

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО БИФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ИНТЕГРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ

Байгина Е.М.

**Научный руководитель ассистент кафедры биофизики ИФБиТ Римацкая Н.В.
ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»**

Введение

Почва является жизненно важным природным ресурсом для всех организмов и для человека в том числе. Необходимо контролировать качество почвы и отслеживать негативные изменения. Для выявления антропогенного загрязнения долгое время использовались химико-аналитические методы. С их помощью можно выявить потенциальную угрозу. В последние десятилетия стали развиваться принципиально новые методы оценки состояния окружающей среды – биологические. Только биотестирование отражает степень воздействия потенциальной угрозы на живой организм и возможные последствия.

Существующие методы биотестирования, использующие для комплексного анализа почв высшие растения, водоросли, дафнии и бактерии, являются трудоемкими и длительными. В сравнении с ними анализ с помощью биолюминесцентной реакции бактериальных ферментов является перспективным методом биотестирования. Он обладает стабильностью, высокой чувствительностью, специфичностью, что позволяет получить быстрые и надежные результаты. Существует методика оценки токсичности водных сред на основе ферментативной системы НАДН:ФМН–оксидоредуктаза –люцифераза. Токсичность образцов оценивается по влиянию загрязнителей на параметры биолюминесценции биферментной системы. Биолюминесцентный метод не отменяет методы аналитической химии, но с помощью него возможно дать быструю и не дорогую интегральную оценку токсичности образцов как в лаборатории, так и в полевых условиях.

На основе имеющейся методики для анализа водных сред биолюминесцентным методом можно разработать метод для оценки токсичности почвы. При этом необходимо использовать водный экстракт, а также выявить чувствительность биферментной системы к данному образцу и подобрать условия для тестирования.

Поэтому целью настоящей работы является оценка возможности проведения анализа токсичности почв биолюминесцентным методом. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Подобрать условия пробоподготовки почвы для проведения анализа с помощью биолюминесцентного метода;
- 2) Изучить влияние индивидуальных характеристик проб почв (рН, абсорбционные свойства) на ферментативную систему НАДН:ФМН–оксидоредуктаза –люцифераза;
- 3) Исследовать действие проб почв разных районов г. Красноярск на биферментную биолюминесцентную систему с учетом индивидуальных характеристик;
- 4) Предложить подходы для разработки метода тестирования почв с помощью биферментной биолюминесцентной системы.

Материалы и методы.

Было отобрано 15 образцов почвы с разных районов города Красноярск. Пробоподготовка проводилась в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2.3:3.8-

04. Почвы, отобранные с территорий, которые необходимо проконтролировать на «токсичность» (загрязнение), освобождают от корней, крупных посторонних частиц и высушивают при 105 °С в течение 1 часа. После охлаждения воздушно-сухую пробу почвы растирают в ступке, просеивают через сито с отверстиями в 3 мм и тщательно перемешивают. Навеску почвы (массой не менее 5,0 г) помещают в коническую колбу, мерным цилиндром приливают пятикратный объем дистиллированной воды (рН 6,8 - 7,4) (5 см³ на 1 г образца), взбалтывают в течение 5 минут и оставляют для экстракции на 24 часа. Через 24 часа экстракт фильтруется через бумажный фильтр - белая, красная ленты (только в случае мутной надосадочной жидкости). После фильтрации пробу центрифугируют, чтобы осадить нерастворимые в воде гуминовые вещества («Eppendorf» centrifuge 5810 R, 20 мин., 1400 об/с). Кислотно-основные свойства почвы определяются согласно стандартной методике определения рН растворов, с использованием рН-метра («HANNA Instruments», HI 2211 рН/ORP Meter).

В биотесте использовалась бактериальная биферментная система НАДН:ФМН-оксидоредуктаза –люцифераза. Реакционная смесь включает в себя:

- 300 мкл Na-K-фосфатного буфера 0,05М, рН 6,8
- 10 мкл КРАБа – комплект реактивов аналитической биолюминесценции (Институт биофизики СО РАН, Красноярск)
- 50 мкл С₁₄ (тетрадеканаль, 0,0025%), («Merck», Германия).
- 100 мкл NADH 4x10⁻⁴моль/литр (никотинамидадениндинуклеотид), (производство «Sigma», США)
- 50 мкл исследуемого вещества
- 10 мкл ФМН 5x10⁻⁴моль/литр (фламинмононуклеотид), (производство «Serva», Германия)

Реакционная смесь помещается в измерительную кювету люминометра («Promega GloMax» 20/20 Luminometer, USA). В качестве анализируемого параметра выступает величина остаточного свечения Т, которая находится по формуле $T = I/I_0 \times 100\%$, где I – интенсивность свечения образца и I₀ – интенсивность свечения контроля (дистиллированная вода).

Водные вытяжки почв имеют разную окраску и степень мутности, следовательно, обладают различными абсорбционными свойствами. Этот факт необходимо учитывать при работе с оптическими системами. Поэтому для корректировки биолюминесцентного анализа используются данные спектрофотометрического измерения вытяжек почв («Shimadzu» UV Spectrophotometer UV-1800, USA). Спектр поглощения сравнивается со спектром биолюминесценции биферментной системы, диапазон измерения 420-630 нм. При этом, если значение абсорбции на длине волны 420 нм (A₄₂₀) превышает 0,100, то эффект светорассеяния необходимо учитывать. Корректировка результата величины свечения образца в люминометре проводилась по формуле (1):

$$I_0 = \frac{I(L)}{\sum_{i=1}^n \frac{g(\lambda_i)}{D_i(\lambda_i)(L/l)} [1 - \exp(-D_i(\lambda_i)(L/l))]}, \quad (1)$$

где I(L) – экспериментально определенная интенсивность биолюминесценции в исследуемом образце толщиной L; g(λ_i) – доля интенсивности биолюминесценции на длине волны λ_i от суммарной интенсивности биолюминесценции; D_i(λ_i) – значение поглощения исследуемого экстракта почвы на длине волны λ_i в кювете шириной l.

