

УДК 574.23

Н. Ю. Васильева, В. А. Іваница

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова

**ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
МОДЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА (*SALMONELLA TYPHIMURIUM TA 100*)
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ В ПОЧВЕ
СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

Здійснено біотестування ґрунтових зразків південного чорнозему степової зони Одеської області з використанням бактеріальної тест-системи *Salmonella typhimurium TA 100*. Порівняння результатів біотестування та хімічного аналізу ґрунтових зразків, результатів лабораторного експерименту та багатofакторного дисперсійного аналізу дозволило виявити приховані від класичних методів фактори, що викликають зміни генотоксичного потенціалу ґрунту, а також пояснити механізми виникнення кумулятивного ефекту при спільній дії суміші солей важких металів $CoSO_4$ та $FeSO_4$, $CoSO_4$ та $CuSO_4$.

N. Y. Vasileva, V. O. Ivanitza

I. I. Mechnikov Odessa National University

**CHANGE DETECTION OF MODEL ORGANISM'S
(*SALMONELLA TYPHIMURIUM TA 100*) BIOLOGICAL ACTIVITY
DEPENDING ON THE HEAVY METALS' CONTENT IN SOIL**

The biotesting of south chernozem soil in Odessa steppe area was made with use of bacterial test-system *Salmonella typhimurium TA 100*. Comparison of results of biotesting and soil chemical analysis, results of laboratory experiment and multivariate analysis of variance allowed revealing the factors, which are usually hidden but generate genotoxicity potential of soil. Furthermore our research permitted to explain the mechanisms of cumulative effect occurrence under cooperative effect of heavy metals mixture of $CoSO_4$ and $FeSO_4$, $CoSO_4$ and $CuSO_4$.

Введение

Металлы-токсиканты, поступая в почву, закрепляются в верхнем гумусовом горизонте почв (до 10 см), где адсорбируются почвенными коллоидами, образуют труднорастворимые соединения со свободными анионами, инкорпорируются окклюдирующими полуторными окислами железа и марганца, глинистыми минералами и органическим веществом почвы, поглощаются микроорганизмами и растениями [10]. Металлы, доступные микроорганизмам, растениям и способные к вымыванию, находятся в почвенном растворе в виде свободных ионов (подвижные формы), комплексов и хелатов. Большинство литературных данных [14] свидетельствуют о необходимости исследовать содержание в почве подвижных форм металлов, так как именно эти формы дают наиболее объективную оценку загрязнения и одновременно являются наиболее опасными, попадая в первую очередь в растения и организм человека [5]. Именно концентрации подвижных форм являются решающими при токсичном действии тяжелых металлов на живые организмы при проведении биотестирования в различных тест-системах.

Однако, несмотря на пристальное внимание, уделяемое этому вопросу, на сегодняшний день большим недостатком нормирования является то обстоятельство, что при расчете ПДК пока не учитывается совместный эффект тяжелых металлов. Кумулятивный эффект всего многообразия сочетаний различных воздействий возможно оценить лишь с помощью биотестирования [4]. Поэтому наиболее актуальной становится проблема выявления различных комбинаций действующих факторов, вызывающих стойкие отклонения в биологической системе, выяснение биологической основы их совместного действия и прогнозирование закономерности изменения отклика биологической системы на их воздействие.

Цель данной работы – выявление и анализ изменений генотоксических показателей, регистрируемых в модельном организме *Salmonella typhimurium TA 100* при воздействии на него водными вытяжками из почвенных образцов типичного участка степи, представленного южными черноземами. Почвы изучаемой территории находились в условиях умеренного сельскохозяйственного пресса и содержали в себе различные концентрации и комбинации тяжелых металлов, вызывающие изменения показателей биологической системы.

Материал и методы исследований

Отбор проб почвы для микробиологического исследования проводили согласно ГОСТ 17.4.3.01-83 [3], который регламентирует отбор и подготовку проб почвы при общем и локальном загрязнении. На генотоксическую активность анализировали водную вытяжку почвы. Методика получения водной вытяжки почвы – общепринятая [9].

