

Токсичность почв городов Ростовской области

© 2012. М. А. Сазыкина, к.б.н., зав. лабораторией, Е. М. Новикова, м.н.с.,
З. С. Кхатаб, аспирант, В. А. Чистяков, к.б.н., зав. лабораторией,
И. С. Сазыкин, н.с., Г. В. Омельченко, м.н.с.,
Научно-исследовательский институт Южного федерального университета,
e-mail: submarinas@list.ru, levii4atelena@mail.ru

Приведены данные по токсичности почв городов Ростовской области, полученные с использованием бактериальных lux-биосенсоров. Анализ полученных результатов позволил идентифицировать районы, подверженные максимальному токсикологическому прессингу. Показано, что использование системы тестов на основе lux-биосенсоров даёт возможность получения объективной информации о качестве окружающей среды.

The data on genotoxicity of Rostov region soils received with usage of bacterial lux-biosensors are given. The analysis of the received results allowed identifying the areas exposed to the maximum toxicological pressure. It is shown that usage of a system of tests based on lux-biosensors gives the possibility to receive objective information about the condition of ecosystems.

Ключевые слова: lux-биосенсоры, генотоксичность, токсичность, биотестирование, загрязнение, ртуть, мышьяк

Keywords: lux-biosensors, genotoxicity, toxicity, biotesting, pollution, mercury, arsenic

Ростовская область входит в зону территорий с высоким процентом земель сельскохозяйственного назначения, земель промышленности и иного специального назначения, высокой плотностью населённых пунктов [1]. Её земельный фонд составил на 1 января 2010 года 10096,7 тыс. га. На территории области практически не осталось земель, которые не испытывали бы антропогенное воздействие. Сократились площади наиболее ценных почв, уменьшился уровень плодородия всего почвенного покрова.

Поддержание биопродуктивности почвенных ресурсов в условиях активного развития сельскохозяйственного производства, промышленности и урбанизации возможно только при хорошо налаженном экотоксикологическом контроле.

Ввиду многообразия антропогенных поллютантов, сложности и динамичности реакций их трансформации в экосистемах растут требования к тест-системам, используемым для мониторинга загрязнения. Достичь высокой экспрессности и производительности в тестировании качества природной среды позволяет использование биолюминесцентных бактерий [2 – 4]. Такие тест-системы удобны для оценки загрязнения окружающей среды генотоксинами, тяжёлыми металлами, металлоидами, нитратами, сульфонатами и т. д. [5, 6].

Высокая чувствительность и экономичность биолюминесцентных тестов позволяет

достичь высокой производительности тестирования, использовать для первичного скрининга большие массивы природных образцов с целью выделения групп для последующего химического анализа.

Задачей нашей работы было определение токсичности почв урбанизированных территорий Ростовской области с использованием люминесцентных биосенсоров.

Материалы и методы

Материалом проведённых исследований служили 5 образцов почв, отобранных в сентябре 2010 г. в городах Ростовской области с различными источниками загрязнения; 9 образцов почв, отобранных в октябре 2010 г. в г. Ростове-на-Дону в районах с разным уровнем антропогенной нагрузки.

Отбор проб почвы был проведён с глубины 0–25 см методом «конверта» в 5 повторностях [7, 8].

По 1000 г каждой пробы упаковывали в химически чистую посуду и доставляли в лабораторию.

Навески почв массой 20 г помещали в коническую колбу Эрленмейера с притертой крышкой, добавляли 20 мл 1% раствора TWEEN-80 в 96% этаноле и экстрагировали в течение 60 минут на качалке ES-20 («Biosan», Латвия) при 100 об/мин при комнатной тем-

пературе. Затем экстракты фильтровали через обеззоленный бумажный фильтр «синяя лента», 50 мкл экстракта использовали для тестирования генотоксичности.

В качестве тест-системы для определения генотоксичности была использована модификация SOS-lux теста [9]. Репортёром SOS-ответа служил lux-оперон. Использовали штамм *E. coli* C600, трансформированный плазмидой pPLS-1, в которой оперон билюминесценции находится под контролем SOS-промотора [10]. Для контроля эффектов, не связанных с SOS-индукцией, использовали штамм *E. coli* C600(pPBA-5), lux-оперон которого находится под контролем конститутивного промотора.

Для контроля присутствия в почве прооксидантов использовались штаммы *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) и *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux). Биосенсоры применяются для детекции ответа на окислительный стресс, вызываемый появлением в среде перекиси водорода и супероксид-аниона соответственно. Штамм *E. coli* MG1655 (pMerR-lux) использовался для обнаружения ртути, а штамм *E. coli* MG1655 (pArsR-lux) – для детекции мышьяка. Штаммы были любезно предоставлены И.В. Мануховым (ФГУП «ГосНИИГенетика»).

