

---

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ АБОРИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ И КУЛЬТУРЫ *BACILLUS PUMILUS*

С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая

Казанский государственный университет  
ул. Кремлевская, 18, Казань, Россия, 420008

Изучено влияние металлов (Cu, Pb, Ni, Cr, Cd) и фунгицида альто-супер на дегидрогеназную активность аборигенной микрофлоры серой лесной почвы и лабораторной культуры *Bacillus pumilus* КМ-21. Установлено, что внесение в почву металлов вызывает дозо-зависимое ингибирование дегидрогеназной активности аборигенной микрофлоры и *Bacillus pumilus* КМ-21, оцененной в контактном и элюатном тестах. Сравнение концентраций металлов, вызывающих 50% ингибирование дегидрогеназной активности, выявило, что контактный тест оказался более чувствительным по сравнению с элюатным. Отмечена тесная корреляция между изменениями в чистой культуре (контактный тест) и аборигенной микрофлоры, что позволяет рекомендовать контактный тест для оценки загрязнения почв экзогенными токсичными веществами.

**Ключевые слова:** токсиканты, почва, биотестирование, дегидрогеназная активность, серые лесные почвы.

Поступление в почву экзогенных органических и неорганических веществ приводит к увеличению ее токсичности в отношении микроорганизмов. Для оценки ответной реакции почвенных микробных сообществ на воздействие токсичных соединений применяется широкий спектр показателей, основанных на анализе активности аборигенной микрофлоры, например, базального и субстрат-индуцированного дыхания, дегидрогеназной, протеазной, фосфатазной, липазной активностей или ее биомассы [1; 2]. В дополнение к указанным методам, основанным на оценке состояния аборигенной микрофлоры, для оценки токсичности почвы предлагаются методы биотестирования, суть которых заключается в определении воздействия анализируемого почвенного образца на лабораторную культуру микроорганизмов, называемую тест-объектом [3; 4]. Наиболее известными микробными тест-объектами являются *Vibrio fischeri* и *Pseudomonas putida*, в качестве функций, изменение которых подвергается регистрации при оценке влияния токсикантов, чаще всего применяются изменение роста культуры или активности ферментов [4; 5]. Методы биотестирования подразделяются на две группы — элюатные и контактные. В элюатных тестах предварительно из почвы получают водный экстракт и затем определяют эффект его воздействия на лабораторную культуру микроорганизмов. В контактных тестах оценивают эффект воздействия на культуру микроорганизмов непосредственно почвенного образца. Первая группа методов биотестирования получила большее распространение [4], тогда как контактные микробные тесты в настоящее время находятся в стадии разработки [5].

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка токсичности серой лесной почвы, загрязненной рядом металлов (Cu, Pb, Cd, Cr, Ni) и фунгицидом альто-супер, в отношении дегидрогеназной активности аборигенной микрофлоры почвы и лабораторной культуры *Bacillus pumilus*.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали серую лесную супесчаную почву с содержанием органического вещества по  $C_{орг}$  0,76%. В образцы почвы вносили отдельно соли индивидуальных металлов ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  — 5—360;  $PbCl_2$  — 15—1500;  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  — 0,25—232;  $NiSO_4$  — 10—500;  $K_2Cr_2O_7$  — 0,312—3971 мг элемента/кг почвы) и фунгицид альто-супер (0,35—67,8 мг/кг). Токсиканты вносили в почву в виде водных растворов, инкубировали в течение 7 сут при комнатной температуре (22 °C). Образцы делили на две части. В первой части определяли дегидрогеназную активность аборигенной микрофлоры почвы, вторую часть стерилизовали в автоклаве (1 атм, 20 мин.).

