

УДК 504.54.001.5+504.064

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ
ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОБНОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ
ОЦЕНКИ ИНГИБИРОВАНИЯ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ
АКТИВНОСТИ *BACILLUS PUMILIS***

П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская

Аннотация

Для определения токсичности плотных сред представлен микробный тест на основе оценки ингибирования дегидрогеназной активности культуры *Bacillus pumilis* и определены метрологические характеристики различных методов его реализации: прецизионность метода, а также интервалы концентраций стандартного токсиканта (Cr), вызывающих 50% ингибирование дегидрогеназной активности. Продемонстрирована большая чувствительность контактного метода биотестирования по сравнению с элюатным методом.

Введение

Развитие промышленности и рост потребления неизменно приводят к загрязнению окружающей среды. Несмотря на внедрение разнообразных мероприятий по обращению с отходами, таких, как вторичное использование, компостирование и т. д., огромные количества загрязняющих веществ поступают в природные комплексы. Так, согласно Реестру загрязнителей, составяемому в Соединенных Штатах Америки, в 2002 г. в результате деятельности промышленных предприятий этого государства в окружающую среду поступило 2.17 млрд. кг токсичных материалов 518 наименований [1]. Около 53% из них, или 1.15 млрд. кг, размещается бесконтрольно, что влечет за собой загрязнение природных сред. Способы распределения, особенности взаимодействия и стабильность большинства поллютантов изучены слабо либо не изучены вообще. Не менее важно и то, что для эффективного природоохранного управления необходима информация о степени опасности загрязняющих веществ для окружающей среды, прежде всего, их токсичности [2]. В последнее время для оценки состояния природных сред и токсичности антропогенных объектов все чаще применяется экосистемный подход, который позволяет комплексно оценить влияние химических веществ на различные компоненты среды, цепи питания и экосистемные функции [3]. Одним из основных методов при экосистемном подходе является биотестирование, которое, в отличие от методов химического анализа, позволяет оценить не отдельные компоненты, а комплексное влияние токсичных веществ, содержащихся в исследуемом образце. Наибольшую сложность для анализа представляют плотные многокомпонентные среды, такие, как почвы, промышленные отходы и осадки сточных вод.

Тест-объекты, используемые в биотестировании почв и близких к ним сред, должны обладать определенным набором качеств. Во-первых, они должны быть достаточно чувствительными к загрязнению среды, во-вторых, они должны выполнять одну из почвенных функций, в-третьих, полученные результаты должны быть хорошо воспроизводимы, в-четвертых, процедура биотестирования должна быть кратковременной и методически простой [4, 5]. Микроорганизмы, обеспечивающие функционирование основных звеньев круговорота элементов, обладающие высокой скоростью размножения и чувствительностью к токсичным веществам, часто применяются в качестве тест-объектов при оценке состояния почв и других плотных сред [6]. Требования к микробным тестам для оценки токсичности описаны в международной системе стандартов ИСО [7], однако, в отличие от методов для водных сред, тесты для плотных сред разработаны недостаточно хорошо. В основном эти методы основаны на получении водного экстракта (элюата) и на анализе его токсичности. Интерпретация результатов, полученных таким способом, крайне сложна, так как загрязняющие вещества имеют различное сродство к почвенным комплексам и различную растворимость [8, 9]. В работах Ronnpage и Abbondanzi [10, 11] описаны перспективы так называемых «контактных» микробных тестов, в которых, в отличие от традиционных элюатных тестов, исследуемый образец приводится в непосредственный контакт с тест-объектом. Ранее нами была продемонстрирована принципиальная возможность применения контактного теста с использованием бактерии *Bacillus pumilis* для определения токсичности почвенных образцов, а также показано, что чувствительность контактного метода сравнима с чувствительностью метода, основанного на оценке активности аборигенной микрофлоры почв [12]. В то же время для того, чтобы рекомендовать широкое применение методики, необходимо проведение исследований, позволяющих оценить ее прецизионность, а также определить интервалы концентраций стандартных токсикантов в пределах которых наблюдается ингибирование тест-функции. Также представляют интерес и сравнительные данные о чувствительности *Bacillus pumilis* в случае применения контактного и элюатного методов биотестирования.

