

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ВОДЫ

Река Сакмара является примером водоема с высокой вероятностью возникновения экологических рисков, испытывающей значительную антропогенную и техногенную нагрузку. В этой связи возникает острая необходимость в применении быстрых методов первичной оценки качества водоема. С этой целью методом биолюминесценции проведена оценка качества воды реки Сакмара, с исследованием концентрации тяжелых металлов, в 3-х точках: пляж «Волна», участки водоема вблизи Сакмарской ТЭЦ и Татарской Каргалы. Биолюминесценция проводилась с использованием генно-инженерного люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующего luxCDABE-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10, в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм».

Установлено, что чрезвычайным тушением свечения обладает образец воды из реки Сакмара в области села Татарская Каргала, что может интерпретироваться, как проявление неблагоприятных условий для тест-объекта. Значения биолюминесценции проб воды из остальных участков реки приближены к контролю. Результаты изучения концентрации тяжелых металлов показали отсутствие превышения нормы для железа; с превышением в несколько раз во всех трех образцах, с наибольшей концентрацией ПДК меди в районе села Татарская Каргала. Количество цинка превышает ПДК только в образцах, взятых с пляжа «Волна» и участка вблизи села Татарская Каргала.

Результаты работы демонстрируют возможность применения экспресс-метода на основе люминесцентной бактериальной тест-системы «Эколюм» для оценки загрязнения исследуемых вод.

**Ключевые слова:** биолюминесценция, река Сакмара, тяжелые металлы, загрязнение.

Биолюминесценция – способность живых организмов светиться, достигаемая самостоятельно или с помощью симбионтов. Биолюминесценция основывается на химических процессах, при которых освобождающаяся энергия выделяется в форме света [1].

Люминесценция встречается у эволюционно разнородных групп организмов, в том числе у некоторых бактерий, грибов, водорослей, кишечнорастворимых, червей, моллюсков, насекомых и даже рыб, но не наблюдается у более высокоорганизованных животных [2].

Методы люминесцентного бактериального теста широко распространены во всех развитых странах и могут применяться в качестве первичного быстрого и количественного лабораторного теста на химическую токсичность и безопасность проб воды и водных вытяжек из различных объектов окружающей среды.

В России в качестве тест-объекта используются препараты лиофилизированных люминесцентных бактерий или ферментные системы из этих бактерий серии «Эколюм» [3], [4], [5], [6].

Люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу, который осуществляет эффективную трансформацию энергии химиче-

ских связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений. Критерием токсического действия являлось изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контрольным раствором, не содержащим токсических веществ. Уменьшение интенсивности биолюминесценции всегда пропорционально токсическому эффекту [7].

Биосенсор обладает очень широким спектром действия на разнообразные химические соединения, такие как тяжелые металлы, пестициды, фенолы, углеводороды и т. д.

Сущность метода заключается в тушении свечения бактерий загрязнителями различной природы. Уменьшение интенсивности свечения пропорционально токсическому эффекту. Критерием токсического действия является изменение величины интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контрольной пробой, не содержащей токсических веществ. Количественная оценка параметра тест-реакции выражается в виде безразмерной величины – индекса токсичности.

Река Сакмара является примером реки с высокой вероятностью возникновения экологических рисков, так как испытывают значительную антропогенную и техногенную нагрузку.

Основу антропогенной нагрузки в бассейне реки Сакмара составляет сельское хозяйство [8], [9].

### Материалы и методы

В данной работе проведена оценка биотоксичности вод реки Сакмара методом биолуминесценции, а также исследовалось содержание тяжелых металлов в воде.

Сбор образцов воды проводился в 3-х точках реки Сакмара: пляж «Волна», который подвержен общей антропогенной нагрузки со стороны Сакмарской ТЭЦ; Сакмарская ТЭЦ, на месте сброса производственных сточных вод; участок водоема вблизи Татарской Каргалы.

Для метода биолуминесценции в качестве объектов воздействия использовался генно-инженерный люминесцирующий штамм *Esherichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующий *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10, производство НВО «Иммунотех» (Россия, Москва) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм». Непосредственно перед проведением исследований штамм восстанавливали добавлением охлажденной дистиллированной воды. Суспензию бактерий выдерживали при плюс 2–4 °С в течение 30 мин [10].