Дегидрогеназную активность аборигенной микрофлоры почвы определяли по скорости восстановления резазурина [6]. Навеску почвы (3 г) помещали в пробирки с завинчивающимися пробками, приливали 3 мл дистиллированной воды и помещали на ротатор (60 об./мин., 2 ч). Через 2 ч добавляли 4 мл резазурина (20 мг/л), растворенного в калиево-фосфатном буфере. Пробирки вновь помещали на ротатор (50 мин.), центрифугировали (10 мин., 3,5 тыс. об./мин.). Невосстановленный резаурин определяли в надосадочной жидкости спектрофотометрически при длине волны ( $\lambda$ ) 600 нм.

Для оценки воздействия загрязнителей на дегидрогеназную активность аборигенной почвенной микрофлоры рассчитывали относительную дегидрогеназную активность ( $A_{отн}$ ):

$$A_{отн} = \frac{P_{зп}}{P_{нп}}$$

где  $P_{зп}$  — экстинкция пробы почвы с токсикантом, опт. ед.;  $P_{нп}$  — экстинкция пробы контрольной почвы (без токсиканта), опт. ед.

При биотестировании почвенных образцов использовали грамположительную бактерию *Bacillus pumilus* КМ-21 (тест-объект). Тест-функцией служила актуальная дегидрогеназная активность культуры.

**Контактный тест** осуществляли в соответствии со следующей процедурой. Навеску стерильной почвы (3 г), помещали в пробирки с завинчивающимися пробками, приливали 1 мл бактериальной суспензии (*B. pumilus*), 3 мл дистиллированной воды и помещали на ротатор (60 об./мин., 2 ч). Затем добавляли 4 мл резазурина (20 мг/л), растворенного в калиево-фосфатном буфере. Пробирки снова помещали на ротатор на 50 мин., а затем пробы центрифугировали (10 мин. при 3,5 тыс. об./мин.). Невосстановленный резаурин определяли в надосадочной жидкости спектрофотометрически при  $\lambda = 600$  нм. Контролем служила дегидрогеназная активность культуры *B. pumilus* в присутствии дистиллированной воды (контроль активность культуры — КА).

Для того, чтобы избежать влияния окрашенных компонентов ростовой среды или почвы, предусматривали так называемую слепую пробу, где 1 мл бактериальной суспензии был заменен на 1 мл дистиллированной воды.

Рассчитывали относительную дегидрогеназную активность культуры микроорганизмов ( $A_{отн}$ ):

$$A_{отн} = \frac{P_{проба}^{сл} - P_{проба}}{P_{Ка}^{сл} - P_{Ка}},$$

где  $P_{Ка}$  — экстинкция пробы при оценке активности культуры;  $P_{Ка}^{сл}$  — экстинкция слепой пробы при оценке активности культуры;  $P_{проба}$  — экстинкция пробы образца;  $P_{проба}^{сл}$  — экстинкция слепой пробы образца.

**Элюатный тест** проводили в соответствии с процедурой, описанной для контактного теста, заменяя 3 г стерильной почвы на 3 мл водного экстракта почвы (навеску почвы 1 г разбавляли дехлорированной водой в соотношении 1 : 10, встряхивали на ротаторе (1 ч, 60 об./мин. и затем фильтровали). Контролем служила дегидрогеназная активность культуры *B. pumilus* в присутствии дистиллированной воды (контроль активность культуры — КА).