Цель данной работы – определение метрологических характеристик микробного теста на основе оценки ингибирования дегидрогеназной активности *Bacillus pumilis* при исследовании водных образцов, а также плотных сред контактными и элюатными методами.

1. Материалы и методы исследования

Тест-объектом служила грамположительная бактерия *Bacillus pumilis* КМ-21. Культура микроорганизмов получена из коллекции кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

Хранение культуры осуществляли в пробирках на мясо-пептонном агаре. Культивирование проводили при 28°C в колбах на 250 мл с 50 мл L-бульона (г/л): пептон – 10 мл, дрожжевой экстракт – 5 мл, NaCl – 10 мл. Для биотестирования культуру инкубировали до достижения оптической плотности

0.8–0.9 опт. ед. Оптическую плотность культуры определяли на ФЕК-4А ($\lambda = 600$ нм, кювета 10мм).

Аналізу на токсичность подвергали водные растворы $K_2Cr_2O_7$ и почвы, искусственно загрязненные $K_2Cr_2O_7$, и без внесения токсиканта. Токсикант вносили в почвенные образцы в виде водных растворов, затем образцы инкубировали в течение 7 суток при комнатной температуре. Перед биотестированием образцы высушивали при $60^\circ C$ в течение 3 ч.

Контактное биотестирование. Дегидрогеназную активность определяли методом Ленарда в модификации Колешко, который основан на колориметрическом измерении формазана, образующегося в результате восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) [13]. К навеске образца 1 г приливали 1 мл 0.1 М раствора глюкозы, 2 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.2), 1 мл 1% раствора ТТХ и 1 мл бактериальной культуры. Смесь встряхивали и инкубировали 24 ч при $28^\circ C$. После инкубирования в реакционную смесь добавляли 5 мл этанола и центрифугировали при 4 тыс. об. мин. Надосадочную жидкость колориметрировали при 480 нм. Количество формазана находили по калибровочной кривой, построенной по чистому формазану.

Для того чтобы избежать влияния окрашенных компонентов ростовой среды или почв, предусматривали так называемый «слепой контроль», где 1 мл бактериальной суспензии был заменен на 1 мл дистиллированной воды. Для контроля активности культуры в каждой серии опытов предусматривали вариант, в котором почвенную навеску заменяли на 1 мл дистиллированной воды (контроль активности).

Для оценки токсичности рассчитывали ингибирование (I, %) и определяли EC_{50}

$$I(\%) = \frac{(\Phi_{КА} - \Phi_{сКА}) - (\Phi_{пробы} - \Phi_{спробы})}{(\Phi_{КА} - \Phi_{сКА})} \times 100,$$

где $\Phi_{КА}$ – усредненная концентрация формазана в пробе при оценке активности культуры; $\Phi_{сКА}$ – усредненная концентрация формазана в слепой пробе при оценке активности культуры; $\Phi_{пробы}$ – усредненная концентрация формазана в пробе; $\Phi_{спробы}$ – усредненная концентрация формазана в слепой пробе; EC_{50} оценивали по линейному участку зависимости, построенной в координатах натуральный логарифм концентрации элемента – ингибирование (%) методом наименьших квадратов.

Биотестирование водных образцов. При определении токсичности водных растворов токсикантов тестирование проводили, заменяя 1 г почвы на 1 мл водного раствора токсиканта.

Элюатное биотестирование. Подготовка образцов почв и твердых отходов осуществлялась аналогично подготовке при контактном биотестировании. Для приготовления экстракта навеску 1 г разбавляли дехлорированной водой в соотношении 1:10, смесь встряхивали в течение 1 ч, затем фильтровали. Биотестирование проводили в соответствии с методикой, описанной выше, заменяя 1 г образца на 1 мл фильтрата.

Все измерения проводили не менее чем в трехкратной повторности.

