесцентного биотеста.

Для работы вам потребуется:

1. Биолюминометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолюм"
3. Дистиллированная вода
4. Флавинмоноклеотид (ФМН)
5. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
6. Шпатель или пинцет
7. Сигарета
8. Колба
9. Емкости для приготовления растворов (5 – 6 штук)
10. Мерный цилиндр
11. Бумажные фильтры

Ход работы

1. Выполните пункты 1 – 5 *Инструкции по проведению измерений*.
2. Подготовьте реагент "Энзимолюм" и раствор ФМН для измерений согласно *Правилам обращения с реактивами*.

3. Проведите пробоподготовку:

Высыпьте содержимое одной сигареты в колбу. Прилейте мерным цилиндром 25 мл дистиллированной воды и дайте настояться в течение 10-15 минут, слегка помешивая. Профильтруйте полученную вытяжку через бумажный фильтр.

4. Проведите измерения контрольной пробы (дистиллированной воды). Для этого выполните пункты 6 – 11 *Инструкции по проведению измерений*.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл дистиллированной воды;
- в) 10 мкл ФМН.

Всего проведите 4 – 5 одинаковых измерений контрольной пробы.

ВНИМАНИЕ! Выполняйте все операции четко последовательно согласно Инструкции по проведению измерений. Ни в коем случае не вносите в кювету компоненты реакционной смеси заранее.

Все компоненты должны быть смешаны непосредственно перед помещением в прибор. В противном случае измерение будет проведено некорректно.

5. Запишите величины максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех величин к их количеству (в нашем случае 5). Обозначим полученное среднее значение I_k .

6. Аналогичным образом проведите 4 – 5 измерений для приготовленной вами вытяжки табака.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл вытяжки табака;
- в) 10 мкл ФМН.

7. Удалось ли вам наблюдать свечение? Если да, то посчитайте среднее арифметическое максимальной интенсивности свечения. Обозначим его I_0 .

8. Вычислите люциферазный индекс токсичности для исходной вытяжки (ЛИТ₀) по формуле:

$$\text{ЛИТ}_n = \frac{I_k - I_n}{I_k} \times 100\%, \text{ где } n = 0, 2, 4, 8 \text{ и т. д.}$$

9. Разведите вытяжку в 2 раза: возьмите чистую емкость и смешайте в ней 3 мл дистиллированной воды и 3 мл вытяжки. Для этого выставьте на автоматической пипетке с рабочим диапазоном 100 - 1000 мкл объем, равный 1000 мкл (что соответствует 1 мл), и дозируйте в емкость сначала дистиллированную воду 3 раза подряд, а затем вытяжку 3 раза подряд.

10. Проведите 4 - 5 измерений для разведенной вытяжки табака.

Компоненты реакционной смеси, последовательно вносимые в кювету:

- а) 1 диск реагента "Энзимолюм";
- б) 300 мкл разведенной вытяжки табака;
- в) 10 мкл ФМН.

11. Посчитайте среднее значение максимальной интенсивности биолюминесценции. Обозначим его I_2 . Здесь нижний индекс соответствует кратности разбавления исходной вытяжки.

12. Вычислите люциферазный индекс токсичности для вытяжки, разведенной в 2 раза, (ЛИТ₂) по формуле из пункта 8.

13. Теперь сделайте пункт 9 для разведенной вытяжки. В результате вы получите четырехкратное разбавление исходной вытяжки. Далее выполните

пункты 10 – 12. Посчитайте среднее значение максимальной интенсивности биолюминесценции I_4 и люциферазный индекс токсичности ЛИТ₄.

14. Продолжайте выполнять пункты 9 – 12 до тех пор, пока значение ЛИТ_n не станет меньше 30 %.

15. Определите токсикологическую характеристику исследованной вами вытяжки табака, пользуясь приведенной ниже таблицей. Для этого соотнесите кратность разбавления исходной вытяжки (n), при которой значение ЛИТ_n получилось меньше 30 %, и соответствующую токсикологическую характеристику.

Кратность разбавления исходной пробы	Токсикологическая характеристика исходной пробы
1	Нетоксичная
2	Слаботоксичная
От 3 до 10	Токсичная
От 11 до 50	Сильнотоксичная
> 50	Гипертоксичная

Таблица 4.1 – Соответствие кратности разбавления исходной пробы и ее токсикологической характеристики.

16. Насколько токсичным оказалось содержимое сигареты? Сделайте выводы.

Вопросы для обсуждения:

1. Какие вредные вещества поступают в организм курильщика с табачным дымом?

2. Снижается ли, по вашему мнению, вред от курения при использовании облегченных сигарет? Что показали результаты вашей работы?

3. Является ли негативное воздействие вытяжек табака на биолюминесцентные ферменты, наблюдаемое в ходе данной работы, убедительным для вас?

Лабораторная работа 9.

Доказательство вреда употребления алкоголя с помощью биолюминесцентного метода

Цель: наглядно показать негативное воздействие этилового спирта на организм человека на примере биолюминесцентного биотеста.

Для работы вам потребуется:

1. Биолюминометр "LumiShot" с набором кювет
2. Реагент "Энзимолум"
3. Дистиллированная вода
4. Флавинмоноклеотид (ФМН)
5. Этиловый спирт
6. Две автоматические пипетки и наконечники к ним
7. Шпатель или пинцет
8. Четыре емкости для приготовления растворов с крышками

Ход работы

1. Подсоедините биолюминометр "LumiShot" к компьютеру. Запустите новое измерение в приложении "LabINote" для прогрева прибора (см. [инструкцию для измерения](#)).

2. Достаньте реагент "Энзимолум" и раствор FMN из холодильника и дайте им постоять при комнатной температуре не менее 10 мин. Если готового раствора FMN у вас нет, то приготовьте его, добавив во флакон с FMN необходимое количество дистиллированной воды, указанное на упаковке.

3. Приготовьте растворы этилового спирта в дистиллированной воде, следуя описанной ниже инструкции. Для этого воспользуйтесь автоматической пипеткой, настроенной на объем в 1000 мкл (1 мл). Будьте внимательны и не забывайте менять наконечники у пипетки: для дистиллированной воды и каждого нового получаемого раствора спирта должен быть отдельный наконечник.

4. Разведите исходный этиловый спирт в 2 раза: возьмите чистую емкость и прилейте в нее последовательно 3 мл дистиллированной воды и 3 мл спирта. Допустим, что имеющийся у вас исходный концентрированный этиловый спирт имеет максимальное содержание спирта и минимальное содержание воды (на самом деле это все равно всегда раствор). Тогда концентрация спирта в приготовленном вами растворе будет составлять около 50 %.

5. Разведите полученный раствор спирта еще в 2 раза: возьмите чистую емкость и прилейте в нее последовательно 3 мл дистиллированной воды и 3 мл раствора спирта. Теперь у вас в наличии имеется два раствора, в которых доля спирта равна $1/2$ и $1/4$ (или 50 % и 25 %).

6. Произведите еще два последовательных разведения.

В итоге у вас должно получиться четыре раствора, в которых доля спирта равна 1/2, 1/4, 1/8 и 1/16 (или 50 %, 25 %, 12,5 % и 6,25 %) по объему.

Внимание! Закрывайте крышками емкости с растворами во время работы, чтобы не допустить испарения спирта из растворов.

7. В первую очередь проведите 5 контрольных измерений интенсивности биолюминесценции по следующей схеме. Запустите новое измерение в приложении "LabINote". Аккуратно достаньте чистым сухим шпателем (или пинцетом) из упаковки с реагентом "Энзимолюм" один диск и поместите его на дно измерительной кюветы. Затем при помощи автоматических пипеток добавьте в кювету последовательно 300 мкл дистиллированной воды и 10 мкл раствора FMN (см. [инструкцию по работе с пипетками](#)). Немного встряхните кювету для лучшего перемешивания всех компонентов и поместите в прибор.

Таким образом, во время измерения в кювете должно быть: 1 диск реагента "Энзимолюм" + 300 мкл воды + 10 мкл FMN.

Запишите величины максимальной интенсивности свечения и посчитайте их среднее арифметическое, то есть отношение суммы всех величин к их количеству (в нашем случае 5). Обозначим полученное среднее значение I_k .

8. Теперь по такой же схеме зарегистрируйте интенсивность биолюминесценции в присутствии приготовленных вами растворов этилового спирта. При этом для измерения в кювету добавьте последовательно: 1 диск реагента "Энзимолюм" + 300 мкл раствора спирта + 10 мкл FMN.

Удается ли вам наблюдать свечение? Если да, то какова его интенсивность по сравнению с контрольным значением?

Для тех растворов спирта, в присутствии которых наблюдается ненулевая интенсивность биолюминесценции, проведите по 5 повторных измерений. Посчитайте средние значения максимальной интенсивности биолюминесценции для каждого раствора.

7. Вычислите остаточную интенсивность свечения для каждого проанализированного раствора спирта по формуле:

$$T_n = (I_n / I_k) * 100\%, \text{ где } n = 1, 2 \text{ и т.д.}$$

10. Постройте в MS Excel график зависимости остаточной интенсивности свечения (Т) от концентрации этилового спирта в объемных %. При этом концентрации спирта, равной 0 %, соответствует значение $T = 100$ %.

Пример такого графика приведен на Рисунке 6.1.

11. Как вы можете объяснить полученные результаты? Какое действие оказывает этиловый спирт на ферменты светящихся бактерий? Сделайте выводы.