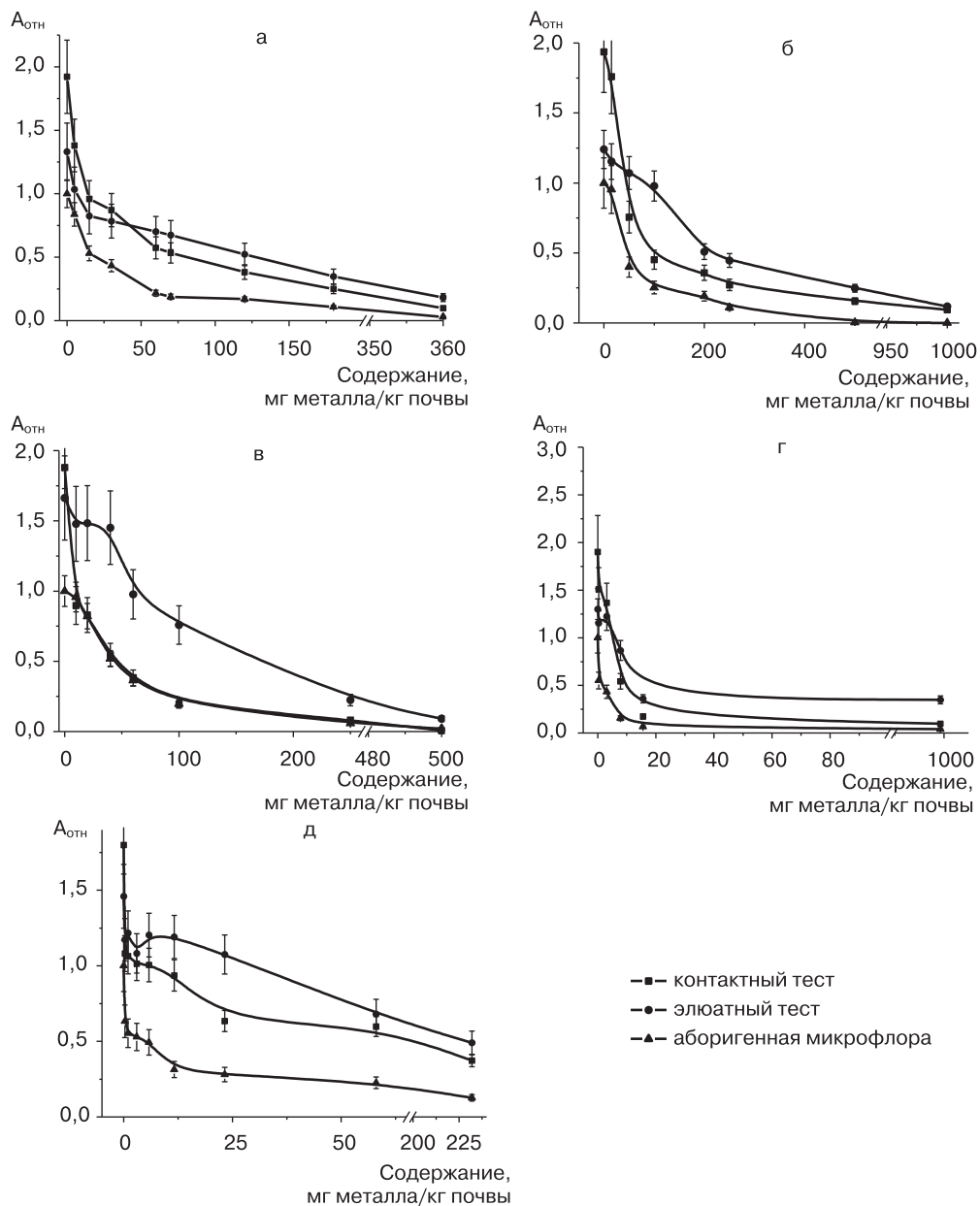
Для расчета концентраций, вызывающих 50%-ное ингибирование ( $EC_{50}$ ) использовали кинетическую модель [6]. Все измерения проводили в пятикратной повторности.

**Результаты и их обсуждение.** Было установлено, что незагрязненная (контрольная) почва оказывает стимулирующий эффект на дегидрогеназную активность *B. pumilus*, (увеличение в 1,7—2 раза по сравнению с активностью *B. pumilus* в присутствии дистиллированной воды), что, скорее всего, связано с действием органического вещества почвы. Достоверный ингибирующий эффект на дегидрогеназную активность *B. pumilus* (контактный тест) оказывала почва, содержащая 30 мг/кг Cu (рис. 1а). Мерой токсичности вещества в почве служит его концентрация, вызывающая 50%-ное ингибирование ( $EC_{50}$ ) тест-функции (дегидрогеназной активности): чем выше значение  $EC_{50}$ , тем вещество менее токсично. Поскольку в эксперименте с *B. pumilus* не была установлена  $EC_{50}$  для меди, то она была рассчитана. На основе модели было определено значение  $EC_{50}$ , которое составило для меди 65,1 мг элемента/кг (табл. 1). В элюатном тесте рассчитанное значение  $EC_{500}$  меди оказалось в 1,6 раз больше по сравнению со значением  $EC_{50}$ , контактного теста.

