

УДК 504.54.001.5;504.064

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОНТАКТНОГО И ЭЛЮАТНОГО МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПОЧВ

С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая, В.З. Латыпова, Д.А. Семанов

Аннотация

Представлен сравнительный анализ чувствительности двух методов определения токсичности объектов с плотной матрицей, основанных на оценке ингибирования дегидрогеназной активности культуры *Bacillus pumilus*, – контактного и элюатного. На основании определенных для ряда металлов значений EC_{50} установлено, что контактный метод в 1.3–14 раз более чувствителен по сравнению с элюатным методом.

Введение

В настоящее время все большее распространение получают методы анализа природных объектов и антропогенных образований, основанные на оценке их воздействия на живые организмы [1–3]. Преимуществом таких методов по сравнению с традиционными методами химического анализа является то, что они позволяют интегрально учесть негативные эффекты совокупности токсичных соединений в образце без определения их качественного и количественного состава. Биологические методы включены в систему мониторинга водных объектов и почв, а также в систему регулирования обращения с отходами как в России, так и в странах Евросоюза и США. К таким методам относится, в частности, биотестирование – процедура, при которой специальная тестовая культура приводится в лабораторных условиях в контакт с анализируемым образцом. Подавляющее количество методов биотестирования разработано для анализа водных объектов. В качестве тестовых организмов используют представителей как эукариотических, так и прокариотических организмов. Среди созданных тестов имеются и коммерческие [2]. Менее разработаны подходы, позволяющие оценивать токсичность объектов, имеющих в своей основе плотные матрицы, такие как почвы или твердые отходы.

В настоящее время при оценке токсичности плотных объектов, в частности почв или твердых отходов, анализу подвергаются их водные экстракты [4, 5]. Однако, как свидетельствуют некоторые публикации, такое тестирование позволяет учесть эффекты только водорастворимых соединений, тогда как влияние могут оказывать и токсиканты, связанные плотной матрицей анализируемых объектов, и высказывается предположение о перспективности тестов, в которых токсикант приводится в непосредственный контакт с живым организмом [4, 6]. Ранее нами была предложена методика контактного биотестирования, основанная на ингибировании дегидрогеназной активности микроорганизма *Bacillus pumilus*, и определены ее метрологические характеристики [7, 8].

В настоящей работе представлены результаты сравнения эффективности контактного и элюатного методов биотестирования с использованием *Bacillus pumilus* для оценки токсичности почв, загрязненных металлами.

1. Материалы и методы исследования

Тест-объектом служила грамположительная бактерия *Bacillus pumilus* 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, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 10. 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 – 10 мм).

Аналізу на токсичность подвергали ряд почвенных образцов.

Почвенные образцы загрязняли солями индивидуальных металлов. Конечное содержание токсикантов (в расчете на элемент) в почвенных образцах составило:

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 5, 15, 30, 60, 70, 120, 180, 360 мг/кг;
- PbCl_2 – 15, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 1500 мг/кг;
- $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.25, 1.3, 5.8, 11.6, 23.2, 58, 232 мг/кг;
- NiSO_4 – 10, 20, 40, 60, 100, 250, 500 мг/кг;
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – 0.312, 3.12, 7.8, 15.6, 992.75, 3971 мг/кг.

Кроме этого, почвенные образцы загрязняли комплексом металлов Pb, Cu, Cd, Ni (в виде указанных солей) до содержания в почве каждого из металлов на уровне 1, 5, 10 и 50 ПДК для песчаных и супесчаных почв.

Токсикант вносили в почвенные образцы в виде водных растворов, затем образцы инкубировали в течение 7 суток при комнатной температуре. Перед биотестированием образцы высушивали при 160°C в течение 2 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) [9]. К навеске образца 1 г приливали 1 мл 0.1 М раствора глюкозы, 2 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7), 1 мл 1%-ного раствора ТТХ и 1 мл бактериальной культуры. Смесь встряхивали и инкубировали 24 ч при 28°C. После инкубирования в реакционную смесь добавляли 5 мл этанола и центрифугировали при 4000 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 – Ка). Для оценки токсичности непосредственно изучае-

мого вещества вместо Ка предусматривали вариант, в котором почвенную навеску с токсичным веществом заменяли на 1 г незагрязненной почвы (Кп).