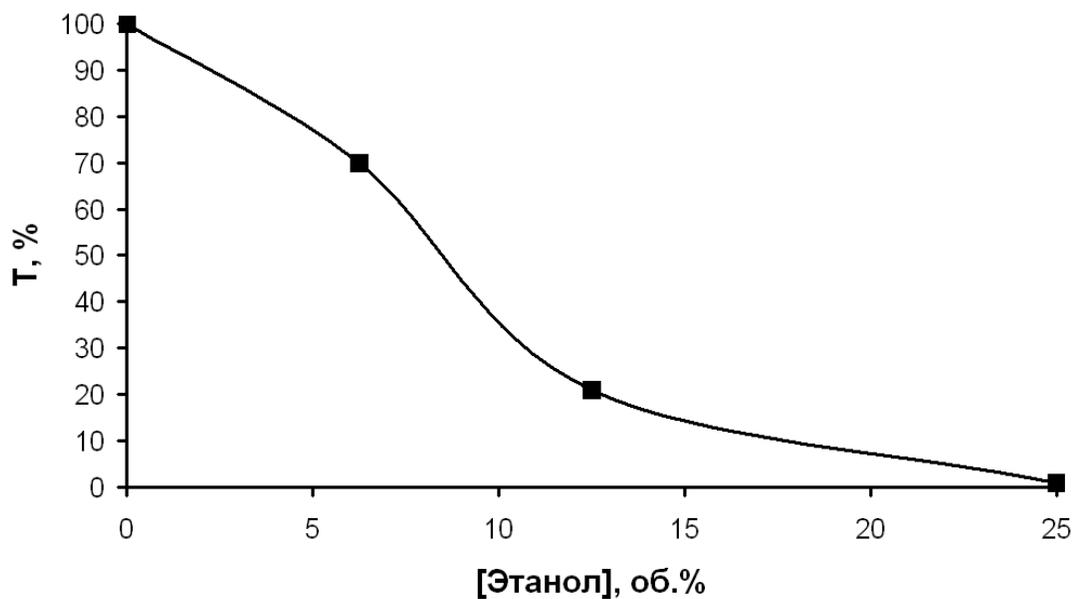


Рисунок 6.1 – Зависимость остаточной интенсивности свечения от концентрации этилового спирта, выраженной в объемных %

Контрольные вопросы:

1. Напишите химическую формулу этилового спирта.
2. В чем заключается основная опасность употребления алкогольных напитков?
3. Является ли негативное воздействие этилового спирта на биолюминесцентные ферменты, наблюдаемое в ходе данной работы, убедительным для вас?

РАЗДЕЛ 4. Исследовательский практикум (введение в науку)

4.1. Научный метод

Каждый, кто хочет стать полезным членом общества, в котором наука и её плоды играют столь важную роль, должен, по крайней мере, в общих чертах познакомиться с естественными науками. Многие решения, определяющие наше будущее, зависят от правильной интерпретации научных открытий. Жизнь требует, чтобы члены общества участвовали в решении, принимаемых по таким проблемам, как допустимый уровень загрязнения, регуляция численности населения, защита диких животных и растений, и обязательной иммунизации. Накопленные наукой знания столь обширны, что не один человек не может охватить их. Однако как граждане, наделенные чувством ответственности, мы можем следить за развитием некоторых важных исследований, результаты которых имеют общественный резонанс и с помощью научно обоснованных утверждений вырабатывать собственные точки зрения.

В научных рассуждениях или экспериментах нет ничего таинственного. Это всего лишь попытки решить проблемы логическим путем, как это делают экономисты, инженеры, историки и каждый из нас в повседневной жизни. Не всегда нужна научная подготовка или знания, чтобы решить, допускают представленные данные те заключения, которые из них выводятся. Мы можем потребовать дальнейшей проверки теории, если нам кажется, что эти данные не достаточно убедительны, мы можем соглашаться или не соглашаться за сделанными на основе этой теории предсказаниями. Но чтобы правильно судить, нужно с начала понять как ученые, используя сходные методы, приходят к тем или иным выводам относительно явлений природы.

Вы, возможно, никогда не задумывались над тем, как вы решаете задачи, подвергаете проверке теории или принимаете определенный план действий. Рассмотрим, каким образом биолог подходит к изучению стоящей перед ним проблемы, с тем чтобы представить связанный с этим ход рассуждений. Научное исследование обычно начинают с наблюдения над тем, что происходит в природе, после чего исследователи пытаются обобщить сделанные наблюдения. Если, например, вы собираете насекомых то вы, вероятно, заметили, что многих из них имеются желтые и черные полосы. Когда вы их ловите, то, возможно, считаете, что всё это пчелы или осы, и поэтому обращаетесь с ними осторожно. Однако при более внимательном обследовании можно обнаружить у некоторых из них признаки, свидетельствующие о том, что это мухи, а не пчелы.

Можно ли считать простым совпадением то, что эти мухи отличаются от своих близких родичей – комнатных мух – и похожи на неродственных им пчел? Современные биологи усомнятся в этом и выдвинут гипотезу, что окраска этих мух возникла в процессе эволюции, поскольку сходство с пчелами давало им какое-то преимущество. В чем может заключаться это преимущество?

Для того чтобы ответить на этот вопрос, нужны какие-то идеи или гипотезы, которые позволят объяснить сделанные наблюдения. Так, можно предложить, что сходство с пчелами защищает мух от поедания хищниками или же что оно позволяет мухам, обманув пчел, проникнуть в улей и полакомиться медом.

Следующий шаг состоит в том, чтобы разработать и провести эксперименты, которые позволят проверить выдвинутые гипотезы. Некоторые гипотезы для науки бесполезны, потому что их нельзя проверить. Например, гипотеза о том, что «хищники принимают безобидных мух за опасных пчел», не поддается проверке, так как вы не можете узнать, о чем думает то или иное животное. Но даже если гипотезу можно проверить, это обычно не удастся сделать непосредственно; надо прежде придумать какое-нибудь вытекающее из нее и поддающееся проверке предсказание.

Допустим, что вы на основе своей первой гипотезы (о том, что окраска мухи защищает ее от хищников) делаете следующее предсказание: если данный хищник был ужален пчелами и научился не трогать их, то он не станет нападать на муху, которая выглядит как пчела. Это предсказание можно проверить.

Для проведения соответствующего эксперимента нужен хищник, питающийся насекомыми. Таким хищникам может быть, например, жаба, которая ловит насекомых, летающих или ползающих поблизости от нее. Если в садок с «неопытной» жабой, ранее не встречавшейся с пчелами, выпустить этих насекомых, то она поймает несколько штук, поймет, что они жалят, и откажется от дальнейшей охоты. Если затем, поместив в садок муху, имеющую полосатую, черную с желтым, окраску, мы убедимся, что жаба откажется от этой мухи, то, следовательно, наша гипотеза, согласно которой сходство мухи с пчелой спасает ее от хищников, подтверждается.

Но, быть может, пчелы здесь совсем ни при чем. Быть может, жабы просто не едят полосатых мух. Чтобы проверить это, придется использовать еще одну «неопытную» жабу. Если окажется, что жаба охотно пожирает мух в черную и желтую полоску, то значит, вы получили дополнительное подтверждение гипотезы о том, что преимущество полосатого наряда мухи объясняется его сходством с окраской пчелы.

Настоящим научный эксперимент должен непременно сопровождаться контрольным экспериментом, который отличался бы от основного эксперимента одним (и только одним) фактором. В рассматриваемом здесь случае необходимо, чтобы обе используемые жабы практически не отличались друг от друга, т.е. принадлежали к одному виду, были одного пола, одного возраста и имели одинаковые размеры. Их следует содержать в одинаковых садках, при одинаковых условиях освещения. Температуре, влажности и т.п. Единственное различие между ними должно состоять в том, что одна жаба до того, как ей предложат муху, уже имела возможность столкнуться с пчелой, а другой жабе такой случай не представился. Без контрольного эксперимента может возникнуть

мысль, что жаба отказывается от полосатых мух по какой-то иной, не учтенной нами причине, например, потому, что она не голодна, вы же делаете ошибочное заключение, что дело здесь в сходстве с пчелами. (Фактически вы можете провести еще один контрольный эксперимент, предложив первой жабе безобидную комнатную муху после того, как она откажется от полосатой мухи; это позволит проверить, действительно ли жаба сыта.)

Итак, вы проверили хорошо поставленный научный эксперимент. Какие выводы вы можете сделать? Вернемся снова к гипотезе «сходство мухи с пчелами защищает ее от хищников». Удалось ли вам доказать это? Нет; вы всего лишь показали, что одна жаба отказалась от полосатой мухи после того, как она научилась отказываться от пчел, тогда как другая жаба, никогда не имевшая дела с пчелами, поела полосатых мух.

Исследователи не принимают результаты эксперимента до тех пор, пока не убедятся в их воспроизводимости. Возможно, многократного воспроизведения результатов позволяет избежать ошибок двух типов. Во-первых, при проведении эксперимента можно допустить случайную ошибку: например, перепутать жаб, перепутать мух с пчелами, записать результат не в ту графу в журнале, напугать жабу, уронив ее или произведя сильный шум (даже в таком простом эксперименте возможность ошибок безгранична). Во-вторых, на ваши результаты может повлиять ошибка выборки. Вы использовали очень не большую выборку – только двух жаб – и эти жабы почти наверное в каких-то отношениях не могут служить адекватными представителями популяции в целом. Достоверность результатов можно повысить, если многократно повторять эксперимент, используя большее число жаб и в точности воспроизводя те же условия. Сколько следует использовать жаб? Чем больше, тем лучше, но было бы не практично (и утомительно) проводить эксперимент на всех жабах земного шара. На самом деле существуют статистические методы, позволяющие определить, на сколько «надежны» результаты при данной величине выборки. Если некоторые жабы ведут себя не так, как вы ожидали, то можно, опять-таки с помощью статистических методов, установить, не отклоняются ли полученные результаты от ваших предсказаний настолько, что следует отказаться от принятой гипотезы.

Проделав все это, очень обидно осознать, что абсолютную верность гипотезы доказать не возможно, гипотезу можно лишь опровергнуть. В чем тут дело? Верная гипотеза порождает предсказание, которые кажутся правильными, но правильными могут оказаться и предсказания, сделанные на основе неверной гипотезы. Следовательно, справедливость предсказаний еще не доказывает истинность гипотезы, из которой эти предсказания вытекают. Так, возвращаясь к рассмотренному выше случаю, вы не когда не сможете «доказать», что черно-желтые полосы спасают мух от хищников. Однако вы можете опровергнуть, по крайней мере, некоторые из тех гипотез, которые вы считаете альтернативными объяснениями сходству окраски мух с окраской пчел, показав, что вытекающие из них предсказания не правильны. Вы можете также подвергнуть проверки

предсказания о том, что окраска мух отпугивает «знакомых с пчелами» хищников; для этого следует сделать дополнительные эксперименты, используя вместо жаб лягушек, птиц, ящериц и других хищников питающихся насекомыми. Чем больше альтернативных гипотез вам удастся опровергнуть и чем большее число разных хищников откажется от полосатых мух после близкого знакомства с пчелами, тем убедительнее вы докажете правильность своей гипотезы.