Вывод о токсичности образца делается на основе значения величины остаточного свечения Т% (согласно ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2.3:3.8-04):

1 группа – $T > 80\%$ – образец не токсичен (допустимая степень токсичности)

2 группа – $50\% < T < 80\%$ – образец токсичен

3 группа – $T < 50\%$ – образец сильно токсичен

Результаты и обсуждение

Почвы представляют собой сложные многокомпонентные системы. Они различаются между собой по разным параметрам, таким как образующая порода, кислотно-основные свойства, органический и минеральный состав и другим. Важно сделать метод анализа универсальным. Для этого необходимо выделить определенные, главные для данного метода свойства и учитывать их.

Одним из важных параметров, влияющих на биферментную биолюминесцентную систему, являются кислотно-основные свойства образца. Как известно, работа фермента сильно зависит от pH. Оптимум pH для системы НАДН:ФМН- оксидоредуктаза –люцифераза находится в области 6,8-7,1.

Вторым важным параметром являются абсорбционные свойства водной вытяжки почвы. Экстракты различаются по цвету и мутности. Эти факторы необходимо исключить, чтобы не допускать искажения результатов. При этом сравнивается спектр абсорбции и биолюминесценции на одном диапазоне 420-630 нм. Абсорбционная кривая имеет ниспадающий характер, с наибольшим значением при длине волны 420 нм. Если в данной области значение абсорбции превышает 0,100, то необходимо рассчитывать коэффициент коррекции по формуле (1).

Все измеренные параметры и результаты анализа почв на токсичность биолюминесцентным методом до и после коррекции представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительный анализ индивидуальных характеристик и результатов биолюминесцентного анализа почв.

№	Место забора пробы	pH	A_{420}	T%	Коеф. корр.	T% коррект.	Токсичность
1	Ветлужанка (озеро)	7,50	0,017	91,90	1	91,90	Не токсичен
2	Академгородок (Институт леса)	8,04	0,129	65,84	1,026276	70,65	токсичен
3	О. Татышев	7,77	0,077	86,23	1	86,23	Не токсичен
4	КРАЗ-1	8,05	0,074	65,12	1	65,12	токсичен
5	Железнодорожный район (возле вокзала)	8,03	0,188	68,31	1,058997	72,34	токсичен
6	Коммунальный мост (под мостом)	7,89	0,441	38,43	1,064831	40,92	Сильно токсичен
7	Кировский район (под стелой)	8,27	0,292	38,26	1,049399	40,15	Сильно токсичен
8	Ленинский район (под стелой)	8,04	0,092	55,42	1	55,42	токсичен
9	Николаевка	7,93	0,088	55,91	1	55,91	токсичен
10	КрасГЭЦ	7,88	0,247	6,62	1,056719	7,00	Сильно токсичен
11	Солонцы	8,12	0,153	87,17	1,02503	89,35	Не токсичен
12	О. Отдыха (стадион Ярыгина)	8,00	0,106	59,07	1,018657	60,17	токсичен
13	Шинный завод	7,95	0,245	63,34	1,045111	66,20	токсичен
14	Центральный район (Святопокровский храм)	7,98	0,085	93,31	1	93,31	Не токсичен
15	Сопка (биатлон)	7,23	0,072	68,51	1	68,51	токсичен

Из таблицы можно заметить, что все значения рН вытяжек почв не входят в рН-оптимум биферментной системы. На данном этапе исследования невозможно сделать вывод о влиянии рН на оценку токсичности, так как щелочные свойства экстракта почвы могут быть обусловлены собственными характеристиками или влиянием внешнего загрязнителя.

Некоторые водные вытяжки почв оставались сильно окрашенными и мутными даже после фильтрации и центрифугирования. Этот факт отражают значения абсорбционных свойств почв (A_{420}), которые не должны превышать 0,100 для достоверной оценки интенсивности свечения без учета светорассеяния. Для более чем 50% образцов необходим расчет коэффициента коррекции (коэф. корр.).

Анализируя результаты величины остаточного свечения после корректировки (Т% коррект.), можно заметить, что одна пятая образцов являются сильно токсичными. Примерно столько же проб почв не токсичны вовсе, или имеют допустимую степень токсичности. Самым токсичным образцом является проба 10 (район КрасТЭЦ), самыми «чистыми» образцами оказались пробы 1 (район Ветлужанка) и 14 (Центральный район, Святопокровский храм).

Выводы

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

- 1) Для проведения биотестирования на основе биферментной системы НАДН:ФМН – оксидоредуктаза – люцифераза необходимо осуществлять пробоподготовку почвы в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2.3:3.8-04, с добавлением процедуры центрифугирования.
- 2) Для исключения влияния индивидуальных характеристик проб почв необходимо измерять абсорбционные свойства образцов, для проб со значением A_{420} , превышающим 0,1, рассчитывать коэффициент коррекции.
- 3) Результаты анализа токсичности почв Красноярска показали, что большинство почв являются токсичными, в районе КрасТЭЦ остаточное свечение проб почв составляет 7% - самый токсичный образец, тогда как в Центральном районе (Святопокровский храм) и в Ветлужанке (озеро) остаточное свечение 93% и 92% соответственно – нетоксичные пробы.
- 4) Для разработки биолюминесцентного тестирования почвы требуется провести ряд исследований по увеличению чувствительности биотеста, сравнительный анализ полученных результатов биотестирования с химическим анализом и другими биотестами. Это позволит разработать критерии оценки разной степени токсичности почвы.