До проведения статистической обработки результатов проводили отброс значений по критериям Граббса и Кохрена в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002. Для оценки прецизионности метода определяли параметр σ_t в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002, 5725-2-2002, 5725-6-2002 [14–16].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Excel и программы Origin 6.1. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($P < 0.05$).

2. Результаты и обсуждение

Согласно полученным нами ранее данным, контактный микробный тест на основе оценки ингибирования дегидрогеназной активности культуры *Bacillus pumilis* демонстрирует достаточно высокую чувствительность к токсичным компонентам почв и твердых отходов [12]. Для того чтобы рекомендовать метод для широкого применения, необходимо установить его метрологические параметры. Для оценки прецизионности методов измерений, которые не стандартизированы или не используются повседневно может быть использован подход, описанный ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 [15]. Согласно указанному документу, прецизионность – степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях. Прецизионность подразделяется на внутрилабораторную и межлабораторную. Мерами прецизионности являются параметры σ_r (внутрилабораторная прецизионность), σ_l (межлабораторная составляющая) и σ_R (прецизионность методики). Нами была оценена внутрилабораторная прецизионность (σ_r) следующих методов: оценка токсичности водного раствора стандартного токсиканта ($K_2Cr_2O_7$) на основе ингибирования дегидрогеназной активности *Bacillus pumilis*, оценка токсичности почвенных образцов, загрязненных токсикантом (также на примере $K_2Cr_2O_7$) элюатным и контактным методами.

Для оценки прецизионности определения токсичности водных образцов был последовательно проведен ряд опытов с водными растворами $K_2Cr_2O_7$; количество повторностей в каждом опыте было равно трем. Общее количество обработанных значений составило 189. Предварительно перед расчетом прецизионности был проведен анализ полученных данных с целью удаления значений, являющихся выбросами. Анализ результатов повторностей в каждом опыте проводили согласно критерию Граббса. Количество значений, отброшенных по этому критерию, было равно 7. Для оставшихся значений было вычислено среднее квадратичное отклонение для каждого опыта и произведен отброс значений согласно критерию Кохрена. По критерию Кохрена было отброшено 3 исходных значения. Идентичные процедуры были проделаны для 9 различных концентраций токсиканта. Далее, для каждой концентрации токсиканта был вычислен параметр σ_r , равный отношению суммы дисперсий среднего в опытах к числу опытов.

Вычисленный параметр σ_r позволил определить предел предупреждения метода. Этот предел рассчитывается как произведение значения параметра σ_r на определенный коэффициент, зависящий от числа повторностей опыта. По-