Гипотеза, подтвержденная многочисленными и разнообразными данными, полученными в результате воспроизводимых экспериментах, обычно считается теорией и в конце концов рассматривается как научно установленный «факт».

4.2. Правила написания и оформления научной работы

Автор исследовательской работы должен: назвать проблему, факт, которые создают ту или иную проблемную или неизученную ситуацию (тайну); объяснить необходимость раскрытия тайны, разрешения данной ситуации; определить полезность предполагаемого результата в случае, если заявленная проблема будет решена.

Изложение теоретических проблем должно вестись в тесной связи с современностью. Положения и выводы должны быть аргументированы и обоснованы. Факты в работе должны быть достоверными, точными, убедительными и объективными.

Источниками для написания могут служить исторические исследования, статьи газет, журналов, книг, мемуары; материалы музеев, исследований, анкетирований, опросов, записей воспоминаний очевидцев. При желании можно использовать выдержки из художественной литературы. Факты, приводимые в работе, должны иметь указание, откуда они заимствованы. Сноски необходимо делать внизу страницы или в конце работы. В них указывается фамилия и инициалы автора, название источника, том, часть, выпуск, место издания, издательство, год, страница. Работа должна быть наглядна, по возможности оформлена не только в виде реферата, но и в виде презентации

Структура оформления работы

1. Титульный лист с обозначением школы, класса, автора темы, научного куратора или руководителя, места и года написания.
2. Оглавление
3. Введение (описывается актуальность проблемы, определяются цели и задачи)
4. Заключение (формируются выводы, к которым пришел автор работы, обозначаются возможные перспективы изучения проблемы)
5. Список использованной литературы и источников.
6. Приложение (презентация, графики, схемы, таблицы, рисунки и т.п.)

Работы должны быть напечатаны на стандартных листах. Объем работы неограничен. Рекомендовано для текста, выполненного на компьютере, — размер шрифта 12–14, Times New Roman, обычный: интервал между строк — 2; размер полей: левого — 30 мм, правого — 10 мм, верхнего — 20 мм, нижнего 20 мм. При правильно выбранных параметрах на странице должно уместиться в среднем 30 строк, а в строке — в среднем 60 печатных знаков, включая знаки препинания и пробелы между словами. Текст печатается на одной стороне страницы; сноски и примечания печатаются на той же странице, к которой они относятся (через 1 интервал, более мелким шрифтом, чем текст). Все страницы нумеруются, начиная с титульного листа; цифру номера страницы ставят вверху по центру страницы; на титульном листе номер страницы не ставится. Каждый новый раздел (введение, главы, параграфы, заключение, список источников, приложение) начинается с новой страницы. Расстояние между названием разделов (заголовками главы или параграфа) и последующим текстом должно быть равно 3 интервалам. Заголовок располагается по середине строки, точка в конце заголовка не ставится. На все работы научные кураторы или руководители пишут рецензии по теме исследования. Автор работы пишет тезисы (объем 1,5–2 страницы машинописного текста).

Часть работ рекомендуется для школьников, которые выбрали биологию, как профильный предмет в 9, 10 и 11 классах. Раздел содержит основы научного метода, как базиса для школьных исследований и методические указания для проведения мини-исследований по следующим темам: Требования к исследовательской работе: Исследовательская работа должна отличаться, исследовательским характером, новизной, актуальностью, грамотным и логическим изложением материала.

4.3. Темы научных исследований с использованием биолюминесценции

1. Биолюминесцентный анализ чистоты фруктов и овощей

Известно, что фрукты обрабатывают различными вредными для человека веществами (удобрениями, пестицидами, гербицидами и т.п.).

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Глобальные экологические проблемы и пути их решения (9, 11 класс);
- Пищеварение. Гигиена питания. (8 класс);

Провести учебные исследования на предметном модуле и профильной лаборатории по определению чистоты фруктов, тепличных огурцов и помидоров, влиянию собственных соков растения на биолюминесценцию.

Цель: определить степень загрязнения поверхности фруктов.

Краткое описание: Овощи или фрукты промыть небольшим количеством воды. Смывы проанализировать биOLUMиНесцентным методом путем добавления их в пробирки с реагентом и фиксации тушения свечения.

2. Загрязнение лиственного покрова деревьев

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Глобальные проблемы. Загрязнение (9, 11 классы);
- Значение зеленых насаждений в городской среде (9, 11 классы);

Провести исследовательские работы на модуле и профильной лаборатории в рамках экологических исследований окружающей среды.

Цель: сравнить степень загрязненности лиственного покрова, взятого с деревьев, находящихся на различных расстояниях от дороги.

Краткое описание: Листья промыть водой. Образцы полученной воды проанализировать биOLUMиНесцентным методом путем добавления ее в пробирки с реагентом.

3. Изучение уровня загрязнения снежного покрова

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Глобальные экологические проблемы и пути их решения (11 класс);
- Экологические факторы, их значение в жизни организмов (11 класс);

Провести учебные исследования на предметном модуле по экологии, а также в профильной лаборатории (9–11 класс) на примере изучения экологической обстановки города по загрязнению снежного покрова, влияния на загрязнение снега удаленности от автомагистралей и др.

Цель: определить степень загрязнения снежного покрова, взятого на разных расстояниях от проезжей части или в различных районах города.

Краткое описание: растопить пробы снега, профильтровать и добавить в пробирку с реагентом, зафиксировать тушение свечения согласно методике. Сравнить с контролем и сделать выводы.

4. Пищевые добавки в продуктах питания

Обоснование: позволяет лучше раскрыть тему:

- Питание и гигиена (8 класс).

Исследовательские работы на предметный модуль и профильную лабораторию.

Цель: на примере газированных напитков измерить степень негативного влияния пищевых добавок.

Краткое описание: измерить кислотность газированных напитков с помощью лакмусовой бумажки до и после полного выпуска газов. При необходимости, довести рН с помощью мела или щелочи до нейтрального значения. Измерить интенсивность свечения в присутствии газированных напитков, сравнить результаты разных напитков с контролем.

5. Бактериальная обсемененность бытовых поверхностей

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Биосфера и человек (11 класс);
- Окружающая среда и здоровье человека (8 класс);

Работа позволяет провести школьные исследования по биологии в 9–11 кл.

Цель: измерить степень обсемененности бактериями клавиатуры в компьютерном классе, столов в столовой, парт в классе, дверных ручек в туалете.

Краткое описание: бактерий легко обнаружить с помощью биолюминесценции. С помощью ушных палочек производим соскоб с исследуемых поверхностей, помещаем в колбу с раствором. Измеряем свечение реагента «Энзимолум» в присутствии различных растворов. Чем выше свечение, тем больше бактерий было на поверхности.

6. Факторы стресса растений

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Экологические факторы и живые организмы (9, 11 классы);
- Приспособительные адаптации растений к условиям окружающей среды (9, 11 классы).

На основе данной работы возможно проведение мини-исследования в школе по исследованию роста растений, важная тема для сельского хозяйства.

Цель: исследовать факторы стресса растений.

Краткое описание: по уровню НАДН в соке растения возможно судить о его физиологическом состоянии. Взять лист растения до стресса, измельчить, профильтровать и измерить уровень свечения в присутствии вытяжки, не поливать растение несколько дней и сделать аналогичные измерения. Аналогичные измерения провести при условии кислотного полива, а также при темном освещении. Сравнить полученные результаты.

7. Влияние остаточной дезинфекции на живые организмы

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Биосфера и человек (11 класс);
- Окружающая среда и здоровье человека (8 класс);

Работа позволяет провести школьные исследования по биологии в 9–11 кл.

Цель: измерить степень обсемененности бактериями клавиатуры в компьютерном классе, столов в столовой, парт в классе, дверных ручек в туалете.

Краткое описание: бактерий легко обнаружить с помощью биолюминесценции. С помощью ушных палочек производим соскоб с исследуемых поверхностей после дезинфекции, помещаем в колбу с раствором. Измеряем свечение реагента «Энзимолум» в присутствии различных растворов. Чем выше свечение, тем больше бактерий было на поверхности.

8. Степень токсичности цветущего водоема*

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Организм и среда. Экологические факторы (9, 11 классы);
- Биотические факторы среды (9, 11 классы);
- Влияние человека на экосистемы (11 классы).

Цель: исследовать степень токсичности цветущей воды.

Краткое описание: пить воду, из цветущего водоема очень опасно, поскольку сине-зеленые водоросли (цианобактерии), проживающие в таком водоеме, выделяют в воду токсины. Не пригодна для питья вода из неухоженного аквариума, которую берут для этого опыта. Приготовить чистую воду такой же кислотности и температуры, сравниваем свечение в присутствии контрольного образца воды и воды из аквариума.

**–работа делается по аналогии, приведенной в лабораторной работе «Бактериальная обсемененность бытовых поверхностей» только после дезинфекции исследуемого объекта.*

9. Определение токсичности выделений человека

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Вредные привычки и здоровье человека (8 класс);

Цель: исследовать параметр токсичности выделений человека.

Краткое описание: измерить интегральную токсичность мочи и пота человека.

10. Свечение живых организмов как метод биологических исследований

Обоснование: позволяет лучше раскрыть темы:

- Методы познания живой природы (9, 10 класс);
- Обмен веществ и превращение энергии. Энергетический обмен (10 кл.);
- Биотехнология: достижения и перспективы развития (11 класс);
- Глобальные экологические проблемы и пути их решения.

Работа демонстрирует достижения биотехнологии и современные биологические методы исследования.

Цель: познакомится с явлением биолюминесценции.

Краткое описание: познакомить учеников с явлением биолюминесценции и его практическими применениями в биологии и медицине. Провести наблюдение свечения бактериальной люминесцентной системы, ответственной за свечение бактерий на специальном приборе – люминометре.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Вы ни за что не увидите мир, даже широко раскрытыми глазами, без заинтересованного согласия сердца и распахнутой, как окно, души. И никогда не поймёте его без чувственного опыта впечатлений, каким бы сильным не был ваш интеллект. Будьте оптимистами, ставьте невыполнимые на первый взгляд задачи.