Для оценки токсичности рассчитывали относительную активность культуры ($A_{отн}$):

$$A_{отн} = (\Phi_{пробы} - \Phi_{спробы}) / (\Phi_{КА} - \Phi_{сКА}),$$

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.

Элюатное биотестирование. Подготовка образцов почв 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.

Обработка результатов. До проведения статистической обработки результатов проводили отброс значений по критериям Граббса и Кохрена в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002.

Результаты тестирования описывали кинетической моделью неполного ингибирования:

$$v = c(1 + ai) / (1 + bi),$$

где v – тестовый параметр, i – концентрация токсиканта, a , b , c – константы, зависящие от наклона кривой и значения ингибирования тестового параметра.

Математическая модель была реализована в пакете программ R.Gui. Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Excell и программы Origin 7.5. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($P < 0.05$).

2. Результаты и обсуждение

Для того чтобы сравнить чувствительность предлагаемого контактного метода с элюатным методом биотестирования, были проанализированы образцы почвы, содержащие в качестве токсикантов $K_2Cr_2O_7$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $PbCl_2$, $NiSO_4$, $Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$, а также смесь токсичных металлов (Cd, Cu, Ni, Pb), наиболее часто встречаемых в почвах Республики Татарстан. Данные представлены на рис. 1 и 2. Каждый из рисунков содержит кривые изменения относительной активности *B. pumilus* в зависимости от концентрации токсиканта, при этом на рисунке представлены две кривые, полученные с учетом двух вариантов контроля: контроля активности культуры (Ка), когда образец заменен водой, и контроля активности культуры в присутствии незагрязненной почвы (Кп). Предпо-