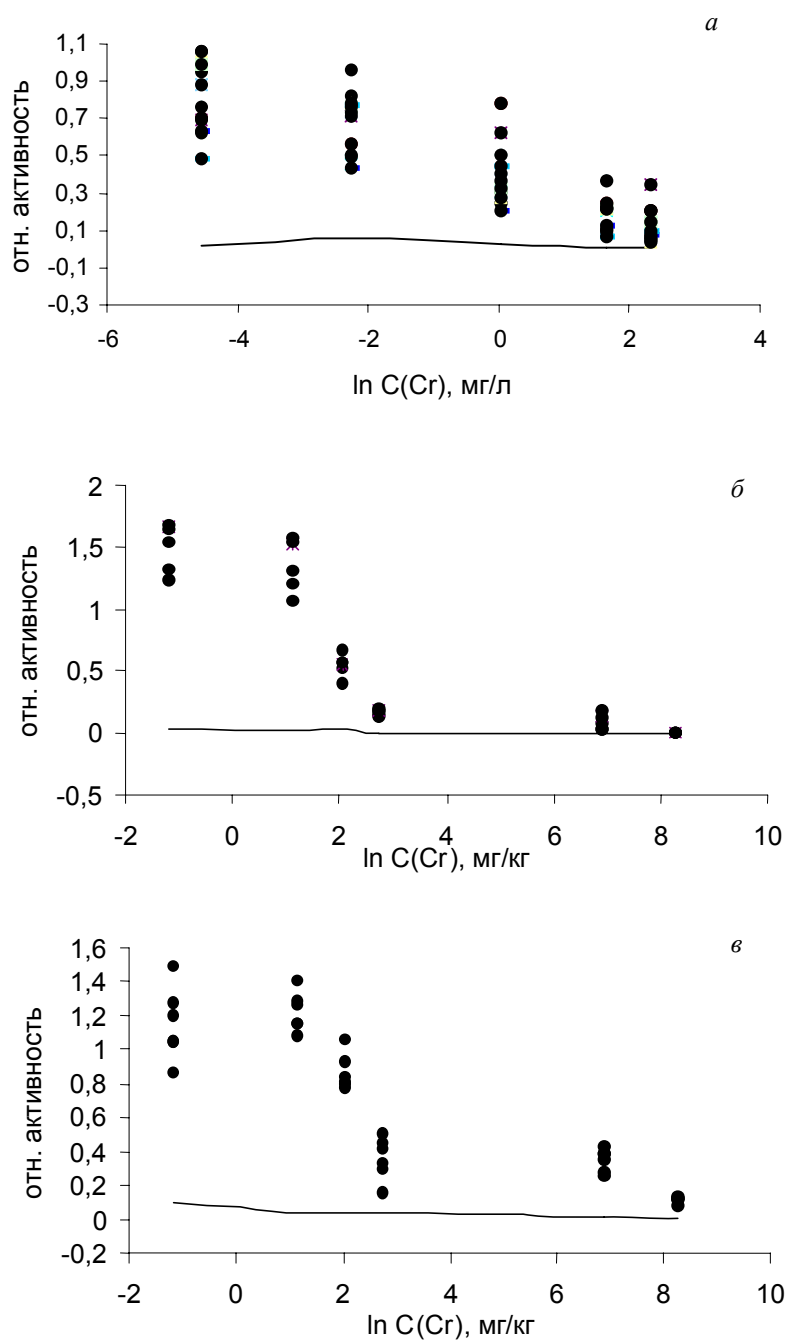


Рис. 1. Относительные значения дегидрогеназной активности (значения, полученные в эксперименте) и предел предупреждения при биотестировании: водных растворов (*a*) и почв, контактными (*б*) и элюатными (*в*) методами

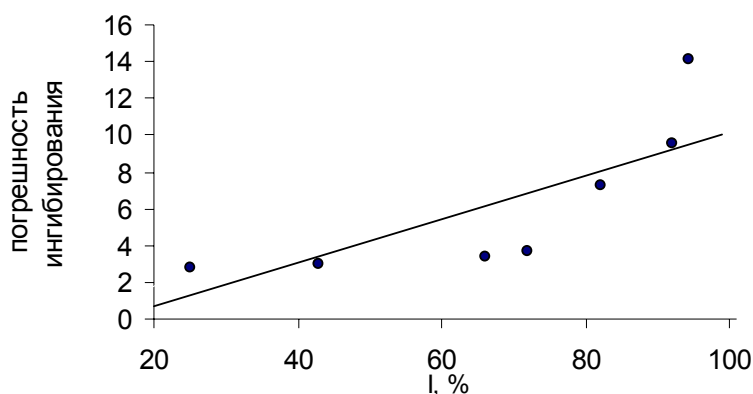


Рис. 2. Зависимость погрешности измерения от уровня ингибирования при тестировании водного раствора $K_2Cr_2O_7$

сколько традиционно в лабораториях проводят измерения в двух повторностях, этот коэффициент будет равен 2.8. Кривая, представленная на рис. 1, а, отражает изменение значения предела предупреждения в зависимости от концентрации токсиканта. На этом же рисунке представлены данные об относительной дегидрогеназной активности при различных концентрациях токсиканта. Как видно из полученных результатов, значения относительной активности при всех концентрациях токсиканта выше предела предупреждения, что свидетельствует о достаточной прецизионности метода. Кроме того, установленные значения предела предупреждения являются метрологическими характеристиками методики и могут быть в дальнейшем использованы в лаборатории при ее применении. Процедура их использования следующая. Тестирование образцов необходимо осуществлять в двух повторностях. Проведенное определение считается корректным в том случае, если различия в значениях этих повторностей меньше установленного нами предела предупреждения.