Николай Сетков

Биология – наука, породившая огромное количество специальных терминов и понятий, без знания которых невозможно освоить ни один её раздел. Поэтому мы предлагаем читателям небольшой словарь, описывающий термины, встречающиеся в книге, и позволяющий не только выучить их, но и узнать, как они образовались (их происхождение, называемое этимологией* слов).

**Этимология (от греч. "etymon" – истина и "logos" – слово).*

Автокатализ. От греч. "autos" – сам и "katalysis" – разрушение. Ускорение химической реакции, вызываемое одним из её продуктов.

Автотрофы. От греч. "autos" – сам и "trophe" – питание. В буквальном смысле, "самопитатели". Организмы, способные за счёт фотосинтетических или хемосинтетических процессов усваивать неорганические вещества и создавать органические соединения (прежде всего углеводы из CO₂ и H₂O). Автотрофы обнаруживаются только в царстве растений и среди прокариот (бактерии фото- и хемосинтетики).

Алифатический. От греч. "aleiphatos" – жир, масло. Буквально, жирный. Термин используется для обозначения нециклических соединений углерода, в основном относящихся к жирным кислотам и некоторым аминокислотам (алифатические аминокислоты – аланин, глицин, валин, изолейцин).

Акворин. От названия гидромедуз рода "Acquorea" и греч. "prote(in)" – белок. Фотобелок (фотопротеин), схожий по своим свойствам с другим фотопротеином обелином.

Аллергия. От греч. "allos" – другой, "ergon" – действие и "-ia" – условия. Повышенная реактивность (сверхчувствительность) иммунной системы организма к каким-либо антигенам*, вызванная предшествующим воздействием этих активных физиологических факторов на данный организм. В этом случае антигены называются аллергенами. Аллергия сопровождается рядом болезненных симптомов (от крапивницы – розовых пятен и волдырей на коже до аллергического насморка и анафилаксии*, протекающей с нарушением дыхания и потерей сознания) и проявляется как опасное заболевание.

**От греч. "anti" – против и "genan" – порождать (буквально, "противопорождающие", или выступающие против антител). Антигены – это любые потенциально опасные вещества, вызывающие образование антител, и поэтому антитела играют роль молекул, связывающих антигены. Антигенами могут быть белки, полисахариды и крупные молекулы липидов вирусов и бактерий, а также пищевых продуктов и продуктов жизнедеятельности животных. Сильным аллергенным действием обладает пыльца различных растений.*

***От греч. "ana" – вновь и "aphylaxia" – беззащитность. Приобретённая форма повышенной чувствительности организма к антигенам.*

Альгиназы. От лат. "alga" ("algae") – морская трава, водоросль и суффикс "аза", указывающий на то, что это фермент. Ферменты, разрушающие альгиновые кислоты и их соли альгинаты*, представляющие собой кислые структурные полисахариды, которые относятся к природным гелеобразователям (см. статью Гель). Альгинаты содержатся в бурых водорослях, в частности, в ламинарии, или "морской капусте", а также в некоторых бактериях и используются в качестве сырья для изготовления синтетического шёлка. Показано, что альгинаты могут стать новыми компонентами для производства перспективных типов миниатюрных аккумуляторов, применяемых в различных "гаджитах".

Амфибии. От греч. "amphibios" – живущие повсюду, где "amphi" – и там и тут, вокруг (всюду) и "bios" – жизнь. Земноводные животные.

Антиоксиданты. От греч. "anti" – против и фр. "oxydee" – окисленный. Вещества, с помощью которых клетки поддерживают низкий уровень опасных для них веществ, образующихся в процессе реакций, связанных с клеточным дыханием и называющихся оксидантами. Оксиданты очень реакционноспособные молекулы, содержащие активный кислород, и способные разрушать не только клеточные мембраны и белки, но и вызывать повреждения (мутации) в ДНК. К антиоксидантам относятся некоторые хорошо известные природные вещества такие как, например, витамины А, Е и С..

Ассоциаты молекул. От лат. "associatio" – соединение. Соединение (группировка) нескольких молекул в определённую функциональную совокупность, а также сама совокупность таких объединённых вместе молекул.

АТФ. Аденозинтрифосфат – эфир фосфорной кислоты и аденозина, молекула которого содержит высокоэнергетические связи, которые обозначаются знаком ".". АТФ – непосредственный предшественник адениловых нуклеотидов в составе молекул РНК и ДНК. Служит основным поставщиком и хранилищем энергии в клетке (универсальным переносчиком химической энергии) и образуется в митохондриях. Образно АТФ называют единой разменной "энергетической монетой", или "жизненной силой", используемой всеми живыми клетками при молекулярных превращениях, протекающих с затратой энергии*. Синоним – аденозинтрифосфорная кислота.

**Центральную роль АТФ в энергетическом обмене показали в 1940 г. американские биохимики немецкого происхождения Фриц Альберт Липман (F. A. Lipman, Нобелевская премия, 1953 г.) и Герман Мориц Калькар (H. M. Kalckar).*

Аэробы От греч. "алг" – воздух и "bios" – жизнь. Живые организмы, потребляющие кислород из окружающей среды (воды или воздуха).

Бактерии. От греч. "bakteria" – палочка. Одноклеточные безъядерные микроорганизмы*, линейные размеры которых находятся в пределах 1 порядка мкм (0,5–20 мкм), относящиеся к надцарству прокариотов. Бактерии составляют отдельную большую группу самостоятельных организмов, включающую эубактерии (истинные бактерии) и археи (древнейшие бактерии). Мир бактерий ошеломительно многообразен. Великий русский учёный Владимир Иванович Вернадский (1863–1945) вездесущий мир организмов-невидимок образно назвал "всевсудным". Многие бактерии живут в самых примитивных или предельно экстремальных для жизни условиях, нуждаясь для роста и размножения лишь в ограниченном числе простейших молекул, содержащих химические элементы, входящие в состав живых организмов. Бактерии вездесущи, они обитают не только во внешней среде, но и внутри многоклеточных организмов (достаточно вспомнить кишечную микрофлору человека, а также бактерии, вызывающие многие заразные заболевания). Правильнее сказать, что макроорганизмы, включая человека, живут внутри мира микроорганизмов. Ещё правильнее – что жизнь макроскопических организмов целиком и полностью зависит от микроскопических организмов, поскольку последние играют фундаментальную роль в общем балансе биосферы, участвуя в постоянном кругообороте азота и углерода между органической материей и атмосферой.

**Мир бактерий был открыт в конце XVII века голландским учёным-самоучкой Антони Ван Левенгуком. Много позднее, в конце XIX века, огромное количество бактерий, различающихся по форме, размерам и функциям, были открыты основоположниками современной микробиологии и эпидемиологии Луи Пастером, Робертом Кохом и Фердинандом Коном.*

Большинство организмов, живущих, или когда-либо существовавших на Земле, относятся к микробам. Именно они первыми освоили непростую науку жить, превратив её в высшее искусство приспособления, и заселили всевозможные уголки планеты от океанских глубин и толщ ледников до высокогорных вершин, процветая уже более трёх миллиардов лет. Возможно, древнейшими из живущих в настоящее время организмов являются бактерии, синтезирующие метан (метаногены) – не зависящие от солнечной энергии обитатели гидротермальных источников, обнаруженных в геологических системах типа Лост-Сити ("Lost-City" – "Потерянный город") на океанском дне в Атлантике.

Бактериофотофоры. От бактерии, греч. "photos" – свет и "phoros" – несущий. Бактериальные белки, способные излучать свет в видимой части спектра.

Бактериохлорофиллы. Обширное семейство пигментов зелёного цвета, молекулы которых связаны с белками фотосинтетического аппарата фототрофных бактерий, не образующих кислород (аноксигенных фотосинтезирующих бактерий). Содержат сопряжённую систему чередующихся одинарных и двойных

связей, благодаря чему они способны поглощать и передавать световую энергию. Различают бактериохлорофиллы a, b, c, d, e и g.

Биолюминесценция. От греч. "bios" – жизнь и позднелат. "luminesco" – слабо светить < "lumen" – свет. Видимое свечение, характерное для живых организмов.

Биолюминометр. Прибор для измерения потоков света.

Биофизика –

Биферментный. От лат. "bi" – два и фермент. Буквально, содержащий два фермента. Ферментная система, содержащая два фермента, включённые в последовательную цепь реакций.

Бумага Крафт. От нем. "Kraft" – сила. Прочная обёрточная бумага.

Виолаксантин. От лат. "viola" – фиалка и ксантин. Каротиноид, содержащийся в цветках фиалки.

Визуализация -

Гетеродимеры. От греч. "heteros" – другой, "di" – два и "meros" – часть. Белки, состоящие из двух различных субъединиц, кодируемых разными генами.

Гель. От лат. "gelare" – замораживать ("gelidus" – холодный, ледяной, "gelo" – застываю). Коллоидная* система с непрерывной твёрдой фазой (средой) и дисперсной** (распределённой) жидкой фазой. Внешне гель представляет собой студнеобразное вещество (например, застывший раствор желатина – желе, или студень), пронизанное каналами определённого диаметра, вследствие чего гели проницаемы. Иначе гель можно рассматривать как полимерную сетку, пропитанную растворителем. Поэтому гель подобен твёрдому телу и способен сохранять форму. Гели нашли широкое применение в молекулярной биологии и генной инженерии для разделения веществ (белков, нуклеиновых кислот). Электрофорез в гелях используется как важнейший этап установления "генного профиля" человека в криминалистике, а также при определении нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование ДНК***).