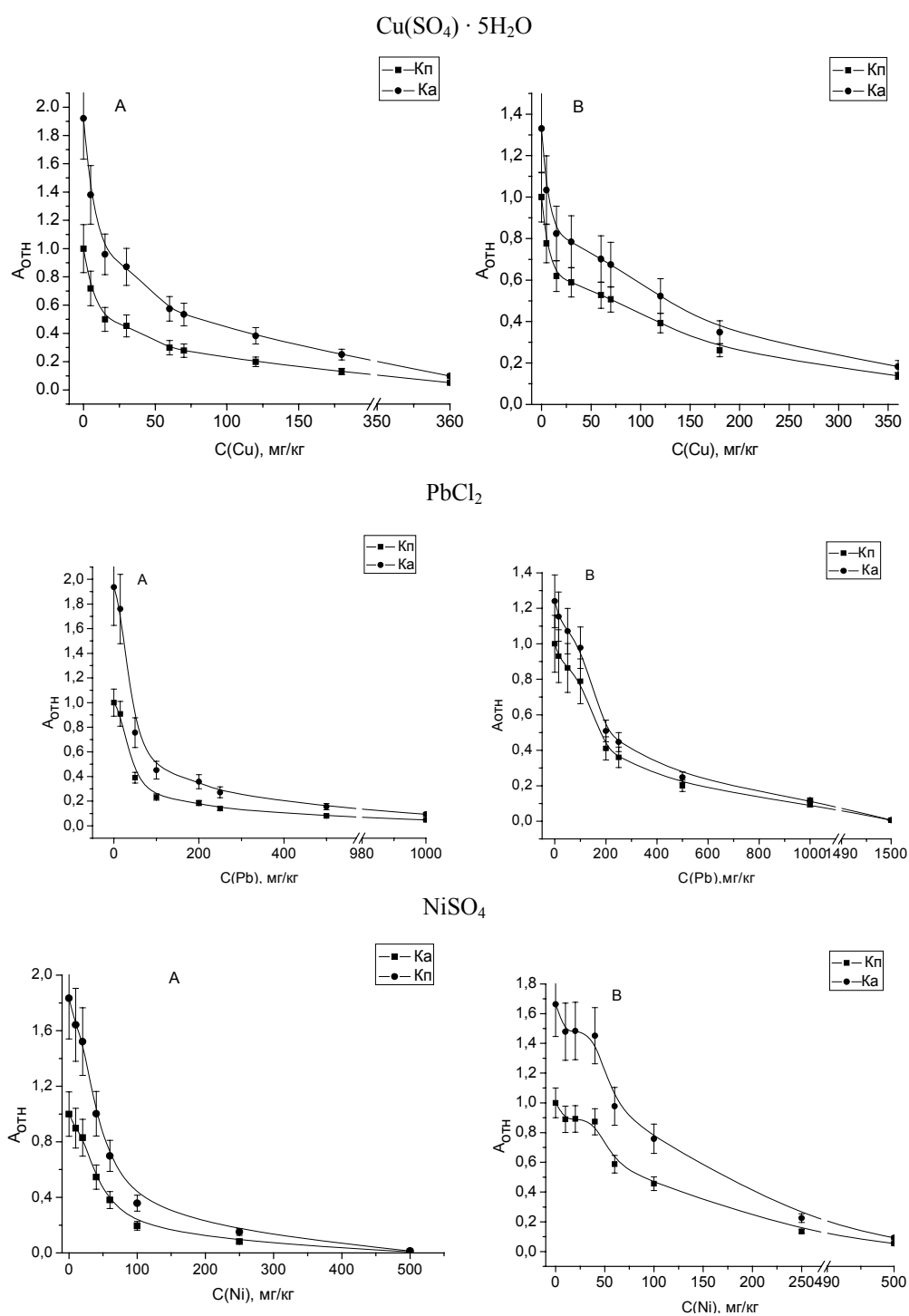


Рис. 1. Влияние почвенных образцов, загрязненных $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , NiSO_4 на дегидрогеназную активность *B. pumilus*. А – контактный метод биотестирования, В – элюатный метод биотестирования. Кп – активность, оцененная с использованием в качестве контроля активности тестовой культуры в присутствии незагрязненной почвы, Ка – активность, оцененная с использованием в качестве контроля активности тестовой культуры в присутствии воды