Аналогичным образом была проведена обработка результатов, полученных для контактного и элюатного методов тестирования почв. На рис. 1, б и в представлены полученные значения относительной дегидрогеназной активности и значение пределов предупреждения для каждого из методов определения токсичности.

Точность измерений при работе с биологическими объектами зависит не только от случайных погрешностей, обусловленных ошибкой измерения или подготовки проб, но и от состояния тест-объекта [17]. Поэтому при работе в лаборатории рекомендуется также периодическая проверка чувствительности тест-объекта по отношению к стандартному токсиканту – бихромату калия. Для этого нами был установлен интервал концентраций, в пределах которого наблюдается 50%-ное ингибирование тест-функции (EC_{50}). Впоследствии результаты проверки чувствительности тест-объекта будут считаться удовлетворительными в том случае, если установленные значения совпадают с указанным интервалом.

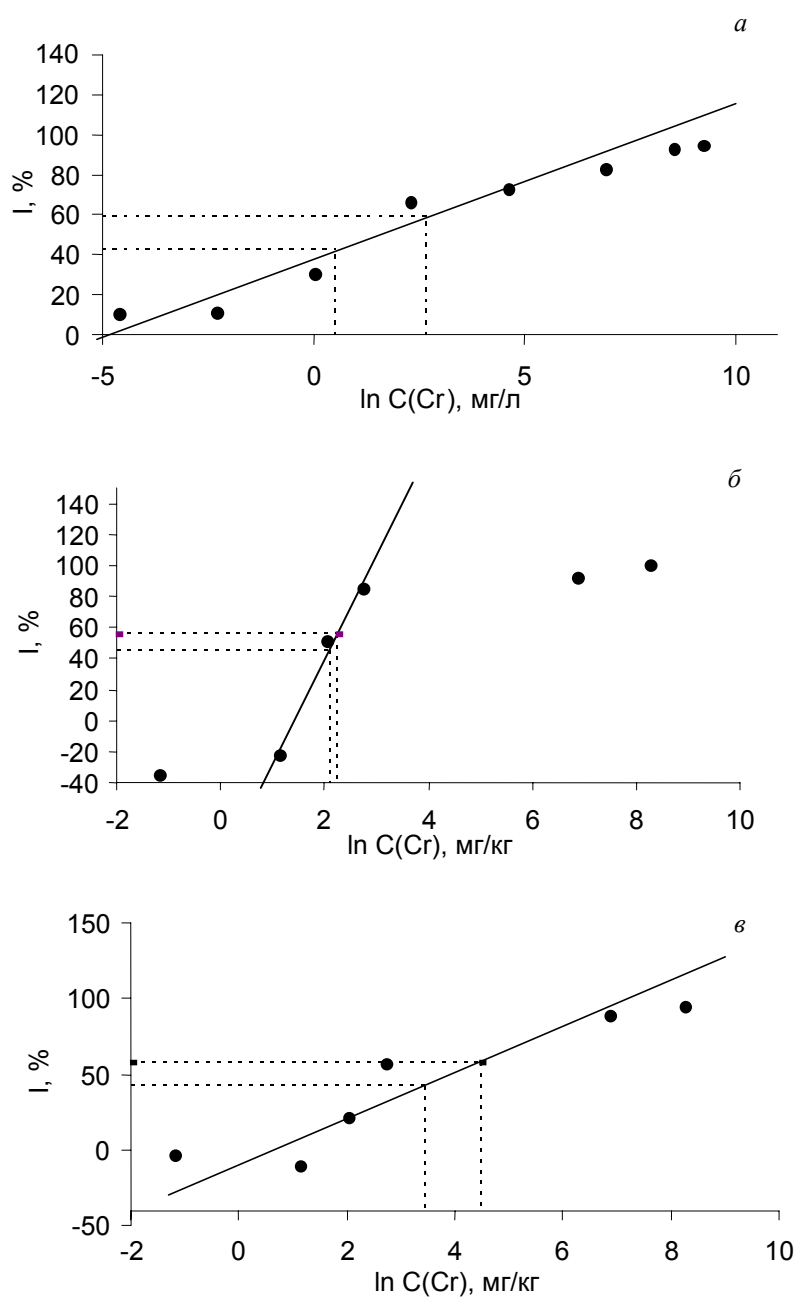


Рис. 3. Определение интервалов концентраций бихромата калия, в пределах которых обнаруживается 50%-ное ингибирование дегидрогеназной активности *Bacillus pumilis* при тестировании водных образцов (а) и почв контактным (б) и элюатным (в) методами