**От греч. "kolla" – клей и "eidos" – вид, похожий. Коллоиды – вещества, которые не способны к кристаллизации, и в то же время способные при определённых внешних условиях (температура, давление) переходить из твёрдого состояния в жидкое состояние – золь.*

***От лат. "dispersus" – рассеянный, распределённый в пространстве.*

****От англ. "sequence" – последовательность, порядок следования (в данном случае, нуклеотидов в ДНК).*

Гель-фильтрация. Физико-химический метод, применяемый в молекулярной биологии и позволяющий разделять белки, находящиеся в смеси, по величине и форме молекул. Разделение проводят в так называемых хроматографических* колонках, представляющих собой трубчатые конструкции с узкими входным и

выходным отверстиями в виде штуцеров. Колонки заполняют сферическими частицами набухшего геля размером 10–500 мкм, приготовленного из полимерного материала. Для разделения смеси белков, её вносят в колонку с гелем и элюируют** буферным раствором, подаваемым микронасосом. Крупные белковые молекулы, которые не способны проникать в гранулы геля, будут перемещаться по колонке с высокой скоростью. Молекулы меньшего размера (мелкие и средние) будут в той или иной степени задерживаться гранулами геля. На выходе колонки в виде отдельных фракций собирают элюат, при этом объём выхода того или иного белка зависит в основном от его молекулярной массы (чем больше объём элюата, тем меньше молекулярная масса белка). Синоним – гель-проникающая хроматография.

**От греч. "chroma" – цвет и "grapho" – пишу. Любой метод хроматографии основан на различной скорости распространения составных частей жидкой смеси веществ в твёрдом проницаемом веществе.*

***От лат. "eluo" – вымываю, смываю. Элюирование – вымывание. Элюат – смыв. Элюент – вымывающий растворитель.*

Гибридизация. От нем. "Hybridisation" < лат. "hibrida" – помесь. 1. Скрещивание организмов, генетически различающихся между собой. 2. Процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, приводящий к образованию гибрида (гибридной молекулы) ДНК/РНК.

Гидроиды. От греч. "hydor" – вода и "eidos" – вид. Гидроидные полипы. Класс водных кишечноротовых беспозвоночных животных, имитирующих своими формами растения. Большинство относится к колониальным морским организмам, для которых характерно чередование полового (медузы) и бесполого (полипы) поколений.

Гидрофильные организмы. От греч. "hydor" – вода и "phileo" – люблю. Организмы, постоянно живущие в воде (водные организмы).

Голотурии. Класс морских беспозвоночных животных типа иглокожих – обитатели дна и детритофаги (питаются разложившимися органическими остатками). Длина червеобразного (обычно) тела от нескольких мм до 2 м; покрыты мягкой кожей, в которой находятся скелетные известковые пластинки (спикулы). У некоторых тело сплошь покрыто известковыми пластинками. Многие голотурии имеют внешние придатки – щупальца, ножки, папиллы*, парус, а некоторые способны к автотомии** и эвисцерации***. Синоним – морские огурцы (например, трепанги).

**От лат. "papilla" – сосочек.*

***От греч. "autos" – сам и "tome" – разрезаю. Способность некоторых видов животных самостоятельно отделять часть тела.*

****От лат. "eviscero" – вынимать внутренности ("viscera" – потроха). Способность некоторых организмов выбрасывать наружу внутренности.*

Дезинфекция. От лат. "des" – отсутствие и инфекция, где лат. "infectio" – порча, (зараза). Комплекс мер, направленных на уничтожение возбудителей заразных заболеваний (например, применение дезинфицирующего раствора).

Денатурация. От лат. "de" ("des") – отсутствие и "natura" – природа (природные свойства). Потеря макромолекулой (белком) нативной конфигурации, например, в результате нагревания, значительного изменения pH или воздействия химических агентов. Денатурация сопровождается потерей биологической активности.

Динофлагелляты. От греч. "deinos" – страшный и "flagellatus" – снабжённый бичом. 1. Динофитовые водоросли. 2. Простейшие одноклеточные организмы из панцирных жгутиконосцев. Синоним – периденеи.

Инженеринг. От англ. "engineering" – инженерный ("ingenious" – изобретательный, искусный). Технологический подход в рамках научного направления, называемого геной инженерией, позволяющий манипулировать с молекулами нуклеиновых кислот и белков, и создавать так называемые трансгенные организмы (организмы с новыми свойствами).

Интермедиаты. От лат. "inter-medius" – промежуточный, находящийся посреди. Соединения-посредники, образующиеся в биохимических процессах.

Инфузории. От лат. "infusum" – настой*. Простейшее одноклеточное животное – представитель класса Ciliata, имеющие органы передвижения реснички. Тело инфузорий покрыто оболочкой, пронизанной мельчайшими порами, через которые выходят многочисленные реснички (у парамеций их число равно 2500). Размножаются как половым, так и бесполом путём. При бесполом размножении клетка инфузории делится на две дочерние клетки, и такой процесс может наблюдаться на протяжении многих поколений. При половом процесс происходит соединение (конъюгация) двух особей, в результате чего они обмениваются своими гаплоидными микронуклеусами. Полученный при обмене микронуклеус сливается со вторым гаплоидным ядром и, таким образом, восстанавливается исходный диплоидный набор хромосом.

**Исследуя настой сена, Антони Ван Левенгук обнаружил подвижные микроорганизмы, которые и назвал инфузориями.*

Канцерогены. От лат. "cancer" – рак и греч. "genesis" – рождающий. Вещества и физические факторы, вызывающие повреждения в генетическом аппарате клетки и приводящие к её раковому перерождению. Канцерогены могут иметь химическую, вирусную, гормональную природу, или быть физическими факторами (ионизирующее и ультрафиолетовое излучения). Канцерогены часто подавляют иммунную систему организма, которая в норме ослабевает только в глубокой старости, вот почему рак преимущественно поражает людей пожилого возраста. В то же время наследственные, генетические формы рака бывают у

детей и молодых людей. Окружающая среда сильно загрязнена канцерогенами, такими как бензо-3,4-пирен, бензатрацен, флюорантрен и холантрен. Последние два углеводорода содержатся в саже и гудроне, который используется для приготовления асфальта. К сильнейшим канцерогенам относятся гидразины (входят в состав ракетных топлив) и нитрозамины (содержатся в табачном дыме!), которые обладают органотропным действием (повреждают определённый орган, например, лёгкие). Врачи-онкологи считают, что мы живём в окружении канцерогенов, а возможности загрязнения канцерогенами пищевых продуктов беспредельны! Хорошо известно, что абсолютное большинство случаев онкологических заболеваний связано с загрязнением окружающей среды. При этом человечество истово надеется на появление чудесного лекарства, избавляющего от рака, продолжая неослабно загаживать всё вокруг.

[Кардиопротекторы.](#) От греч. "kardia" – сердце и лат. "protector" – защитник. Лекарственные соединения, защищающие сердце и его кровеносные сосуды от повреждений.

[Каротиноиды.](#) От лат. "carota" – морковь и греч. "eidos" – вид (похожий). Растительные светособирающие пигменты, содержащиеся в жёлто-красных плодах, овощах (моркови) и в других органах (например, в листьях) растений. Каротиноиды служат вспомогательными фотосинтетическими пигментами, поглощающими кванты света в коротковолновой части спектра. У некоторых микроорганизмов принимают участие в реакциях фототаксиса (перемещениях бактерий под действием света), а также в защите клеток от токсичных форм кислорода (см. статьи Антиоксиданты).

Каротиноиды, содержащие кислород, называются ксантофиллами. К каротиноидам относятся β- и Я-каротины моркови*, виолаксантин (содержится в цветках фиалки), неоксантин (содержится в листьях люцерны) и фукоксантин (пигмент бурых водорослей). Каротиноиды хорошо растворяются в жирах, поэтому овощи, содержащие каротиноиды, необходимо употреблять в пищу вместе с растительными маслами.

**Каротины являются предшественниками витамина А.*

[Квант.](#) От нем. "Quant" < лат. "quantum" – сколько. 1. Минимальное количество, на которое может изменяться дискретная по своей природе физическая величина (энергия, действие). 2. Минимальная частица, являющаяся носителем свойств какого-либо физического поля. Другими словами, квант – частица-носитель свойств какого-либо физического поля, например, квант электромагнитного поля – фотон; соответственно квант света – фотон оптического излучения.

[Кишечнополостные](#)

[Коканцерогены.](#) От лат. "co" – совместно и канцерогены. Вещества, усиливающие или проявляющие действие канцерогенов (см. статью Канцерогены).

Кольчецы. Кольчатые черви, или аннелиды. Относятся к типу первичноротых животных, имеющих вторичную полость тела (целом). Имеют двусторонне-симметричное сегментированное тело, длиной от нескольких мм до 3 м. Количество сегментов (сомитов) может достигать нескольких сотен. Обитают в морях, пресных водах и на суше (в почве).

Колонии. От лат. "colonia" – сельскохозяйственный участок, выселки, поселение < "colo" – обрабатывать, возделывать. 1. Многочисленные совместные поселения живых организмов одного вида (организмов, ведущих скученный образ жизни). Например, колонии образуют некоторые бактерии, тли, многие птицы (особенно в период гнездования). 2. Объединения организмов, остающихся связанными с материнским организмом (см. статью Колониальные организмы).

Колониальные организмы. Организмы, у которых особи дочерних поколений, образующиеся в результате бесполого размножения (почкования), остаются соединёнными с материнским организмом. Обычно колониальные организмы прикреплены к твердому субстрату и имеют более или менее развитый скелет (например, мшанки, кишечнополостные), но встречаются и свободноживущие полупрозрачные, не имеющие скелета формы, обитающие в толще воды (сифонофоры, ряд оболочников).

Комплементарность. От лат. "complementum" – дополнение, довершение. Взаимное соответствие, взаимодополняемость, например, комплементарность цепей в молекуле двухцепочечной ДНК.

Конформация. От лат. "conformatio" – форма, пространственное строение. Геометрическая форма, которую могут принимать молекулы органических соединений. Конформация может изменяться в результате вращения атомов в молекуле вокруг простых связей при сохранении порядка ковалентных связей между атомами.

Кофакторы. От лат. "co" – совместно и факторы. В общем смысле – помощники ферментов. Кофакторами ферментов могут быть ионы металлов, например, ионы цинка.

Коферменты. От лат. "co" – совместно и ферменты. Небелковые органические соединения (например, НАД⁺), участвующие в ферментативных реакциях в качестве активных центров, в составе сложных ферментов, называемых голоферментами*. Кофермент, связанный с белковой частью фермента, называемой апоферментом**, постоянно, в свою очередь, называется простетической группой***.