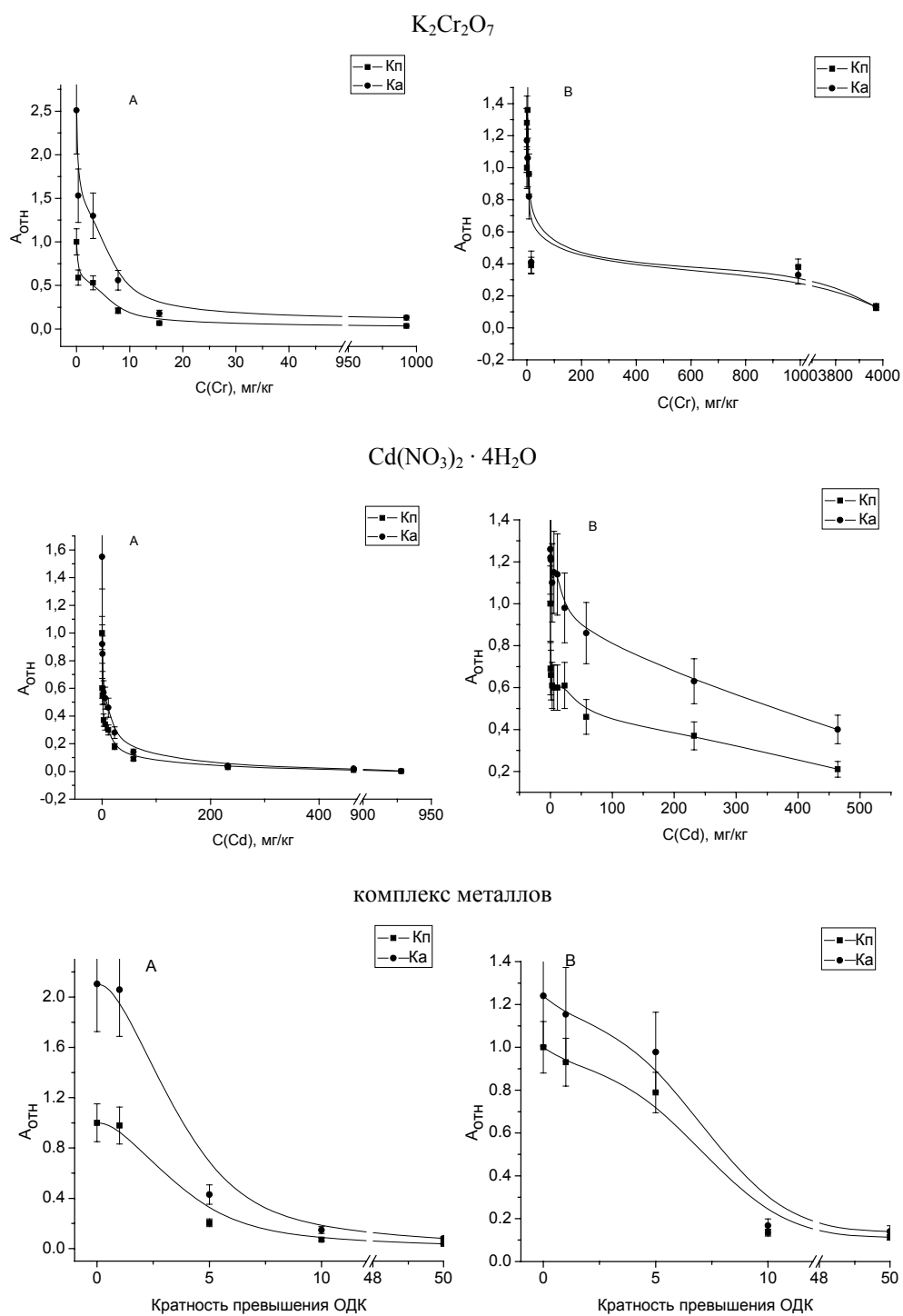


Рис. 2. Влияние почвенных образцов, загрязненных $K_2Cr_2O_7$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, смесью металлов на дегидрогеназную активность *B. pumilus*. Условные обозначения как на рис. 1

лагается, что последующий расчет EC_{50} на основе двух наборов данных позволит дать заключение о токсичности образца в целом (при использовании Ка) или токсичности конкретного загрязняющего вещества (при использовании Кп).

При анализе результатов определения токсичности было установлено, что незагрязненная (контрольная) почва оказывает стимулирующий эффект на дегидрогеназную активность *B. pumilus*, увеличивая ее в 1.7–2 раза, что скорее связано с действием органического вещества почвы. При тестировании модельных почвенных образцов, содержащих $Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$, контактным способом обнаружено, что достоверный ингибирующий эффект отмечен уже при 5 мг элемента/кг при использовании для определения $A_{отн}$ почвенного контроля (Кп) и лишь 30 мг элемента/кг – Ка (рис. 1). С использованием нелинейной модели описания результатов тестирования были определены значения EC_{50} , которые составили 21.5 и 65.1 мг элемента/кг, соответственно, для первого и второго набора данных.

При тестировании образцов элюатным методом установлены значения EC_{50} , которые составили 64.9 и 106.9 мг элемента /кг, что оказалось в 3 и 1.6 раз выше по сравнению со значениями EC_{50} , установленными контактным методом.

Полученные данные показывают, что как при контактном, так и при элюатном тестировании значение EC_{50} , определенное на основе набора данных относительной активности, рассчитанной с использованием Кп, оказалось ниже EC_{50} , определенной на основе набора данных, рассчитанных с использованием Ка. Такое отличие связано с тем, что при расчете с использованием Кп мы элиминируем стимулирующий эффект, обусловленный присутствием органического вещества. Поскольку последующие результаты выявили аналогичную закономерность, в дальнейшем сравнение чувствительности контактного и элюатного теста будет проводиться только по данным, рассчитанным с использованием Кп.