Исследованная территория расположена в Одесской области и охватывает неорошаемые черноземные почвы северо-восточной части Причерноморской низменности на междуречьях Куяльников. Бассейн протекающей там реки Балай по агроклиматическому районированию относится к засушливой, умеренно-жаркой зоне с мягкой зимой. В пределах исследованной территории расположены два поселка городского типа и 16 сел. Под сельскохозяйственные угодья занято 94,8 % территории. Пробы почвы для биологического контроля отбирали, руководствуясь таксономическим уровнем геоморфологических (рельефных) элементов (рис. 1). Перечень точек отбора приведен в таблице 1.

В качестве методической основы биотестирования на токсичность и мутагенность с использованием *Salmonella typhimurium TA 100* использовали унифицированную методику [13; 16]. Показателем токсического действия было число выживших клеток в опыте (%) по сравнению с контролем. Наличие мутагенного эффекта учитывали по индукции обратных мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину. Показателем мутагенного действия выбран параметр «концентрация мутаций», определяемый по формуле:

$$N = T_{cac}/T_{mna},$$

где N – концентрация мутаций, T_{cac} – число бактерий-ревертантов, выросших на среде САС, T_{mna} – число клеток, выросших на полноценной среде МПА. Критерием мутагенного действия служило статистически достоверное отклонение проверяемого показателя в опыте по сравнению с контролем. Отличительной особенностью предлагаемой методики биотестирования с применением бактериальной тест-системы *S. typhimurium TA 100* является ее высокая чувствительность к неорганическим и органическим соединениям (на уровне ПДК и в 10–100 раз меньше) [13].

При проведении лабораторных экспериментов исследовали соли тяжелых металлов $CoSO_4$, $FeSO_4$ и $CuSO_4$ в диапазоне концентраций от 0,001 до 1,0 мкг/мл, а также их

смеси в диапазоне концентраций от 0,1 до 3 мкг/мл для каждой отдельной соли. Для извлечения подвижных форм тяжелых металлов в исследованных почвах использовали экстракцию 1 Н *HCl*, с последующим измерением концентраций на атомно-абсорбционном спектрофотометре [1; 11].

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что почвы водораздела обладали разнонаправленным действием на клетки *S. typhimurium TA 100*. Максимальной токсичностью, сопровождающейся гибелью практически 50,0 % жизнеспособных клеток тест-штамма и превышением спонтанного уровня мутагенности в 1,5 раза, обладала почва, отобранная в точке П-85 и располагающаяся в непосредственной близости от животноводческой фермы (табл. 1). Аналогичные данные получены при биотестировании почв со склонов балки: максимальные значения генотоксических показателей зарегистрированы в почвах, расположенных возле животноводческой фермы (П-86). Остальные почвы не обладали мутагенной активностью и вызывали либо незначительную гибель бактерий *S. typhimurium TA 100* (до 30,0 %), либо, напротив, стимулировали рост бактериальных клеток (см. табл. 1).

Таблица 1

Перечень почвенных образцов, отобранных для биологического контроля

Точка отбора	Форма рельефа	Расположение на местности	Мутагенная активность, отн. ед.	Токсичность, % жизнеспособных клеток
П-84	водораздел	30 м от шоссе	1,0	250,0
П-85	водораздел	перед автодорожным мостом, в районе с. Ставковое, ферма	1,4	54,0
П-87	водораздел	рядом с железнодорожным переездом, в районе с. Ставковое	1,0	90,0
П-98	водораздел	в районе с. Шевченково, 20 м от лесополосы, рядом с шоссе	1,0	190,0
П-82	склон балки	в районе с. Нейково, 15 м от лесополосы	1,0	160,0
П-83	склон балки	в районе с. Нейково, 15 м от лесополосы, возле шоссе	1,1	170,0
П-86	склон балки	в районе с. Ставковое, 10 м от шоссе, ферма	2,1	47,0
П-90	склон балки	в районе с. Онорьевка, 40 м от шоссе	1,0	110,0
П-91	склон балки	в районе с. Онорьевка, 10 м от дороги	1,4	70,0
П-99	склон балки	в районе с. Шевченково, перед шоссе	1,3	65,0
П-100	склон балки	в районе с. Ровное, 15 м от колодца	1,5	75,0
П-30	днище балки	в районе с. Черногорка, 20 м от шоссе, ферма, склады химикатов	1,6	60,0
П-70	днище балки	в районе с. Сербка, 50 м от шоссе, ферма	1,0	190,0
П-75	днище балки	в районе с. Сербка, 150 м от железнодорожного полотна	1,1	90,0
П-81	днище балки	в районе с. Балайчук, ферма	1,0	90,0
П-88	днище балки	в районе с. Ставковое, ферма, гаражи	1,1	47,0
П-89	днище балки	между селами Даниловка и Онорьевка, ферма, плотина	1,0	190,0
П-92	днище балки	в районе с. Даниловка, ферма, автодорожный мост	1,1	140,0
П-93	днище балки	в районе с. Балайчук, ферма	1,1	100,0
П-94	днище балки	в районе с. Даниловка, ферма	1,0	70,0
П-95	днище балки	в районе с. Чигирин	1,0	340,0
П-97	днище балки	в районе с. Шевченково, рядом с шоссе, ферма	1,5	60,0
П-79	днище балки	балка Греково	1,2	45,0