Таблица 1

**Интервалы значений концентраций различных токсикантов в почве, вызывающих 50% ингибирование дегидрогеназной активности *B. pumilus* ( $EC_{50}$ ), определенные в контактном (а) и элюатном (б) тестах**

Токсикант	Интервалы значений $EC_{50}$ , мг (металла/фунгицида)/кг	
	а	б
Cu	60,3—74,1	96,1—121,5
Cd	7,2—10,4	321,3—374,3
Ni	94,1—107,1	157—189,9
Pb	106,8—131,3	234,0—280,2
Cr (VI)	10,1—14,5	17,4—22,3
Фунгицид альто-супер	14,4—23,5	81,0—87,0



**Рис. 1.** Влияние солей металлов Cu (а), Pb (б), Ni (в), Cr (г), Cd (д) на относительную (контактный и элюатный тесты) дегидрогеназную активность ( $A_{отн}$ ) *B. pumilus* и аборигенной микрофлоры серой лесной почвы

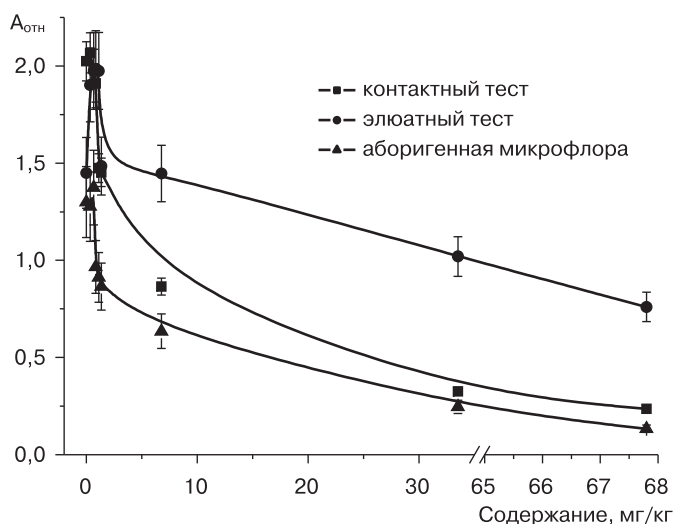
Значения  $EC_{50}$  свинца, рассчитанные по результатам контактного и элюатного тестов, составили 119,1 и 257,3 мг/кг соответственно (см. табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что токсичность свинца для дегидрогеназной активности *B. pumilus*, оказалась ниже, чем меди.

Токсичность почвы, содержащей никель для *B. pumilus* показана на рис. 1 в. Выявлено, что значение  $EC_{50}$  для никеля в почве составило 99,6 и 174,1 мг элемента/кг почвы в контактном и элюатном тестах соответственно (табл. 1).

Изменение дегидрогеназной активности *B. pumilus* при воздействии на нее почвенных образцов, загрязненных солями хрома и кадмия представлены на рис. 1 г, д. Можно отметить, что при контактном биотестировании эти металлы оказались более токсичными для тест-объекта. Значения  $EC_{50}$  (контактный и элюатный тесты) для кадмия составили 8,6 и 227,4, а для хрома 12,1 и 18,3 мг элемента/кг соответственно.

Установлено, что токсичность металлов для *B. pumilus* (контактный тест) снижалась в ряду  $Cd > Cr > Cu > Ni > Pb$ , а в элюатном тесте —  $Cr > Cu > Ni > Cd > Pb$ .

Оценка реакции тестового организма на органический токсикант (фунгицид альто-супер) представлена на рис. 2. Этот фунгицид широко используется в сельском и лесном хозяйстве. Значения  $EC_{50}$  для фунгицида (контактный и элюатный тесты) существенно различались и составили 18,8 и 85 мг вещества/кг соответственно.