Токсичность свинца, определенная как контактным, так и элюатным методами, оказалась ниже по сравнению с токсичностью меди (рис. 1). Установленные значения EC_{50} составили 39.2 и 188.8 мг/кг для контактного и элюатного методов определения.

Практически аналогичную токсичность в отношении *B. pumilus* продемонстрировал никель. Так, при анализе токсичности почвенных образцов, загрязненных никелем, выявлено, что 50%-ный ингибирующий эффект в отношении дегидрогеназной активности *B. pumilus* наблюдается при 43 мг/кг в контактном тесте и при 90.7 мг/кг в элюатном тесте (рис. 1). Минимальными концентрациями элемента, при которых наблюдали достоверное ингибирование тест-функции, оказались 20 и 40 мг/кг соответственно.

Данные об изменении дегидрогеназной активности *B. pumilus* при воздействии на нее почвенных образцов, загрязненных солями хрома и кадмия, представлены на рис. 2. В сравнительном плане можно отметить, что из исследованных металлов кадмий и хром оказались наиболее токсичными для тест-объекта. Так, установленные для кадмия значения EC_{50} составили 3.8 и 55.5 мг/кг при контактном и элюатном биотестировании соответственно. Для хрома указанные значения оказались еще более низкими (1.5 и 21 мг/кг), что свидетельствует о его большей токсичности.

Табл. 1

Интервалы значений EC_{50} при контактном и элюатном биотестировании почв, загрязненных различными токсикантами

Токсикант	Интервалы значений EC_{50} , мг/кг			
	Контактное биотестирование		Элюатное биотестирование	
	Ка	Кп	Ка	Кп
Cu	60.3–74.1	18.1–24.1	96.1–121.5	58.2–70.9
Cd	7.2–10.4	3.5–4.1	321.3–374.3	38.3–64
Ni	94.1–107.1	40.2–46.3	157–189.9	80.6–105.3
Pb	106.8–131.3	35.9–43.3	234.0–280.2	171.4–215.3
Cr (VI)	10.1–14.5	1.3–1.9	17.4–22.3	18.1–37.1
Смесь металлов	4.3–6.3	1.9–2.1	5.8–9.2	5.0–6.1

Исходя из того, что в природных условиях встречается в основном полиметаллическое загрязнение, представляло интерес определить и эффект воздействия на дегидрогеназную активность *B. pumilus* комплекса токсикантов, внесенных в виде солей $Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $NiSO_4$, $PbCl_2$. Соотношение между металлами устанавливали, исходя из их ориентировочно допустимых концентраций (ОДК) для песчаных и супесчаных почв. Как видно из данных, представленных на рис. 2, увеличение содержания металлов в образцах приводит к увеличению токсичности. Так, 50%-ное снижение дегидрогеназной активности наблюдается при 2-кратном превышении ОДК в случае контактного метода биотестирования и 5.8-кратном – в случае элюатного биотестирования. Как свидетельствуют полученные данные, наблюдаемый эффект не явился результатом простого суммирования токсичного действия элементов. Действительно, суммарное содержание металлов в образце, вызывающем 50%-ное ингибирование (2ОДК), составило 171 мг/кг, тогда как сумма концентраций индивидуальных металлов, вызывающих аналогичный эффект, значительно ниже (107 мг/кг). Это обусловлено наличием синергических или антагонистических взаимоотношений между комплексом токсикантов в исследуемых нами образцах. Возможность таких эффектов неоднократно обсуждалась в литературе [1, 2, 4, 10–12].

С использованием перестановочного теста с числом перестановок 9999 на основе кинетической модели нами установлены достоверные интервалы варьирования значений EC_{50} , определенных по двум наборам данных, которые представлены в табл. 1.

Полученные нами данные позволили установить, что токсичность металлов в отношении дегидрогеназной активности *B. pumilus*, оцененная контактными методом биотестирования, снижалась в ряду $Cr \geq Cd > Cu > Pb \geq Ni$. Ряд токсичности металлов, полученный при элюатном биотестировании, рассчитанный относительно почвенного контроля, выглядел следующим образом: $Cr > Cd > Cu > Ni > Pb$.