*Где греч. "holos" – весь, т. е. полный фермент.

**От греч. "apo" – за и фермент. Белковая часть фермента, нуждающаяся в коферменте или простетической группе.

***От лат. "prostiti" – быть выставленным. Небелковые группы ферментов, прочно соединённые с белком-ферментом.

Круглоротые. Единственный современный класс бесчелюстных животных – хищников или эктопаразитов (внешних паразитов) рыб. Тело угреобразное, покрытое богатой слизистыми железами кожей. Отличительной особенностью является рот в виде присасывательной воронки, поддерживаемой кольцевидным хрящом, откуда и произошло название "Cyclostomata"*. К круглоротым относятся два отряда – миноги и миксины. Синоним – мешкожаберные.

**От греч. "cyclos" – круг, окружность и "stoma" – рот ("stomache" – пищеварительный канал, желудок).*

Ксантофиллы. От греч. "xantos" – жёлтый и "phyllon" – лист. Жёлтые растительные пигменты из группы каротиноидов, содержащие в своей молекуле кислород.

Ламеллы. От англ. "lamella" – тонкая пластинка < лат. "lamina" – пластинка. Тонкие псевдоподии, с помощью которых адгезивные клетки распластаются по субстрату или подложке, содержащие пучки микрофиламентов. В них содержится фибриллярный белок а-актинин, а в местах прикрепления ламелл к субстрату белок – винкулин, образующий так называемые фокальные контакты. У фотосинтезирующих бактерий и водорослей.

Липофилия. От греч. "lipos" – жир и "phyleo" – люблю. Способность веществ растворяться в жирах.

Люминесценция. От позднелат. "luminesco" – слабо светить < "lumen" – свет. Физическое явление, при котором некоторые вещества, возбуждаемые внешними источниками энергии, светятся без выделения тепла.

Лютеин. От лат. "luteus" – золотисто-жёлтый, шафрановый. Жёлтый пигмент из группы флавонов, содержащийся в листовых овощах, например, в салате.

Люцифераза

Люциферин

Медузы. От названия мифического греческого чудовища. Морские кишечнополостные животные, имеющие студенистое, полупрозрачное тело, напоминающее по форме зонтик со свисающими по краям щупальцами.

Метаболиты. От греч. "metabole" – перемена. Различные биохимические продукты нормального обмена веществ (метаболизма). По-другому, промежуточные продукты обмена веществ. Изменение их концентрации без изменения количества или активности ферментов регулирует биохимические процессы, например, интенсивность дыхания.

Миристиновая кислота. Жирная, алифатическая, карбоновая, насыщенная кислота, встречающаяся в липидах, в состав которой входят 14 атомов углерода.

Может ацилировать белки (присоединяться к молекулам белков в виде ацильного остатка) и служить "якорем" для белков, которым они удерживаются на мембранах.

Модификация химическая. От позднелат. "modificatio" – видоизменение, преобразование, появление новых свойств (изначально, установление меры). Присоединение к молекуле (макромолекуле, например, белку) каких-либо дополнительных химических групп, благодаря которым она приобретает новые функциональные свойства.

Монофилетичность. Монофилия. Монофилетический. От греч. "monos" – один и "phyle" – род. 1. Предполагаемое происхождение какой-то биологической группы от одной предковой группы. Например, монофилетическая гипотеза происхождения жизни. Противоположный по значению термин – полифилия. 2. В молекулярной биологии происхождение группы близких белков от общего молекулярного предшественника. 3. В клеточной биологии – возникновение различных классов клеток от общего предшественника.

Мономерный. От греч. "monos" – один и "meros" – часть. Буквально, состоящий из одной части. Обычно белок, образованный одной полипептидной цепочкой. Понятие используется также для обозначения соединений, молекулы которых, вступая друг с другом в химическую связь, образуют полимеры. Для белков мономерами являются аминокислоты.

Мультимерные белки. От лат. "multum" – много и греч. "meros" – часть. Белки, состоящие из трёх и более субъединиц (до нескольких десятков).

Нативный. От лат. "nativus" – прирождённый, в общем смысле нетронутый. Например, нативная форма (конформация) белка. Изменение нативной конформации белка, не сопровождающееся разрывом ковалентных связей, называется денатурацией (см. статью Денатурация).

Неоксантин. От лат. "neo" – новый и греч. "xantos" – жёлтый. Пигмент из группы кислородсодержащих каротиноидов, обнаруженный в листьях люцерны. Благодаря хорошей растворимости в жирах относится к липохромам.

Обелин. От родового названия морского колониального гидроидного полипа *Obelia** и "prote(in)" – белок. Фотопротейн, представляющий собой мономерный фосфобелок (фосфопротейн) с мол. массой 30 kDa. Для обелина характерен спектр люминисценции с максимумом излучения при 469 нм. По основным физико-химическим свойствам обелин сходен с другим фотопротейном акворином.

**От греч. "obelus" – вертел.*

Облигатность. От лат. "obligatus" – обязательный. Буквально, обязательность.

Облигатный – имеющий обязательную силу. Противоположный по смыслу термин – факультативность (необязательность).

Оболочники. Животные подтипа хордовых. Тело заключено в выделяемую наружным эпителием оболочку – тунику или мантию, студенистой или хрящевой консистенции. Хорда есть только у личиночных форм. Синоним – туникаты*.

**От лат. "tunicatus" – одетый в тунику (туника – нижняя домашняя мужская и женская одежда без рукавов у древних римлян).*

Офиуры. От греч. "orphis" – змея. Класс морских животных типа иглокожих. Имеют дисковидное тело с отходящими от него 5-ю (реже 10-ю) гибкими "лучами-руками". Размеры тела вместе с лучами от нескольких мм до 0,5 м. Обитают на дне океанов и морей до глубины 8 км. Некоторые живут на донных организмах – губках, кораллах, водорослях. Питаются детритом (разложившейся органикой) или фитопланктоном и мелким зоопланктоном (см. статью Планктон). Синоним – змеехвостки.

Пилорический. От греч. "pylorus" – привратник. Относящийся к привратнику. Например, конечный (пилорический) отдел желудка млекопитающих и человека, переходящий в двенадцатипёрстную кишку ("duodenum"). Этот отдел желудка содержит только железы (пилорические железы), состоящие из главных и добавочных секреторных клеток и не содержит обкладочные клетки, выделяющие соляную кислоту. Сок пилорических желёз отличается большим содержанием слизи и имеет щелочную реакцию. Он выделяется постоянно, даже при пустом желудке в количестве нескольких миллилитров в час.

Пиявки (пиявицы). Класс кольчатых червей, имеющих уплощённое (реже цилиндрическое) тело, длиной от нескольких мм до 15 см. Тело состоит из головной и задней лопастей и 33 сомитов (колец), кожные покровы которых могут быть разделены на 3, 5 и более добавочных колец. Отличительной особенностью строения является наличие двух присосок – околоротовой и задней, с помощью которых пиявки не только присасываются к жертве, но и передвигаются по субстрату посредством попеременного прикрепления присосок. Большинство пиявок сосут кровь и тканевую жидкость у различных животных (у рыб, птиц, млекопитающих и человека), а некоторые являются хищниками. Человек давно использует в лечебной практике медицинских пиявок, слюна которых содержит эффективное противосвёртывающее вещество (предотвращающее свёртывание крови) – гирудин*.

**Протеин с молекулярной массой около 20 кДа – ингибитор тромбина (антикоагулянт, предотвращающий действие тромбина на фибриноген), содержащийся в слюне медицинской пиявки (Hirudo medicinalis), откуда и получил своё название. Кроме того, слюна пиявки содержит комплекс биологически активных веществ, получивших название бделлинов и эглинов, а также ферменты "дестабилазу" и "экстрактазу".*

Пероксидазы. Подкласс ферментов оксидоредуктаз, образующих токсичный пероксид водорода, или перекись водорода (H₂O₂) (откуда и произошло название ферментов). Эти ферменты содержатся в одиночных органоидах, названных пероксисомами и найденных в большинстве эукариотических клеток.

Планктон. От греч. "plankton" – блуждающий. Совокупность мелких организмов, обитающих в толще воды. Выделяют фитопланктон и зоопланктон. Различные виды фитопланктона являются основными фотосинтетиками, лежащими вначале пищевой (трофической) цепи в водоёмах. Многие планктонные организмы обладают особенностями, позволяющими им удерживаться во взвешенном состоянии. К ним, например, относятся воздушные вакуоли в цитоплазме радиолярий, жировые пузырьки в протоплазме диатомовых, поплавки пиросом, плавательные колокола сифонофор, высокое содержание воды в тканях (около 95 %) у медуз. "Парению" способствуют и морфологические приспособления, увеличивающие несущую поверхность, такие как зонтики у медуз, боковые выросты у ноги крылоногих моллюсков (Pteropoda), уплощённая форма клеток некоторых диатомофых, листовидная форма пароподиев у полихеты (Tomopteris) и т. д.

Полипы. От греч. "polypus", где "poly" – много и "pus" – нога. 1. В зоологии беспозвоночных – полипы общее название сидячих форм кишечнорастных животных (гидроидные полипы). 2. В медицине – патологические новообразования в виде грибовидных, пластинчатых или ворсинчатых разрастаний на поверхности слизистых оболочек, выступающие в просвет полового органа (толстого кишечника, желудка, пищевода, полости носа, гортани, матки, мочевого пузыря и др.).

Полифилетичность. От греч. "poly" – много и "phyle" – род. Предполагаемое происхождение какой-то биологической группы от нескольких предковых групп. Например, полифилетическая гипотеза происхождения жизни. Противоположный по значению термин – монофилия (см. соответствующую статью).

Поллютанты. От новолатин. "pollutio" – пачкание. Общее название веществ, являющихся загрязнителями среды обитания или загрязняющих какие-либо препараты, которые должны быть без посторонних примесей.

