

УДК 575.224.46.044

Б.Н. МЫНБАЕВА, А.А. КУРМАНБАЕВ, М. ГАЙДОБРУСОВА

МИКРОБИОТЕСТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

(Аналитический обзор)

*(Казахский национальный педагогический университет им. Абая,
Институт микробиологии и вирусологии МО и Н РК)*

Представлен анализ научных статей за последние 5 лет. Главной задачей было найти и проанализировать научные исследования в мире, СНГ и Республике Казахстан, посвященных проблеме современных микробиотестов мониторинга загрязнения почвенных и водных экосистем (бактериями, микроскопическими грибами, водорослями и простейшими) для выявления загрязнения тяжелыми металлами и другими техногенными поллютантами. В перспективе предполагается возможность выявления токсического, мутагенного и канцерогенного эффектов загрязненных экосистем, что позволит сделать микробиомониторинг дешевым, высоко чувствительным и достаточно быстрым в исполнении.

Известно, что биомониторинг делает возможным прямую оценку качества окружающей среды, основной его задачей является наблюдение за уровнем загрязнения биоты для разработки систем раннего оповещения, диагностики и прогнозирования [1]. Почвенная и водная микробиология постоянно развивает методы и тесты, пригодные для мониторинга техногенных загрязнений почвы и воды; их обзору и анализу посвящена данная статья, которая будет полезна для экологов, занимающихся проблемами мониторинга окружающей среды.

Биомониторинг на уровне микробных сообществ, ценозов и сукцессий осуществляется с помощью методов инициации микробных сообществ пептоном, крахмалом и другими субстратами, вызывающие активацию всего микробного комплекса или развитие сукцессии при разложении полимерного субстрата на фоне загрязнения поллютантом и без него. Учет изменений в соотношении основных физиологических групп микроорганизмов, биомассы, степени покрытия, частоты встречаемости видов позволяет оценить влияние антропогенных загрязнений [2, 3]. Данный метод был успешно использован для учета влияния ТМ на почвенные микроорганизмы [1]. Логическим развитием метода инициации является мультисубстратное тестирование почвы, подвергшейся загрязнению. Визуально увидеть изменения в почвенных микробценозах позволяет метод «микробных пейзажей» в педоскопах или на пластинах, помещенных в почву [4].

В качестве индикаторного контроля состояния водных экосистем можно использовать показатели бактериопланктона (снижение продуктивности, скорости размножения, скорость обрачиваемости биомассы бактериопланктона и др.), с помощью которых можно оценить антропогенную нагрузку на водоемы. Другой экопоказатель - определение доминирующих форм цианобактерий, содержание в них микроцистина и др. [5]. Таким образом, водоросли можно рассматривать в качестве тест-систем для определения экосостояния водоемов. Бурное развитие цианобактерий (р. *Phormidium*) можно использовать в химически загрязненных почвах в качестве биомаркеров или индикаторов [6].

Экспресс-контроль состояния экосистем в зонах промышленного загрязнения можно проводить на уровне клеток микроорганизмов, отслеживая их рост, стадии развития и морфологию [7]. Тяжелые металлы (ТМ) ингибируют активность почвенных ферментов: аскорбатоксидазы [8], амилазы, инвертазы и др. [9], что позволило рекомендовать определение ферментативной активности почв в качестве оценки загрязнения ТМ и радиацией.

В микробиомониторинге исследователи часто используют бактериальные культуры, рост и развитие которых находится в зоне оптимума, (например, *Azotobacter chroococcum* - хороший индикатор на токсичность почвы), которые можно обнаружить только в оптимальных для развития растений условиях [10]. В работе [11] в ка-

честве индикатора использовали характер роста колоний и морфологию чистых культур грибов и водорослей.