Важной обнаруженной закономерностью является то, что при одинаковых концентрациях токсиканта уровень ингибирования тест-функции существенно выше при проведении биотестирования контактными методом по сравнению с

элюатным, что свидетельствует о его большей чувствительности. Это утверждение подтверждается и определенными нами значениями EC_{50} (табл. 1).

Согласно данным литературы, зачастую понятие биодоступности вещества или элемента отождествляют с их водорастворимостью. Полученные нами данные не согласуются с данной точкой зрения, поскольку при одинаковой исходной концентрации в почвенном образце уровень ингибирования при контактном методе биотестирования оказался в несколько раз выше по сравнению с элюатным методом. Так, например, такое превышение оказалось кратным 2 для Ni (концентрация 100 мг/кг), 2–3 для Pb (100 мг/кг), 1.3–1.8 для Cu (70 мг/кг), 14 для Cd (6 мг/кг) и 2–6 для Cr (16 мг/кг). Величины такого же порядка получены при сравнении установленных значений EC_{50} . Таким образом, можно заключить, что для бактерий, относящихся к роду *Bacillus*, биодоступными являются не только водорастворимые формы токсикантов. Такой же позиции придерживается Ivask с соавторами [6], обнаружившие, что биодоступность кадмия в тесте, использующем генетически измененный штамм *Bacillus subtilis* BR151-(pTOO24), с почвенной суспензией в 20–90 раз выше, чем в элюатном тесте, ртути – в 30 раз и свинца – в 20 раз. В то же время механизм различной биодоступности токсикантов до конца не ясен и требует дальнейшего изучения. Позднее на этот факт указывал Brandt с соавторами [13], в работе которых приведены данные о растворимости и биодоступности меди, оцененной с помощью *Pseudomonas fluorescens*. Из 12 мг/кг меди, содержащейся в почвенном образце, лишь 0.032 мг/кг являлись водорастворимыми. Данный образец не оказывал токсического воздействия на тест-объект. При концентрации 600 мг/кг 0.845 мг металла находилось в растворимой форме, при этом соотношение биодоступных и растворимых форм составляло 43.7%, а биодоступных форм и общего количества меди – 0.033%.

Данные о результатах биотестирования почвенных образцов контактными методами крайне малочисленны. Так, в публикации, посвященной перспективам применения контактных тестов, в частности теста с *B. cereus*, приведены значения EC_{50} для меди – 200 мг/кг, и указано, что медь в концентрации 900 мг/кг вызывает 96%-ное ингибирование, однако авторы не указывают тип исследуемой почвы [4]. В то же время тип почвы, содержание органического вещества, кислотность, а также механический состав оказывают существенное влияние на биодоступность, а следовательно, на уровень токсичности соединения [6, 14, 15]. В работе этих же авторов представлено содержание меди, вызывающей 20%-ное ингибирование люминисценции в тесте Microtox, значение которого составило 500 мг/кг. При попытке использования *B. cereus* как предиктора биодоступности кадмия, польскими авторами установлено, что его IC_{50} составляет 1.0–3.8 мг/г и варьирует в зависимости от типа почвы [16]. Не обнаружено негативного эффекта в отношении индукции люминисценции *B. subtilis* BR151-(pTOO24) при анализе суспензии почвы, загрязненной кадмием в концентрации до 1.46 мг/кг и содержащей 34–39% органического вещества [6]. Применение люминисцентного биосенсора, содержащего *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA1 luxAB, для анализа почв, содержащих медь или цинк, выявило, что цинк вызывает 50%-ный негативный эффект при его содержании

в почве 403 мг/кг, тогда как медь даже при содержании 349 мг/кг не оказывает эффекта [17].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о большей эффективности контактного метода биотестирования в плане выявления токсичных металлов в почвах, а сравнение с результатами, представленными в литературе, позволяет сделать заключение в целом о высокой чувствительности предлагаемого нами метода контактного биотестирования.