Для почв днищ балок токсический эффект регистрировали в точках, расположенных рядом с гаражами и складами химических удобрений (П-30, П-81, П-88, П-94, П-79); однако он не сопровождался значительным повышением уровня мутагенной активности по сравнению с контролем. В основном, почвы понижений стимулирова-

ли рост клеток тест-штамма бактерий (см. табл. 1). Это можно объяснить тем, что территории были заняты пастбищами, в которых наблюдается повышение общего количества биогенных компонентов, находящихся в почвенном покрове и способствующих, в свою очередь, росту бактериальных клеток.

Химический анализ почвенных образцов, отобранных на изученной территории (глубина отбора 10 см), показал, что количество большинства исследованных элементов находится в границах предельно допустимых концентраций (ПДК) и ниже. Содержание меди в исследованных почвенных образцах не превышало 0,4 мг/кг, цинка и кобальта – не превышало 3 мг/кг, а концентрация ионов железа колебалась от 0,4 до 60,0 мг/кг.

Известно, что одни и те же концентрации металлов в различных условиях могут вызывать разные по степени выраженности последствия. Например, при переходе ионных форм металлов в устойчивые высокомолекулярные комплексы токсичность металлов резко уменьшается вплоть до полной безвредности. Кроме того, почва, обладая достаточно большой буферной емкостью, способна поддерживать на постоянном уровне концентрацию загрязняющих веществ за счет перехода органических и карбонатных форм металлов в водорастворимую фракцию при изменении внешних условий [12]. В связи с этим при проведении биотестирования необходимо учитывать не только ингибирующее, но и стимулирующее действие тяжелых металлов. С целью проверки предварительных выводов проведено несколько лабораторных экспериментов по изучению влияния отдельных солей тяжелых металлов на тест-систему *S. typhimurium TA 100*.

Отдельно взятые соли тяжелых металлов не оказывали токсического действия на клетки *S. typhimurium TA 100*. Исключение составлял $CoSO_4$, который незначительно ингибировал рост и развитие тест-объекта и приводил к гибели 20,0 % клеток тест-штамма.

Не обладая прямым токсическим действием, $CoSO_4$, $CuSO_4$ и $FeSO_4$ оказывали стимулирующее действие на рост клеток бактерий. Наиболее выраженное стимулирующее действие на рост бактерий оказывал $CuSO_4$ во всем диапазоне исследованных концентраций; проверяемый показатель при этом на 50–130 % превышал контрольный уровень. В наших экспериментах тяжелые металлы во всем диапазоне испытуемых концентраций (от 1,0 до 0,001 мкг/мл) индуцировали генные мутации типа замены пар оснований в бактериальной тест-системе *Salmonella typhimurium TA 100*. Количество мутаций, индуцированных исследованными солями тяжелых металлов, превышало спонтанный уровень в 1,2–1,4 раза. В экспериментах по изучению влияния смеси солей тяжелых металлов $CoSO_4$ и $FeSO_4$, $CoSO_4$ и $CuSO_4$ во всем диапазоне испытуемых концентраций (от 0,1 до 3 мкг/мл для каждой из солей) наблюдалось токсическое действие и значительное повышение индукции генных мутаций типа замены пар оснований в бактериальной тест-системе *S. typhimurium TA 100*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что смеси солей $CoSO_4$ и $FeSO_4$ с увеличением концентрации вызывают гибель бактериальных клеток. При концентрации 2 мкг/мл количество жизнеспособных клеток составило 6,0 %, по сравнению с контролем. При этом мутагенная активность превышала контрольные показатели в 51 раз (табл. 2).