Проведение теста методом биолуминесценции проходило путем внесения в ячейки 96-луночных планшетов из непрозрачного пластика исследуемых проб и суспензии люминесцирующих бактерий в соотношении 1:1. В качестве контроля была использована дистиллированная вода. После чего планшет помещали в измерительный блок анализатора микропланшетного Infinite PRO200 (TECAN, Австрия), динамически регистрирующего интенсивность свечения полученных смесей в течение 180 мин с интервалом 5 мин [11]. Количественная оценка параметра тест реакции выражается в виде индекса токсичности «Т».

$$T = \frac{100(I_0 - I)}{I_0},$$

где  $I_0$  и  $I$  – соответственно интенсивность контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции (30 минут) исследуемого раствора и тест-объекта.

Методика допускает три пороговых величины индекса токсичности ( $T_{20}$  – допустимая степень токсичности,  $20 \leq T \leq 50$  – образец токсичен,  $T \geq 50$  – образец сильно токсичен) [12], [13].

Для получения достоверных данных в анализах использовали контрольные и опытные образцы воды в трех повторностях.

Исследования проводились по стандартизированным методикам в лаборатории «Агроэкология техногенных наноматериалов» и в Испытательном центре ФГБНУ Всероссийского НИИ мясного скотоводства, (аттестат аккредитации RA.RU.21ПФ59 от 02.12.15.).

### Результаты

Полученные результаты позволили охарактеризовать динамику ингибирования бактериальной биолуминесценции во времени, а также оценить степень загрязнения вод реки Сакмара (рис. 1) [14].

Как видно из рисунка, анализ биолуминесценции вод показал, что по сравнению с контролем, чрезвычайным тушением свечения обладает образец воды из реки Сакмара в области села Татарская Каргала, что может интерпретироваться, как проявление выраженной острой токсичности образца. Это объясняется деятельностью компании ООО «Уралагропром» с. Татарская Каргала, основным видом деятельности которой является растениеводство, животноводство, а также добыча сырой нефти и природного газа [15].

Пробы воды из всех остальных участков реки являются низкой степени токсичности, т. е. почти не превышают значения контроля.

В случае с тяжелыми металлами, их содержание в воде трех исследованных водоемов было в рамках нормы для железа, тогда как для меди предельно-допустимая концентрация была превышена в несколько раз во всех трех образцах, причем наибольшая концентрация отмечена в районе села Татарская Каргала.

Количество цинка превышает ПДК только в образцах, взятых с пляжа «Волна» и участка вблизи села Татарская Каргала. При этом в образце на месте сброса производственных сточ-

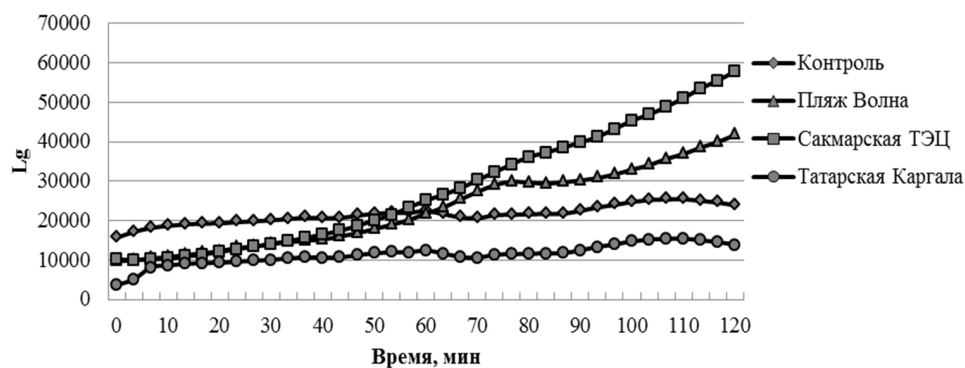


Рисунок 1 – Динамика свечения E.coli K12 TG1с клонированными luxCDABE-генами P.leiognathi 54D10 в водах реки Сакмара

ных вод Сакмарской ТЭЦ превышения нормы не обнаружено (табл. 1).

Повышенное содержание меди может быть естественным, обусловленным гидрохимическими процессами, но нельзя исключать влияние хозяйственной деятельности человека [16], [17]. Также, наличие цинка и меди в воде объясняется использованием пестицидов и гербицидов в сельском хозяйстве [18], [19], [20].

### Выводы

Таким образом, проведенные исследования с помощью экспресс-метода на основе люминесцентной бактериальной тест-системы «Эколюм» позволяют оценить загрязнение исследуемых вод и результаты сопоставимые с оценкой концентрации тяжелых металлов в образцах воды.