Summary

S.Yu. Selivanovskaya, P.Yu. Galitskaya, V.Z. Latypova, D.A. Semanov. Evaluation of efficiency of contact and eluate methods of biotesting of soils.

Comparative analysis of sensitivity of two methods (contact and eluate) meant for determination of toxicity of the solid samples is presented. Methods are based on the inhibition of dehydrogenase activity of *Bacillus pumilus*. According to the values of EC₅₀ determined for metals it was revealed that contact method is 1.3–14 times more sensitive than eluate method.

Литература

1. *Markwiese J.T., Ryti R.T., Hooten M.M., Michael D.I., Hlohowskyj I.* Toxicity bioassays for ecological risk assessment in arid and semiarid ecosystems // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* – 2001. – V. 168. – P. 43–98.
2. *Kapanen A., Itavaara M.* Ecotoxicity tests for compost applications // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2001. – V. 49. – P. 1–16.
3. *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.
4. *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.
5. ПНД ФТ 14.1.:2:3:4.6-2000 Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости цериодафний. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 2000. – 45 с.
6. *Ivask A., Francois M., Kahru A., Dubourguier H-C., Virta M., Douay F.* Recombinant luminescent bacterial sensors for the measurement of bioavailability of cadmium and lead in soils polluted by metal smelters // *Chemosphere.* – 2004. – V. 55. – P. 147–156.
7. *Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю.* Определение метрологических характеристик микробного теста на основе оценки ингибирования дегидрогеназной активности *Bacillus pumilus* // *Уч. зап. Казан. гос. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2006. – Т. 148, кн. 2. – С. 63–72.
8. *Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю., Латыпова В.З.* Некоторые характеристики микробного контактного метода биотестирования // *Современные аспекты экологии и экологического образования: Материалы Всерос. научн. конф.* – Казань, 2005. – С. 103–105.
9. *Колешко О.И.* Экология микроорганизмов почвы. – Минск: Высш. шк., 1981. – 345 с.
10. *Андрущишкин О.П.* Исследование воздействия некоторых приоритетных компонентов промышленных стоков и их смесей на инфузорий *Paramecium* // *Инфузории*

- в биотестировании: Тез. докл. междунар. научно-практ. конф. – СПб., 1998. – С. 135–139.
11. *Гонзалес А., Гуттиерес Х.К.* Инфузории в биотестировании тяжелых металлов // Инфузории в биотестировании: Тез. докл. междунар. научно-практ. конф. – СПб., 1998. – С. 212–215.
 12. *Knoke K.A., Marwood T., Cassidy M., Liu D., Seech A.* Comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil // *Water, Air and Soil Pollution*. – 1999. – V. 110. – P. 157–169.
 13. *Brandt K., Petersen A., Holm P.* Decreased abundance and diversity of culturable *Pseudomonas* spp. populations with increasing copper exposure in the sugar beet rhizosphere // *FEMS microbial Ecology*. – 2006. – V. 6. – P. 281–291.
 14. *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 // *Appl. Soil Ecology*. – 2002. – No 21. – P. 149–158.
 15. *Ros M., Hernandez T.N., Garcia C.* Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2003. – V. 35. – P. 463–469.
 16. *Prokop Z., Holoubek I.* The use of a microbial contact toxicity test for evaluating cadmium bioavailability in soil // *J. Soils and Sediments*. – 2001. – No 1. – P. 21–24.
 17. *Chaudri A.M., Lawlor K., Preston S., Paton G.I., Killham K., McGrath S.* Response of a Rhizobium-based biosensor to Zn and Cu in soil solutions from sewage sludge treated soils // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2000. – V. 32. – P. 383–388.

Поступила в редакцию
24.08.06

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

E-mail: Svetlana.Selivanovskaya@ksu.ru

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

Латыпова Венера Зиннатовна – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой прикладной экологии Казанского государственного университета.

Семанов Дмитрий Александрович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологического контроля Казанского государственного университета.