Для установления искомого интервала концентраций первоначально была построена зависимость погрешности измерения P от значений ингибирования дегидрогеназной активности и найдено соответствующее уравнение линейной регрессии: $P = 0.12I - 1.66$. Данная зависимость представлена на рис. 2 на примере определения токсичности водного раствора $K_2Cr_2O_7$. Из полученного уравнения была найдена погрешность измерения P_{50} , соответствующая 50%-ному ингибированию дегидрогеназной активности. На следующем этапе был построен график и найдено уравнение регрессии для линейного участка зависимости ингибирования от натурального логарифма концентрации токсиканта. С использованием интервала ингибирования, рассчитанного по формуле $50\% \pm \pm 1.96P_{50}$ (для 95%-ной вероятности), определены соответствующие ему значения концентрации токсиканта (рис. 3, а).

Аналогичным образом были найдены интервалы концентраций $K_2Cr_2O_7$, содержащегося в почве, которые вызывают 50%-ное ингибирование дегидрогеназной активности, при определении токсичности контактными и элюатными методами (рис. 3, б и в). Указанные интервалы составили 1.7–14.4 мг Cr(VI)/л, 8.18–9.56 и 31.4–81.68 мг Cr(VI)/кг соответственно.

Полученные данные позволили сравнить результаты определения токсичности хрома, находящегося в водном растворе и в почве, а также чувствительность *Bacillus pumilis* в отношении других тест-объектов. Установленное нами более высокое значение EC_{50} в почвенных образцах по сравнению с водными растворами объясняется связыванием токсиканта почвенными частицами, а также маскирующим эффектом питательных веществ почвы.

Чувствительность теста на основе ингибирования дегидрогеназной активности *Bacillus pumilis* водным раствором хрома оказалась ниже по сравнению с тестом, основанным на ингибировании дегидрогеназы *Pseudomonas fluorescens* (EC_{50} 0.085 мг/л), и сравнима с чувствительностью теста Microtox с использованием *Vibrio fischeri* (EC_{50} 0.93–1.95 мг/л) [11]. При сравнении EC_{50} для водного раствора хрома, полученного в предлагаемом нами тесте, с аналогичными данными, полученными с использованием тест-объектов, рекомендованных российским природоохранным законодательством, мы обнаружили достаточно высокую чувствительность первого. Так, иммобилизация 50% особей *D. magna* наблюдается при концентрации Cr (VI), равной 0.9–2.0 мг/л, ингибирование роста *R. sativus* – при 139–170 мг/л, смертность *P. caudatum* – при 1845–2130 мг/л [18].

Согласно данным, представленным на рис. 3, а, б, в, контактный метод биотестирования почвенных образцов, загрязненных хромом, является более чувствительным, чем элюатный, что подтверждается данными других исследователей [10, 19]. Этот факт, вероятно, связан с тем, что на метаболическую активность бактерий влияют не только водорастворимые, но и частично ассоциированные формы токсикантов.

Таким образом, полученные характеристики позволяют считать разработанный микробный контактный тест на основе оценки ингибирования дегидрогеназной активности *Bacillus pumilis* достаточно чувствительным и обладающим достаточной прецизионностью. В дальнейшем необходимо приступить к

следующему этапу разработки методики биотестирования – получению метрологических характеристик при межлабораторных исследованиях.

Summary

P.Yu. Galitskaya, S.Yu. Selivanovskaya. Metrological characteristics for a microbial test based on estimation of *Bacillus pumilis* dehydrogenase activity inhibition.