Прокариоты. От греч. "pro" – перед и "karyon" – ядро. Повсеместно распространённые и самые древние*, преимущественно одноклеточные организмы** (бактерии и археи, составляющие одно царство Monera), не имеющие типичного клеточного ядра, откуда и произошло их название***. Размеры прокариотических клеток варьируют от 0,5 до 20 мкм****. Клетки прокариот могут иметь форму шариков (кокки), палочек (прямых, изогнутых, спиральных), пластинок и нитей, быть неправильной формы, иметь выросты (почки, простеки) или даже иметь квадратную форму. Первоначально группу безъядерных организмов называли акариобионта (Akaryobionta),

противопоставляя их организмам, имеющим дифференцированные клеточные ядра (Karyobionta). Прокариоты характеризуются огромным генетическим разнообразием, обеспечивающим им широчайший спектр физиологических и биохимических активностей, позволяющих обитать даже в самых экстремальных условиях среды, от вулканических fumarol**** и гейзеров до глубоководных "чёрных курильщиков". Прокариотам принадлежит ключевая роль в поддержании жизни на Земле и обеспечении круговорота биогенных элементов. Систематика прокариот до настоящего времени ещё не разработана и большинство прокариотических микроорганизмов, обитающих в природе, не описано и не выделено в виде культур.

**Считается, что прокариоты возникли более 3,5 млрд. лет назад.*

***Прокариоты встречаются не только как одноклеточные организмы, но и в виде различных по сложности ассоциаций.*

****Есть и исключения. Так бактерия *Epulopiscium fishelsoni*, обитающая как кишечный симбионт в пищеварительном тракте у рыбы-хирурга *Acanthurus nigrifuscus* из Красного моря, по своим размерам в миллион раз крупнее.*

*****Прокариоты изначально определяли на основе критерия отсутствия свойств, имеющих у эукариот.*

******От итал. "fumarolla" < "fumo" – дым. Места газообразных (дымовых) выделений на дне и склонах кратеров вулканов и лавовых потоков. Особый тип fumarol – сольфатары, выделяющие особо токсичные сернистые газы (от названия вулкана Сольфатар, расположенного недалеко от Неаполя, где итал. "solfo" – сера).*

Простейшие

Протеины*. От греч. "protos" ("proteios") – занимающий первое место, первичный. Белки, состоящие только из аминокислотных остатков (простые белки). В белках аминокислотные остатки соединены друг с другом пептидной связью.

**Название было дано в 1838 г. голландским биохимиком Жераром Мюльдером, который сформулировал свою теорию протеина. Мюльдер писал: "Без сомнения это наиболее существенный из известных компонентов живой материи и, по-видимому, жизнь без него была бы невозможна. Поэтому это вещество должно быть названо протеином".*

Протеолиз. От греч. "protos" – первый и "lysis" – растворение. Ферментативный распад белков (деградация) до пептидов и аминокислот. Различают внутриклеточный протеолиз, происходящий при участии лизосом и протеасом, и протеолиз в пищеварительном тракте, протекающий в желудке и тонком кишечнике при участии пищеварительных ферментов-протеаз. Существует также автопротеолиз (автокаталитический протеолиз), при котором белок в определённых условиях самостоятельно отщепляет от себя часть аминокислот.

Радиолярии. От лат. "radiare" – испускать лучи. Морские простейшие (одноклеточные животные), обладающие внешним кремниевым скелетом, часто представленным в виде лучей самых разнообразных форм.

Интересно отметить, что радиолярии имеют самое большое число хромосом в диплоидном кариотипе (от 1000 до 1600).

Рекомбинантные штаммы. От лат. "re" – снова и "combinatio" – соединение. Штаммы микроорганизмов (чаще бактерий), несущие в себе новые гены, необходимые для биотехнологических целей, например, продуцирующие какое-либо лекарственное вещество (кишечная палочка, производящая человеческий инсулин). Другими словами, искусственно полученные микроорганизмы.

Ренатурация. От лат. "re-natus" – родиться опять, вновь появляться. Буквально, возрождаться. Восстановление нативной структуры белка или ассоциация денатурированных одиночных цепей ДНК, образующих в результате снова двойную спираль (см. статью Денатурация).

Рептилии. От лат. "reptilis" – ползающий (пресмыкающиеся животные). Животные, первыми приспособившиеся в процессе эволюции к наземной жизни и обладающие множеством анатомических, физиологических, биохимических адаптаций к существованию на суше. Например, рептилии имеют клейдоические* яйца, заключённые в плотную оболочку, предохраняющую зародыш от обезвоживания. К рептилиям относятся три отряда, включающие черепах, ящериц, змей, и крокодилов, среди которых есть виды, вторично приспособленные к существованию в пресной или морской воде (например, галапагосская игуана, зелёная черепаха и морские змеи).

**От лат. "claudio" – запираеть, затворять, прятать. Термин, описывающий увеличение степени свободы организма от внешней среды. Клейдоические яйца также снабжены большим запасом веществ (желтком), необходимых для развития будущего поколения.*

Сапрофиты. От греч. "sapos" – гнилой и "phyton" – растение. Гетеротрофные растения, грибы и бактерии, питающиеся остатками гниющих организмов. Растения, произрастающие на разлагающихся органических останках.

Саркодовые. От греч. "sarcos" – плоть и "eidos" – вид. Класс (по другой классификации – подтип) простейших (одноклеточных) организмов, тело которых не имеет определённой формы, хотя некоторые из них, например, радиолярии или раковинные амёбы имеют внутренний или наружный скелет, собираемый из песчинок. Передвижение и захват пищи осуществляют с помощью временных выростов цитоплазмы, таких как псевдоподии (ложноножки), лобоподии (выросты в виде лопасией), филоподии (выросты в виде нитей). Питаются другими простейшими, бактериями и водорослями. Большинство саркодовых – свободноживущие морские и пресноводные формы, а некоторые обитают в почве или являются паразитами. К саркодовым простейшим относятся акантарии, корненожки, радиолярии, солнечники, амёбы и фораминиферы.

Симбионты. От греч. "symbiontos" – сожительствующий. Организмы, сосуществующие совместно и в определённой степени, взаимно осуществляющие своё взаимодействие с окружающей средой.

Споровики. От греч. "spora" – семя, семя. Буквально, рассеянные. Класс паразитических одноклеточных животных (простейших), включающий три подкласса – грегарины, кокцидии и пироплазмиды. Паразитируют в клетках, тканях и органах человека и животных, вызывая тяжёлые заболевания (например, малярию). Передача паразитов происходит через пищу или кровососущими насекомыми (например, комарами).

Сцифоидные медузы. От греч. "skyphos" – чаша, кубок и "eidos" – похожий вид. Особи полового поколения у кишечнополостных животных класса сцифоидных*. Обитают в толще воды и способны к активному плаванию**. Синоним – сцифомедузы.

**Класс одиночных морских беспозвоночных животных, принадлежащих к типу кишечнополостных и похожих на перевёрнутые вверх дном чаши. Развитие происходит с чередованием поколений. Из яиц выходят личинки, превращающиеся в полипы (сцифистомы), которые образуют личинки сцифомедуз.*

***В 2012 г. американские биоинженеры из Гарвардского университета и Калифорнийского технологического института (США) в совместной работе сконструировали искусственного сцифоидного медузоида (буквально, похожий на медузу). Медузоид диаметром в 1 см был изготовлен из упругого силикона, внутрь "тела" которого были помещены живые клетки сердечной мышцы крысы (кардиомиоциты), способные к сокращению. При помещении медузоида в воду и пропускании через неё электрических разрядов он плавал, производя завихрения воды, подобно живой медузе.*

Субъединицы. От лат. "sub" – под и единица. Термин используется для обозначения отдельных белковых молекул (полипептидов), которые входят в состав сложных (мультимерных) белков. Субъединицы могут быть одинаковыми (гомомерные белки) или разными (гетеромерные белки). В последнем случае субъединицы кодируются разными генами (например, альфа- и бета-цепи в молекуле гемоглобина).

Субстрат. От лат. "substratum" – подстилка, подкладка, где "sub" – под и "stratum" – ложе, постель, слой (стерно). 1. Вещество, на которое воздействует фермент. 2. Предмет или вещество, на котором обитают организмы, а также культивируются клетки или микроорганизмы.

Таксон. От англ. "taxon" < лат. "taxare" – оценивать (греч. "taxis" – расположение по порядку). Любая систематическая группа организмов.

Таксономия. От англ. "taxon" и греч. "nomos" – закон. В узком понимании – наука о номенклатуре, описании и классификации организмов. Строится на подразделении организмов на группы для демонстрации степени их сходства и предполагаемых эволюционных взаимосвязях. В нисходящем порядке таксономия включает следующие категории: царство, тип, класс, отряд (для растений и бактерий – порядок), семейство, род, вид, подвид или разновидность.

Термостабильность. От греч. "therme" – жар, тепло. Способность выдерживать температуру, выше нормальной физиологической температуры.

Тилакоиды. От греч. "tilatio" – сумка, мешок и "eidos" – похожий.

1. Система трубчатых, пластинчатых, или, наконец, сферических цистерн, локализованных в клеточном матриксе прокариотических клеток, способных к фотосинтезу (зелёных, пурпурных и цианобактерий). Представляют собой крупные структурированные впячивания плазматической мембраны. В функциональном отношении эквивалентны пластидам, а в бесцветных клетках – митохондриям эукариот. К другим сложноструктурированным впячиваниям плазматической мембраны относятся мезосомы.

2. В хлоропластах растительных клеток система ламелярных структур в виде уплощённых мешочков (цистерн), окрашенных в зелёный цвет за счёт присутствия хлорофилла. Выделяют длинные тилакоиды стромы, представляющие собой сетевидно переплетённые выросты внутренней мембраны, которыми от края до края пронизаны хлоропласты. Вокруг них группируются плотно упакованные тилакоиды гран, которые образуются из накладывающихся друг на друга выростов стромальных тилакоидов (как стопки монет). Все тилакоиды образуются из складок внутренней мембраны хлоропластов.

Токсичность. От греч. "toxokon" – яд. Ядовитость, способность оказывать вредное воздействие на организм.

Турбеллярии. От лат. "turbellarum" – суматоха, смятение. Плоские ресничные черви, тело которых покрыто однослойным реснитчатым эпителием и многочисленными эпителиальными железами, вырабатывающими слизь. Реснички способствуют перемещению червя, вызывая возмущение среды, откуда и возникло название. Среди эпителиальных желёз выделяются рабдитные клетки, содержащие преломляющие свет палочки – рабдиты*. При раздражении червя рабдиты выбрасываются наружу и при соприкосновении с водой ослизняются, образуя защитный слой слизи.