Аналогичным действием обладала смесь $CoSO_4$ и $CuSO_4$. Показатели мутагенной активности возрастали с повышением концентрации тестируемого комплекса и достигли своего максимума (162,6 отн. ед.) при концентрации 3 мкг/мл. Количество жизнеспособных клеток при этой концентрации составляло лишь 4,0 %.

**Показатели биотестирования отдельных солей тяжелых металлов
и их смесей в бактериальной тест-системе *Salmonella typhimurium TA 100***

Соли тяжелых металлов	Диапазон концентраций, мг/л	МИК, индуцирующая выход гис-ревертантов, мг/л	Мутагенная активность, отн. ед.	Токсичность, % жизнеспособных клеток
$CuSO_4$	1,0–0,01	0,01	1,4	230
$FeSO_4$	0,5–0,005	0,005	1,2	100
$ZnSO_4$	1,0–0,01	0,01	1,0	150
$CoSO_4$	1,0–0,01	0,01	1,4	80
$CoSO_4$ и $FeSO_4$	0,1–3,0	0,10	4,6	20
$CoSO_4$ и $CuSO_4$	0,1–3,0	0,10	28,4	10

Особый интерес представляло сопоставление результатов химического анализа и результатов биологического контроля. В почвенных образцах П-85, П-99, П-30, П-88, П-97 и П-79 по результатам химического анализа содержание кобальта и железа находилось в пределах 1,1–1,5 и 5,4–47,9 мг/кг соответственно, что не превышало ПДК. Для этих же почв (см. табл. 1) отмечали токсическое (гибель жизнеспособных клеток достигала 50 %) и мутагенное действие (превышение контроля до 1,6 раза). В точках П-84, П-95, П-89, П-98, П-92, П-70, П-82 и П-83 с низкой концентрацией в почвенных образцах ионов этих металлов отмечена стимуляция роста бактериальных клеток тест-штамма *S. typhimurium TA 100* (превышение контроля на 150–240 %, см. табл. 1).

Применение многофакторного дисперсионного анализа для обработки полученных результатов позволило установить, что на показатели генотоксичности влияет интегрированное действие металлов. На показатели токсичности значимо влияет совокупное действие ионов кобальта с железом ($F=3,25$) и кобальта с медью ($F=2,54$). Для показателей мутагенной активности большее значение имели те же комбинации металлов ($F=3,44$ и $F=6,00$) и дополнительно отдельные металлы ($F_{Co}=2,23$ и $F_{Cu}=4,21$) при $p=0,05$ и $k=6$.

Объяснением усиления токсического действия на микроорганизмы могут служить уже известные механизмы взаимодействия ионов тяжелых металлов с микробной клеткой. Например, существующий конкурентный механизм поступления в клетку ионов кобальта и цинка объясняет отсутствие достоверно значимого влияния подобного комплекса на показатели генотоксичности. Согласно литературным данным [2; 15], эти катионы не только конкурируют между собой за вход, но и являются антагонистами между собой в процессе транспорта. Транспорт кобальта у метаболически активных клеток связан с изменением пороговой дозы, при которой резко меняются характеристики бактерий, в основе чего лежит увеличение катионной проводимости мембран у модифицированных кобальтом бактерий, усиливающее его неспецифическое накопление. При этом следует помнить, что после связывания кобальта с клеткой и первоначального увеличения проводимости ЦПМ для него наступает увеличение проницаемости мембраны для всех катионов. Взаимодействие ионов железа с клетками бактерий связано с активным транспортом и образованием микроорганизмами сидерофоров. Высокое содержание ионов железа в среде репрессирует как этот процесс, так и многие другие ферментативные реакции. Исходя из вышесказанного, понятен кумулятивный эффект токсичности смеси тяжелых металлов $CoSO_4$ и $FeSO_4$. Из литературных данных известно, что мутации, вызванные медью у бактерий, повышают их чувствительность к ионам кобальта, что, в свою очередь, приводит к дальнейшим индукциям мутаций различных типов в бактериальных клетках [6–8].