**Рис. 2.** Влияние фунгицида альто-супер на относительную дегидрогеназную активность ( $A_{отн}$ ) *B. pumilus* (контактный и элюатный тесты) и аборигенной микрофлоры серой лесной почвы

Полученные результаты свидетельствуют о большей чувствительности контактного теста по сравнению с элюатным. Можно заключить также, что ингибирующий эффект на дегидрогеназную активность бактерий рода *Bacillus*, могут оказывать водорастворимые и связанные с почвенной матрицей фракции токсикантов. Полученные выводы согласуются с данными Ivask с соавторами [8], демонстрирующими, что токсичность почвы, загрязненной кадмием, для генетически измененного штамма *B. subtilis* BR151-(pTOO24) в контактном тесте в 90 раз выше, чем в элюатном тесте, а ртути и свинца — в 30 и 20 раз соответственно. Важными факторами, определяющими токсичность вещества в почве, являются ее тип, содержание в ней органического вещества, кислотность и механический состав [8].

В этих же почвенных образцах была определена дегидрогеназная активность аборигенной микрофлоры (см. рис. 1, 2). Внесение металлов приводило к снижению дегидрогеназной активности почвы. Наибольший негативный эффект выявлен при загрязнении хромом (см. рис. 1г). Значение  $EC_{50}$  для хрома составило 0,9 мг/кг почвы. Наименьшее влияние на дегидрогеназную активность аборигенной микрофлоры оказывал никель ( $EC_{50}$  41 мг/кг) (см. рис. 1в). Установлены значения  $EC_{50}$  для кадмия, меди и свинца, которые составили 3,6, 19,7 и 23,6 мг элемента/кг почвы соответственно. На основании значений  $EC_{50}$  (аборигенная микрофлора), металлы составили ряд:  $Cr > Cd > Cu > Pb > Ni$ .

Концентрации кадмия в почве, вызывающие 50% ингибирование дегидрогеназной активности аборигенной микрофлоры, составили 1082—1111, 323—483 и 1484—1429 мг Cd/кг (через 3 ч, 20 и 60 сут после внесения токсиканта соответственно) [9]. Менее токсичным оказался никель, значение  $EC_{50}$  которого составило 2885,1 и 9127,5 мг/кг (через 3 ч и 40 сут после внесения токсиканта соответственно) [10]. Установленные нами значения  $EC_{50}$  для изученных металлов оказались существенно ниже. Это, возможно, связано с тем, что упомянутые авторы изучали почву с более высоким содержанием органического вещества. В литературе представлены данные и о более высокой чувствительности дегидрогеназной активности аборигенной микрофлоры к металлам. Так, дегидрогеназная активность почвы, содержащая Cu, Pb, Cd и Zn в концентрациях 22,1; 15,3; 2,2 и 60,6 мг элемента/кг, составляет лишь 4% от таковой в незагрязненной [11]. Эти значения сопоставимы с данными нашего исследования.

Дегидрогеназная активности аборигенной микрофлоры почв, при низком содержании фунгицида (менее 1 мг/кг), увеличивалась на 25—35% (см. рис. 2). При возрастании содержания фунгицида в почве наблюдали дозо-зависимое снижение активности.

Значения  $EC_{50}$ , установленные в контактном тесте, оказались выше значений, установленных при анализе аборигенной микрофлоры в 3; 5; 2,5; 2,4 и 13 раз для Cu, Pb, Ni, Cd и Cr, для элюатного теста были значительно больше и составили 5,3; 11; 4,2; 6,3 и 20 раз соответственно. Это позволяет считать контактный тест более чувствительным по сравнению с элюатным. К тому же выявлена тесная корреляция между величинами ингибирования дегидрогеназной активности контактного теста с *B. pumilus* и аборигенной микрофлоры ( $r = 0,96$ ). При сопоставлении результатов элюатного теста и аборигенной микрофлоры коэффициент корреляции оказался ниже ( $r = 0,62$ ). Это позволяет заключить, что контактный тест более адекватно отражает воздействие исследованных токсикантов на почвенную микрофлору.