Интересна исследовательская работа по 5 экотоксикологическим показателям почв, загрязненных тяжелыми металлами, и выявлена определенная последовательность отрицательных эффектов [12]. Оценка степени антропогенного воздействия на сообщество почвенных микроорганизмов возможна также по величине «дыхания» почв (выделение CO_2) [13]. Присутствие ТМ в почве тесно коррелирует с 2-мя важными микробными экофизиологическими параметрами: уменьшение соотношения углерода микробной биомассы и органического углерода ($C_{\text{мб}}/C_{\text{орг}}$) и увеличение метаболического коэффициента с увеличением концентрации металла [14]. В настоящее время ведутся поиски биотестов, основанных на контроле функций живого организма измерением биохимических параметров, то есть по активности ключевых ферментов тест-организма. В последнее время появилось несколько статей, в которых предлагаются иерархическая система биоиндикации и многокомпонентные тест-системы для оценки токсичности почв, загрязненных техногенными поллютантами [15].

Тесты на субклеточном уровне наиболее перспективны, так как их отличает устойчивость контрольных характеристик, возможность стандартизации, высокая чувствительность (при биолюминесцентном анализе - до 10^{-17} - 10^{-19} молей) и высокая специфичность, так как в основе методов лежат ферментативные субстрат специфические реакции [16]. На основе фотобактерий и очищенных препаратов люциферазы созданы биотесты с высокой чувствительностью к ТМ [17]. С помощью биолюминометра БЛМ 8103 определяется угнетение светимости сенсора против контроля. При падении светимости на 20% токсический эффект не наблюдается, на 21-51% - слабый токсический эффект образца и свыше 50% - высокая токсичность. Анализ эффекта тушения люминесценции в модельных клеточных и биохимических системах, вызываемого факторами различной химической природы, положен в основу подхода к интегральной экспресс-оценке загрязненности среды, который был реализован в аналитических наборах и специализированном хемиллюминометре [18]. Биолюминесцентный анализ стал в настоящее время одним из

перспективных экспрессных методов биологического мониторинга ОС благодаря высокой чувствительности люминесцентной системы даже к микроколичествам токсикантов, простоте и возможности быстрого получения результатов. Биотесты на светящихся бактериях дают интегральную оценку токсичности и часто превосходят другие известные биотесты по быстротедействию, точности, чувствительности и простоте. Разработана технология производств и налажен выпуск биотестов на основе лиофильно высушенных природных светящихся бактерий *P. phosphoreum*, которые используются для измерения интегральной биологической токсичности веществ различных классов: тяжелых металлов, фенолов, пестицидов, лекарственных препаратов и т.д. [18]. В одной из экспериментальных работ были использованы люминесцентные организмы (в частности, люминесцентная бактерия *Photobacterium leiognathi*) и по интенсивности флуоресценции бактериальных клеток, составу фитопланктона и водорослевого перифитона и расчету индекса качества по химическим показателям авторы отнесли водоемы к различной степени загрязнения [19]. В научных исследованиях в серии лабораторных и полевых исследований показано уменьшение отношения люминесцентных бактерий к общему количеству бактерий (БЛО - биолюминесцентное отношение) при химическом загрязнении вод, т.е. авторы делают заключение, что БЛО может применяться как простой и надежный индикатор химического загрязнения водных систем под действием антропогенных факторов. Мембранная АТФ-за оказалась хорошей мишенью для ТМ, определен ряд токсичности ТМ для *Vac. cereus* и *Alcaligenes eutrophus*: $\text{Au} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Mn}$ [20]. Казахстанскими микробиологами разработан микробиотест для экспресс-оценки канцерогенности различных химических веществ [21]. С помощью данного теста обнаружена канцерогенная активность металлов Cd, Hg, Zn, Pb и антиканцерогенная у Mo, Ni, Se. С помощью данного теста был показан антиопухольный эффект гидролизного лигнина [22]. Биомаркеры или гены также дают значительное количество информации и степени загрязнения ОС [23].