Выводы

Исследования образцов южных черноземов показали, что токсический и мутагенный потенциал почв в значительной мере обусловлен наличием в них подвижных форм тяжелых металлов. При этом формирование генотоксического потенциала почв происходит в условиях, когда содержание тяжелых металлов в почве не превышает ПДК. Применение многофакторного дисперсионного анализа для обработки результатов биотестирования позволило предположить наличие кумулятивного эффекта определенных комбинаций тяжелых металлов. Сравнение результатов биотестирования, химического анализа, а также проведение чистого эксперимента в лабораторных условиях подтвердило результаты математической обработки данных о возрастающем влиянии на токсичность совместного действия тяжелых металлов $CoSO_4$ и $FeSO_4$, а на увеличение мутагенной активности смеси тяжелых металлов $CoSO_4$ и $CuSO_4$.

Библиографические ссылки

1. Брицке М. Е. Атомно-адсорбционный спектрохимический анализ. – М.: Химия, 1982. – 223 с.
2. Гершанович В. Н. Биохимия и генетика транспорта ионов у бактерий. – М.: Медицина, 1980. – 170 с.
3. ГОСТ 17.4.3.01-83. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. – М., 1982. – 5 с.
4. Егорова Е. И. Проблемы экологической оценки состояния природной среды в районах размещения атомных электростанций / Е. И. Егорова, Г. В. Козьмин, А. И. Трофимов // Вестник РАЕН. – 2002. – № 2. – С. 4–8.
5. Ильин В. Б. Распределение свинца и кадмия в растениях пшеницы, произрастающей на загрязненной этими металлами почве / В. Б. Ильин, М. Д. Степанова // Агрохимия. – 1979. – № 5. – С. 114–119.
6. Кузовникова Т. А. Сходство механизмов транспорта катионов в резистентных и чувствительных к меди бактериях / Т. А. Кузовникова, Ю. И. Федоров // Всесоюзная конференция по регуляции микробного метаболизма. – Пушино, 1989.
7. Ладонин Д. В. Влияние техногенного загрязнения на фракционный состав меди и цинка в почвах // Почвоведение. – 1995. – № 10. – С. 89–92.
8. Ладонин Д. В. Изучение трансформации техногенных форм меди и цинка почвой в условиях модельного эксперимента // Агрохимия. – 1996. – № 1. – С. 94–99.
9. Методы биотестирования с использованием микроорганизмов / В. В. Павленко, Л. А. Демидова, Л. Я. Трубочева и др. // Методы биотестирования вод. – Черноголовка, 1988. – С. 73–77.
10. Обухов А. И. Экологические последствия загрязнения почв тяжелыми металлами и мероприятия по их устранению // Поведение поллютантов в почвах и ландшафтах. – Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1990. – С. 52–60.
11. Обухов А. И. Атомно-абсорбционный анализ в почвенно-биологических исследованиях / А. И. Обухов, И. О. Плеханова. – М: Изд-во МГУ, 1991. – 184 с.
12. Овчаренко М. М. Тяжелые металлы в системе почва – растения – удобрения // Химия в сельском хозяйстве. – 1995. – № 4. – С. 8–16.
13. Оценка токсичности и мутагенности некоторых приоритетных компонентов загрязнения в бактериальной тест-системе *Salmonella typhimurium TA 100* / Т. В. Васильева, В. А. Иваница, Н. Н. Панченко и др. // Технические и системные методы экологического мониторинга. Тр. Ин-та кибернетики НАН Украины. – 1998. – С. 64–68.
14. Плеханова И. О. Накопление тяжелых металлов сельскохозяйственными растениями при внесении осадков сточных вод / И. О. Плеханова, Ю. Д. Кутукова, А. И. Обухов // Почвоведение. – 1995. – № 12. – С. 1530–1536.
15. Садовникова Л. К. Метод изучения соединений цинка в фоновых и загрязненных почвах / Л. К. Садовникова, Д. В. Ладонин // Физ. и хим. методы исследования почв. – 1994. – С. 130–141.
16. Ames B. N. Methods for detection Carcinogens s Mutagens with the *Salmonella*/Mammalian Microsome mutagenicity test / B. N. Ames, Y. McCann, E. Yamasaki // Mut. Res. – 1975. – Vol. 31. – P. 347–364.