Таблица 1 – Концентрация тяжелых металлов в пробах воды, исследуемых точек реки Сакмара, мг/дм<sup>3</sup>

Точки отбора проб	Химический элемент		
	Медь	Железо	Цинк
	ПДК		
	0,001	0,3	0,01
Пляж Волна	0,0094	0,031	0,075
Сакмарская ТЭЦ	0,0107	0,038	0,0068
Татарская Каргала	0,012	0,28	0,05

Установлено, что образец воды с места сброса производственных сточных вод Сакмарской ТЭЦ в сравнении с другими исследованными образцами реки можно признать условно чистым, вследствие максимальных значений биолуминесценции и минимального превышения ПДК только для меди.

25.04.2017

### Список литературы:

1. Дерябин, Д.Г. Бактериальная биолуминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин // М.: Наука. – 2009. – 246 с.
2. Проссер, Л. Сравнительная физиология животных / Л. Проссер // Издательство: Мир. – 1978. – Т. 3. – 654 с.
3. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. Vetrova et al. // Luminescence. – 2007. – Vol. 22. – No. 3. – P. 206–214.
4. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V.A. Kratasyuk et al. // Chemosphere. – 2001. – V. 42. – N 8. – P. 909–915.
5. Comparative characteristic of toxicity of nanoparticles using the test of bacterial bioluminescence / E. Sizova et al. // OSPC – Biosciences, Biotechnology Research Asia – Vol. 12 (Spl. End. 2). – P. 361–368.
6. Yausheva, E. Evaluation of Biogenic Characteristics of Iron Nanoparticles and Its Alloys in Vitro / E. Yausheva, E. Sizova, S. Miroshnikov // Modern Applied Science. – 2015. – Vol. 9. – No. 9. – P. 65–71.
7. Оценка биотоксичности природных вод урбанизированных территорий / Е.И. Шиманская и др. // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – №6. – С. 65–66.
8. Биологический мониторинг генотоксических соединений природных вод урбанизированных территорий / Е.И. Шиманская и др. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №10–3. – С. 496–498.
9. К вопросу об экологических проблемах нефтегазовых промыслов Юга России / Е.И. Шиманская и др. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №10. – С. 95–97.
10. Ulitzur, S. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity / S. Ulitzur, T. Lahav, N. Ulitzur // Environ. Toxicol. – 2002. – Vol. 17. – No. 3. – P. 291–296.
11. Методика экспрессного определения токсичности воды с помощью люминесцентного бактериального теста «Эколюм» / Ю.А. Ревазова и др. // Методические рекомендации. Гос. сан.-эпид. нормирование РФ. Минздрав России. – 2000. – 19 с.

12. Бактериальный люминесцентный биотест / А.П. Зарубина и др. // Сенсор. – 2005. – №3. – Р. 14–21.
13. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В.С. Данилов и др. // Вестник Московского университета. Сер. Биология. – 2002. – №3. – С. 20–24.
14. Биотестирование тест-системой “эколюм” влияния электромагнитного поля низкой интенсивности на токсичность бытовых стоков / А.П. Зарубина и др. // Вестник Московского университета. – Серия 16: Биология. – 2012. – №3. – С. 39–43.
15. Майстренко, В.Н. Экологический мониторинг суперэкоотоксикантов / В.Н. Майстренко, Р.З. Хамитов, Г.К. Будников // М.: Химия. – 1996. – 320 с.
16. Дж. Мур Тяжелые металлы в природных водах / Дж. Мур, С. Рамамурти // М.: Мир. – 1987. – 286 с.
17. Хильчевский В.К., Осадчий В.И., Курило С.М.. – Киев. Основы гидрохимии // Ника-Центр. – 2012. – 312 с.
18. Гилева, Т.А. Содержание тяжелых металлов в органах и тканях рыб, обитающих в разнотипных водоемах пермского края / Т.А. Гилева, Е.А. Зиновьев, Н.В. Костицына // Аграрный вестник Урала. – 2014. – №8 (126). – С. 73–77.
19. Никаноров, А.М. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах / А.М. Никаноров, А.В. Жулидов // СПб.: Гидрометеоздат. – 1991. – 312 с.
20. Первозников, М.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах / М.А. Первозников, Е.А. Богданова // СПб. – 1999. – 228 с.

#### Сведения об авторе:

**Трутяева Антонина Сергеевна**, студент кафедры биология и почвоведения химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, лаборант-исследователь лаборатории «Агроэкология техногенных наноматериалов» Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства  
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail:fyntybf@mail.ru