Таким образом, из изложенного материала видно, что в биомониторинге в настоящее время накоплен значительное количество физиологичес-

ких, биохимических и молекулярных методов, позволяющих проводить мониторинг наземных экосистем на загрязнение в концентрациях, которые не доступны при приборном определении. Существует острая потребность в быстрых и простых методах, которые могли бы заменить «старый чашечный метод» высева на питательные среды. В этом научном направлении более перспективными являются исследования по разработке и применению микробиологических экотипных индикаторов для мониторинга качества ОС; специалисты по микробиологической экологии уже используют молекулярно-биологические методы, а геномные технологии, вероятно, найдут применение в ближайшие 10 лет [24]. Также ведется интенсивный поиск индикаторных форм микроорганизмов, водорослей и др. для создания биотестов, позволяющих определять чистоту ОС, как, например, штамм бактерий *Enterobacter aerogenes* 300S (S-чувствительный), являющийся индикатором для биотестирования питьевой воды [25].

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесников С.И. Экология. М, 2007.
2. Jiang Guo, Shen Yun-Fan. Развитие микробного сообщества в оз. Дунху в зависимости от качества воды. Tsinghua Univ, Sci. and Technol. 2007. 45. №2, с. 563-567.
3. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Велигина Н.В., Патрушева Е.В., Азнаурьян Д.К., Вальков В.Ф. Изменение комплекса почвенных микроорганизмов при загрязнении чернозема обыкновенного нефтью и нефтепродуктами. Агрехимия. 2007, № 2, с. 44-48.
4. Методические указания по использованию мембранных камер для наблюдения за развитием микроскопических грибов в почве. - Л.: ВНИИСХМ, 1979. -18 с.
5. Кондакова Л.В., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю., Варакина А.И. Цианобактерии как показатели состояния почвы при антропогенных воздействиях. Материалы всероссийского симпозиума с международным участием "Автотрофные микроорганизмы". 2005, с. 46.
6. Родичева Э.К., Кузнецов А.М., Медведев С.Е. Биоллюминесцентные биотесты на основе свящихся бактерий для оценки загрязнения водных источников. Abstracts of International Baikal Symposium on Microbiology. 2003, с. 139-140.
7. Павлова Н.Н. Биологическая активность почвенных микробценозов как метод биотестирования радиационного загрязнения. //3 Российская научная конференция «Радиационная защита и радиационная безопасность в ядерных технологиях», Обнинск, 24-26 окт., 2006. Тезисы докладов. Обнинск. 2006, с. 468-469.
8. Путинская Г.А., Серая Л.И. Аскорбатоксидазная активность почвы, загрязненной медью и кадмием //Микробиол. ж. - 1996.-Т.58. - №5. - С.12.
9. Андреюк Е.И., Путинская Г.А., Валагурова Е.В. и др. Иерархическая система биоиндикации почв, загрязненных тяжелыми металлами //Почвоведение. - 1997. - №12. - С.1491-1496.
10. Przybulewska K., Nowak A. Оценка чувствительности при разной температуре бактерий рода *Azotobacter* к присутствию в почве загрязняющих веществ. Folia Univ. agr. stetini. 2004, № 98, с. 143-150.
11. Liao Min, Chen Cheng-li, Huang Chang-yong. Влияние тяжелых металлов (ТМ) на активность и разнообразие освоенной рудниковой пустоши краснозема. J. Environ. Sci. 2005. 17, № 5, с. 832-837.
12. Broos K., Mertens J., Smolders E. Токсичность тяжелых металлов по данным различных тестов на базе почвенной микробиологии и роста растений: сравнительное изучение. Toxicol. and Chem. 2005. 24, № 3, с. 634-640.
13. Smejkanova M., Mikanova O., Boruvka L. Действие концентраций тяжелых металлов на биологическую активность почвенных микроорганизмов. Plant, Soil and Environ. 2003. 49, № 7, с. 321-326.
14. Li Yong-Tao., Becquer T., Quantin C., Benedetti M., Lavelle P. Показатели микробиологической активности: чувствительные индикаторы качества почвы для стресса тяжелых металлов. Dai Jun. pedosphere. 2005, 15, № 4, с. 409-416.
15. Кабиров Р.Р., Сагитова Н.В., Суханова В. Разработка и использование многокомпонентной тест – системы для оценки токсичности почвенного покрова городской территории //Экология. - 1997. - №6. - С.408-411.
16. Благодатская Е.В., Ананьева Н.Д. Оценка устойчивости микробных сообществ в процессе разложения поллютантов в почве //Почвоведение.-1996.-№11. - С.1341-1346.
17. Калацкий Ю.М., Стефанов В. Е., Агеева О.Г, Васильев В. Ю. Оценка загрязненности объектов окружающей среды с помощью хемиллюминесцентной среды тест-системы. Вестн. С.-Петербурга. Ун-та. Сер 3. 2004, № 3, с. 84-87, 119.
18. Tayassi M., Varinova S.S., Nevo E., Wasser S.P. Оценка результатов биотестирования с люминесцентной бактерией *Photobacterium leiognathi* по составу водорослевых сообществ и оценки качества воды вдоль реки Yargon (Центральный Израиль) //Мат. Международной конференции «Биоиндикация в мониторинге пресных экосистем». Санкт-Петербург, 2006, с. 147-151.
19. Frischer M.E., Danforth M.M., Foy T.F., Juraska R. J. Свечящиеся бактерии как индикаторы химического загрязнения прибрежных вод. Environ. Qual. 2005, 34. №4, с.1328-1366.
20. Жигарева Т.Л., Ратников А.Н., Свиридова Д.Г., Попова Г.И., Петров К.В., Касьяненко А.А., Черных Н.А., Картузова М.Н. Изучение поведения Cd и Zn в дерново-подзолистой почве и их действие на почвенный микробценоз. Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. 2006, № 1. с. 34-40.
21. Файн М.Э. Влияние металлов на вторичный рост мицелиальных микроорганизмов /Автореф. дис. канд. - Алматы, 1992. - 21 с.
22. Курманбаев А.А. Оценка методов микробной биоиндикации для мониторинга антропогенного загрязнения почв //Вестник АН РК. - 1998. - №4. - С.19-22.
23. Devereux R., Rublee P., Paul John H., Field Katharine G., Domingo J.W. Разработка и применение микробиологических экотипных индикаторов в целях мониторинга качества воды: отчет рабочего совещания по оценке состояния науки, исследовательских потребностей и будущих направ-