**От греч. "rhabdos" – палочка, полоска и "eidos" – вид.*

Факультативность. От лат. "facultatis" – способность, возможность. Обладающий альтернативными возможностями (предоставляющий выбор). Например, факультативные механизмы метаболизма часто свойственны микроорганизмам.

Фенотипическая адаптация. От греч. "phaino" – являю, обнаруживаю, "typos" – отпечаток, форма и позднелат. "adaptatio" – приспособление, прилаживание. Появление приспособительных признаков у организма, не сопровождающихся генотипическими изменениями.

Ферментативные реакции. Биохимические реакции, протекающие при участии ферментов. Кроме живой клетки, ферментативные реакции могут протекать и в бесклеточной, в том числе искусственно созданной среде (реакции в пробирке или реакции в системе in vitro).

Ферменты*. От лат. "fervere" – кипеть. Белковые высокоспецифические и избирательно действующие биокатализаторы, ускоряющие биохимические реакции в живой клетке. Каждый фермент обладает субстратной специфичностью и катализирует только одну определённую реакцию, т. е. обладает специфичностью действия. В ходе реакций сами ферменты не изменяются, а только ускоряют протекание реакций**. Биохимики составили каталог ферментов, в котором каждый из них снабжён номером и "систематическим" названием. Как правило, названия ферментов оканчиваются на суффикс "...аза". Синоним – энзимы.

**В научный обиход этот термин ввёл голландский иатрохимик Я.Б. ван Гельмонт (1579–1644 гг.), предположивший, что спиртовое брожение вызывается какими-то веществами. Гельмонт не придумал термин, а взял его у древнеримского учёного Плиния Старшего, который ещё в I в. н. э. процесс брожения назвал "ферментацией", поскольку при брожении выделяются пузырьки углекислого газа и кажется, что жидкость как бы кипит.*

***На самом деле ферменты не только ускоряют или замедляют уже начавшиеся биохимические реакции, но и обладают способностью их инициировать.*

Фикобилинпротеиды. От греч. "phykos" – водоросль, лат. "bilis" – желчь, "protein" – белок и "eidos" – вид. Сложные пигменты цианобактерий и красных водорослей, участвующие в поглощении света. Состоят из белковых субъединиц, содержащих фикобилины – дополнительные небелковые группы, которые называют простетическими группами*.

**От лат. "prostiti" – быть выставленным. Небелковые группы ферментов, прочно соединённые с белком-ферментом, в отличие от кофакторов, которые ассоциируются со своими коферментами (белками-ферментами) только во время реакции.*

Фикобилины. От греч. "phykos" – водоросль и лат. "bilis" – желчь. Близкие по строению к хлорофиллу пигменты – синий фикоциан (или фикоцианин) и красный фикоэритрин, присутствующие в клетках красных (багряных) водорослей и цианобактерий.

Фикоцианобилины. От греч. "phykos" – водоросль, "kyanos" – лазурный, небесно-синий и лат. "bilis" – желчь. Синие пигменты из группы фикобилинов, способные поглощать и переносить на хлорофилл кванты солнечной энергии. Синонимы – фикоцианы, фикоцианины.

Фикоэритрины. От греч. "phykos" – водоросль и "erythros" – красный. Пигменты из группы фикобилинов, играющие роль дополнительных фотосинтетических молекул-акцепторов, передающих энергию света на хлорофилл. Содержатся в клетках красных водорослей и цианобактерий.

Филогенетическое древо. Филогенез. От греч. "phyle"* – племя, колено и "genesis" – происхождение, развитие. Полная эволюционная история вида (эволюционная родословная), включая процесс образования и развития более высоких таксономических подразделений – родов, семейств, отрядов, классов и типов в течение всего времени существования жизни на земле (см. статью Онтогенез). Синоним – филогения.

**Лат. "filia" – дочь.*

Филогенетика. От греч. "phyle" – племя, колено и генетика. Раздел эволюционной науки, изучающий закономерности исторического развития различных таксономических групп организмов в течение геологического времени.

Филогенетический. От греч. "phyle" – племя, колено и "genesis" – происхождение, развитие. Имеющий отношение к филогенезу. Например, филогенетический ряд.

Филогения*. От греч. "phyle" – племя, колено (родовое колено, поколение) и "genesis" – происхождение, развитие. Под филогенией понимают ход, скорость и характер эволюции той или иной группы организмов в пределах геологического времени.

**Термин впервые был предложен немецким биологом-эволюционистом Эрнестом Геккелем (Haeckel, 1834–1919) взамен более старого термина "систематика". Геккель также предложил первое "родословное древо" животного мира, сформулировал биогенетический закон и создал теорию происхождения многоклеточных организмов от двухслойного предка под названием "гастрола".*

Фитол. От греч. "phyton" – растение и суффикс "ол", указывающий на то, что это спирт. Фитолом является длинный "хвост" молекулы хлорофилла, состоящий из 20-ти углеродных атомов.

Флавины. От лат. "flavus" – беловатый, рыжеватый. Пигменты жёлто-оранжевого цвета, являющиеся компонентами (простетическими группами) сложных белков флавопротеинов. К флавинам, например, относится рибофлавин (витамин В2). Синоним – флавоны.

Фотопротеины. От греч. "photos" ("phos") – свет и "protein" – белок.

Фототрофы. От греч. "photos" ("phos") – свет и "trophe" – питание. Организмы, синтезирующие органические вещества из углекислоты и воды за счёт энергии света. К фототрофам относятся зелёные растения, водоросли и некоторые микроорганизмы (бактерии). Синоним – автотрофы (см. статью Автотрофы).

Фукоксантин. От лат. "fucus" – лишайник и греч. "xantos" – жёлтый. Коричневый пигмент бурых водорослей. Присутствует в клетках, например, у *Laminaria saccharina* – обитательницы северных морей, а также у диатомовых водорослей и динофлагеллят. Определяет окраску таллома (тела) бурых водорослей.

Штамм. От нем. "Stamm" – ствол, основа. Чистая культура микроорганизмов какого-либо вида. Иначе, совокупность микроорганизмов полученных из одной клетки (в этом смысле соответствует термину клон).

Хемолюминисценция. От позднегреч. "chemo"– химия и лат. "luminesco" – слабо светиться. Свечение, вызванное химическими процессами (реакциями), не сопровождающееся выделением тепла.

Хемотробы. От позднегреч. "chemo"– химия и "trophe" – питание. Организмы (бактерии), способные усваивать CO₂ за счёт энергии, получаемой при окислении неорганических соединений. К хемотрофам, например, относятся аэробные бактерии (водородные, нитрифицирующие, тионовые и др.), которые усваивают CO₂ так же, как при фотосинтезе. Анаэробные хемотробы восстанавливают, например, соединения серы. В 2011 г. обнаружены бактерии, обитающие в условиях вечной мерзлоты, в лавовых трубках из оливина* на высоте 5000 м в Каскадных горах (Северная Америка). В отсутствие органического материала и кислорода эти бактерии для получения энергии окисляют оливинное железо (т. е. относятся к литотрофам**). В то же время, бактерии, добытые из льда, в условиях с нормальным содержанием кислорода и при комнатной температуре способны использовать в качестве источника энергии сахар, т. е. являются факультативными хемотрофами. Синонимы – хемосинтетики, литотрофы. Минерал оливин имеет вулканическое происхождение и содержит не окисленное железо (состоит из силикатов магния и железа). Получил своё название из-за жёлто-зелёного цвета от лат. "oliva" < "oleum" – масло.

***От греч. "litos" – камень и "trophe" – питание. Микроорганизмы, живущие за счёт преобразования минеральных химических соединений.*

Хитиназа. Фермент, гидролизующий полисахарид хитин*.

Хитин. От греч. "chitfn" – оболочка, покров, туника. Полисахарид – основной компонент наружного скелета насекомых и панцирей ракообразных (водных рачков, например, креветок). Хитин – также главный волокнистый компонент клеточных стенок грибов. Из хитина морских крабов получают полисахаридное вещество хитозан, на основе которого изготавливается сорбционный и повязочный материал.

Целентеразин. От греч. "koiloma" ("koilos") – целом, полость и "enteron" – кишечник. Фермент-субстратный комплекс белка фотопротеина и люциферина.

Экстракт

Эукариоты. От греч. "eu" – хорошо и "karyon*" – ядро. Одна из двух важнейших групп организмов, обитающих на Земле, в клетках которых присутствует морфологически выраженное ядро, а также набор обязательных мембранных внутриклеточных структур – органоидов (органелл), выполняющих специфические клеточные функции. Считается, что первая эукариотическая

клетка появилась примерно 1–1,2 млрд. лет назад. К эукариотам относятся все животные, растения, грибы и простейшие. Условно выделяют подгруппу низших эукариотов, к которым относятся дрожжи. По-видимому, митохондрии и пластиды эукариот произошли от бактерий. Поэтому эукариотические клетки следует рассматривать как химерные образования**, многие гены которых имеют происхождение от прокариот. По современным представлениям все эукариоты составляют единый эволюционный домен Eukaria, включающий четыре царства – протисты (простейшие), грибы, растения и животные, идентичные по молекулярной и клеточной организации.

**В Древней Греции кариями (лат. "Carya") назывались ореховые рощи, а также девушки, гуляющие в этих рощах и распеваящие песни. Отсюда колонны в виде женских скульптур, поддерживающих свод зданий, называются кариатидами. Винная пальма, иначе называемая "тодди-пальма" или "жгучая пальма" имеет латинское название кариота (Caryota urens) – одна из самых быстрорастущих и самая короткоживущая пальма (растение, погибающее после единственного акта цветения и плодоношения).*

***Считается, что идея симбиотического происхождения эукариотов за счёт слияния (гибридизации) в единое целое двух различных древних микроорганизмов, в результате чего возникла новая более прогрессивная форма жизни, принадлежит американскому цитологу и эволюционному биологу Линн Маргулис (Lynn Margulis, p. 1938).*