In this work the contact microbial test based on estimation of *Bacillus pumilis* dehydrogenase activity inhibition is represented. Metrological characteristics such as precision and intervals of standard toxicant ($K_2Cr_2O_7$) caused the 50% test function inhibition were found. It is revealed that the contact method of biotesting is more sensitive in comparison with eluate method.

Литература

1. *White P., Claxton L.* Mutagens in contaminated soil: a review // *Mutagen Research.* – 2004. – V. 567. – P. 227–345.
2. *Filip Z.* International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters // *Agriculture, Ecosystems and Environment.* – 2002. – No. 88. – P. 169–174.
3. *Bogomolov D.M., Chen S.-K., Parmelee R.W., Suber S., Edwards C.A.* An ecosystem approach to soil toxicity testing: a study of copper contamination in laboratory soil microcosms // *Applied Soil Ecology.* – 1996. – V. 4. – P. 95–105.
4. *Hinojosa M.B., Carreira J.A., Garcia-Ruiz R., Dick R.P.* Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal – contaminated and reclaimed soils // *Soil Biology & Biochemistry.* – 2004. – V. 36. – P. 1559–1568.
5. *Peijnenburg W., de Groot A., Jager T., Posthuma L.* Short-term ecological risks of depositing contaminated sediment on arable soil // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2005. – No 60. – P. 1–14.
6. *De Mora A.P., Ortega-Calvo J.J., Cabrera F., Madejon E.* Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-contaminated soil // *Applied Soil Ecology.* – 2005. – No. 28. – P. 125–137.
7. ISO / TC 190 / SC 7 / WG 3: Soil Quality – Soil and Site Assessment, Ecotoxicological Characterization of Soils and Soil Materials. Draft.
8. *Kapanen A., Itavaara M.* Ecotoxicity tests for compost applications // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2001. – V. 49. – P. 1–16.
9. *Athiainen J., Valo R., Joutti A.* Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2002. – No 53. – P. 323–329.
10. *Ronnpagel K., Janssen E., Ahlf W.* Asking for the indicator function of bioassays evaluating soil contamination: are bioassay results reasonable surrogates of effects on soil microflora? // *Chemosphere.* – 1998. – V. 36, No 6. – P. 1291–1304.
11. *Abbondanzi F., Cachada A., Campisi T., Guerra R., Reccagni M., Iacondini A.* Optimization of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation and comparison with Microtox® assay // *Chemosphere.* – 2003. – No 53. – P. 889–897.
12. *Галицкая П.Ю.* Преимущества и недостатки микробных контактных тестов // *Вестн. Татарстанского отд-ния Рос. Эколог. Акад.* – 2005. – № 4 (26). – С. 55–60.

13. *Колешко О.И.* Экология микроорганизмов почвы. – Минск: Высш. шк., 1981. – 345 с.
14. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1. Основные положения и определения. – М.: ИПК Изд-во стандартов. – 2002. – 24 с.
15. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. – М.: ИПК Изд-во стандартов. – 2002. – 42 с.
16. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 6. Использование значений точности на практике. – М.: ИПК Изд-во стандартов. – 2002. – 42 с.
17. *Moreno J.L., Hernandez T., Perez A., Garcia C.* Toxicity of cadmium to soil microbial activity: effect of sewage sludge addition to soil on the ecological dose // *Applied Soil Ecology*. – 2002. – No. 21. – P. 149–158.
18. *Selivanovskaya S.Yu., Latypova V.Z.* The use of bioassays for evaluating the toxicity of sewage sludge and sewage sludge-amended soil // *J Soils & Sediments*. – 2003. –V. 3, No 2. – P. 85–92.
19. *Ronnpagel K.* Microbial bioassays to assess the toxicity of solid-associated contaminants // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 1995. – No 31. – P. 99–103.

Поступила в редакцию
15.03.06

Галицкая Полина Юрьевна – аспирант кафедры прикладной экологии Казанского государственного университета.

Селивановская Светлана Юрьевна – доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии Казанского государственного университета.

E-mail: Svetlana.Selivanovskaya@ksu.ru