лений. *Santo Environ. Monit. and Assess.* 2006. 116, №1-3, с. 459-479.

24. *Shear H., Stadler-Salt N., Bertran P., Horvatin P.* Разработка и применение индикаторов для оценки здоровья экосистем в бассейне Великих озер. *Environ. Monit. And Assess.* 2003. 88, № 1-3, с. 119-152.

25. *Леванова Г. Ф.* с соавт. Штамм бактерий *Enterobacter aerogenes*, используемый в качестве индикаторного при биотестировании питьевой воды (S-чувствительный): Пат. 2225000 Россия, МПК7 G01N 33/18, C12Q 1/02. Федер. гос. учрежд. науки и здравоохран. «Нижегор. НИИ эпидемиол. и микробиол. № 2002116737/13; Заявл. 21.06.02. Оpubл. 27.02.04. Бюл. № 6.

Резюме

Сараптаушылық шолуда улы, мутагенді және канцерогенді заттарды анықтау үшін топырақ және су экосүйелерін биоқадағалауға арналған заманауи микробиоте-

сттер қарастырылған (микроорганизмдер, балдырлар және т.б., сондай-ақ экогеномдық индикаторлар). Қоршаған ортаның жағдайын биоиндикациялаудың ұсынылған әдістері үнемділігімен, жоғары сезімталдығымен және басқа әдістермен салыстырғанда жылдамдығымен ерекшеленеді. Осы ғылыми саладағы негізгі зерттеулер шет елдерде, Ресейде жүргізілуде, және де жұмыстардың шамалы мөлшері Қазақстанда аталып өтілген.

Summary

In this review are considered contemporary microbiotests (using microorganisms, seaweeds, etc., also ecogenom indicators) for biomonitoring of soils and water ecosystems in order to find out toxic, mutagenic and cancerogenic pollutants. Suggested methods of bioindication of environment's state in comparising with others analyses are more practical, sensitive and fast. Main scientific researches are made in foreign countries and Russia, but also small quantity investigations – in Kazakhstan.