Таким образом, загрязнение серой лесной почвы неорганическими токсикантами (Cd, Ni, Cu, Pb, Cr) вызывало дозо-зависимое ингибирование дегидрогеназной активности аборигенного микробного сообщества почвы и штамма *B. pumilus*. Определение токсичности почвы в контактном и элюатном тестах с *B. pumilus* выявили большую чувствительность контактного, который может быть рекомендован для оценки загрязнения почв экзогенными токсичными веществами.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Ананьева Н.Д., Благодатская Е.В., Демкина Т.С.* Оценка устойчивости почвенных микробных комплексов к природным и антропогенным воздействиям // Почвоведение. — 2002. — № 5.
- [2] *Giller K.E., Witter E., McGrath S.P.* Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review // Soil Biol. Biochem. — 1998. — V. 10/11.
- [3] *Kapanen A., Itavaara M.* Ecotoxicity Tests Compost Applications // Ecotoxicol. Environ. Safety. — 2001. — V. 49.
- [4] *Ronnpagel K., Janssen E., Ahlf W.* Asking for indicator function of bioassays evaluating soil contamination: are bioassays results reasonable surrogates of effects on soil microflora? // Chemosphere. — 1998. — V. 36. — No 6.
- [5] *Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю.* Оценка токсичности плотных многокомпонентных сред с использованием контактного метода биотестирования // Токсикологический вестник. — 2006. — № 4.
- [6] *Ronnpagel K., Liss W., Ahlf W.* Microbial bioassays to assess the toxicity of solid-associated contaminants // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 1995. — V. 31. — P. 99—103.
- [7] *Speir T.W., Kettles H.A., Parshotam A., Searle P.L., Vlaar L.N.C.* A simple kinetic approach to derive the ecological dose value, ED50, for the assessment of Cr(VI) toxicity to soil biological properties // Soil Biol. Biochem. — 1995. — V. 27.
- [8] *Ivask A., Fracois M., Kahru A., Dobourguier 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.
- [9] *Moreno J.L., Sanchez-Marin A., Hernandez T., Garsia C.* Effect of cadmium on microbial activity and a ryegrass crop in two semiarid soils // Environ. Manag. — 2006. — V. 37.
- [10] *Moreno J.L., Perez A., Aliaga A., Hernandez T.* The ecological dose of nickel in semiarid soil amended with sewage sludge related to unamended soil // Water, Air and Soil Pollution. — 2003. — V. 143.
- [11] *Hinojosa M.B., Carreira J.A., Garzia-Ruiz R., Dick R.P.* Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils // Soil Biol. Biochem. — 2004. — V. 36.

## COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECTS OF CONTAMINANTS ON DEHYDROGENASE ACTIVITIES OF INDIGENOUS MICROFLORA OF GRAY FOREST SOIL AND BACTERIA *BACILLUS PUMILUS*

S.Yu. Selivanovskaya, P.Yu. Galitskaya

Kazan State University

*Kremlyevskaya str., 18, Kazan, Russia, 420008*

The effects of metals (Cu, Pb, Ni, Cr, Cd) and fungicide alto-super on dehydrogenase activities of indigenous microflora of grey forest soil and laboratory culture *Bacillus pumilus* KM-21 were studied. It was determined that the putting of the metals into soil caused the dose-effect inhibition of dehydrogenase activities of indigenous microflora of soil and dehydrogenase activities *Bacillus pumilus* KM-21 estimated in eluate and contact tests. On the base of the established metal concentration causing the 50% inhibition on dehydrogenase activity, it was revealed that the contact test was more sensitive in comparison with eluate test. Cose relation between the alteration in activities of microbial culture (contact test) and indigenous microflora was shown. It allowed to recommend the contact test for estimation of the soil contamination with toxic compounds.

**Key words:** toxicants, soil, biotesting, dehydrogenase activity, grey forest soil.