Бактерии растили в бульоне Луриа-Бертани (LB), содержащем 100 мкг/мл ампициллина, с аэрацией при 30 °С. Ночную культуру разводили до концентрации 10^7 клеток/мл в бульоне LB и подращивали при 30 °С в течение двух часов. Затем аликвоты культуры по 190 мкл переносили в лунки 96-луночного планшета, часть которых служила контролем (в них добавляли 10 мкл 1% раствора TWEEN-80 в 96% этаноле), а в другие вносили по 10 мкл исследуемого экстракта почв. В вариантах с метаболической активацией (обозначаемой в таблицах 1, 2 как «+S9») в лунки вносили по 180 мкл культуры, 10 мкл исследуемого экстракта (в контрольном варианте – 10 мкл 1% раствора TWEEN-80 («Amresco») в 96 % этаноле и 10 мкл активирующей смеси, содержащей фракцию S9 микросомных ферментов печени крыс («Moltox»).

Приготовленные таким образом лунки с клетками lux-биосенсора помещали в микропланшетный люминометр LM-01T («Immunotech») и через определенные интервалы времени измеряли интенсивность билюминесценции клеточной суспензии. Инкубацию проб проводили при температуре 30 °С. Мерой токсичности служил фактор индукции (I), который определяли как отношение интенсивно-

сти свечения суспензии SOS-lux штамма, содержащей тестируемое соединение (I_c), к интенсивности свечения контрольной суспензии SOS-lux штамма (I_k):

$$I = I_c / I_k. \quad (1)$$

Мерой генотоксичности при использовании в качестве тест-системы модифицированного SOS-lux теста служил фактор индукции (I'), который рассчитывали по формуле:

$$I' = I / K, \quad (2)$$

где I – фактор индукции, K – коэффициент подавления.

Коэффициент подавления свечения вычисляли по формуле:

$$K = I_c / I_k, \quad (3)$$

где I_c – интенсивность свечения суспензии lux-штамма в присутствии тестируемого соединения; I_k – интенсивность свечения контрольной суспензии.

Достоверность отличия билюминесценции в опыте от контрольной величины оценивали по t-критерию [11].

Вывод о токсичности пробы делали при $p < 0,05$. Если при достоверном отличии опыта от контроля значения фактора индукции были меньше 2, обнаруженный генотоксический эффект оценивали как «слабый»; если они лежали в диапазоне от 2 до 10 – как «средний», а при превышении 10 – как «сильный».

Количества ртути и мышьяка, способные индуцировать эквивалентный ответ биосенсора, оценивали в соответствии с градуировочными графиками [3].

Все эксперименты проводили в трёх-пяти независимых повторностях.

Результаты и их обсуждение

Результаты тестирования проб почв с использованием бактериальных lux-биосенсоров представлены в таблицах 1 и 2.

Билюминесцентный ответ биосенсора *E. coli* C600 (pPLS-1), реагирующего на наличие ДНК-тропных веществ, показал наличие прямых мутагенов во всех исследованных пробах почв, отобранных в городах Ростовской области. Был зафиксирован генотоксический эффект как слабой, так и средней силы (табл. 1).

Наличие веществ промутагенной природы удалось выявить во всех образцах почвы,

за исключением образца с территории ТЭЦ г. Шахты.

В экстракте почвы № 2, отобранной в районе ГРЭС в г. Новочеркасске, зарегистрирована самая большая величина генотоксического эффекта (фактор индукции 4,47 ед.).

Город Новочеркасск является одним из наиболее крупных индустриальных центров Ростовской области и в то же время одним из наиболее неблагоприятных в экологиче-

ском отношении городов области и Юга России в целом. В структуре промышленности г. Новочеркаска преобладают предприятия химической, энергетической, машиностроительной и строительной промышленности. Ежегодно в г. Новочеркасске образуется порядка 1000 тыс. т промышленных и 60 тыс. т твердых бытовых отходов [1].

Основным загрязнителем в городе, а также на территории области, является Ново-

Таблица 1

Токсичность образцов почвы, отобранной в городах Ростовской области

№	Место отбора почвы	Фактор индукции, I					
		<i>E. coli</i> C600 (pPLS-1)		<i>E. coli</i> MG1655 (pSoxS-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pKatG-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pMerR-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pArsR-lux)
		- S9	+ S9				
1.	г. Волгодонск, АЭС (3-км зона)	1,90*	1,55*	1,36	1,93*	1,33	1,23
2.	г. Новочеркасск, ГРЭС (2-км зона)	4,47*	1,87*	1,76*	2,41*	1,42	1,43
3.	г. Шахты, территория ТЭЦ	2,05*	1,22	1,46	1,80*	1,52*	1,09
4.	г. Новошахтинск, зона терриконов	3,63*	2,47*	1,68*	1,75*	1,42	1,11
5.	г. Новошахтинск, территория города	2,48*	3,18*	2,03*	1,89*	1,29	1,56*

Примечание: * – отличия от контроля статистически значимы при $p < 0,05$.

Таблица 2

Токсичность образцов почвы, отобранной в различных районах г. Ростова-на-Дону (2010 г.)

№	Место отбора почвы	Фактор индукции, I					
		<i>E. coli</i> C600 (pPLS-1)		<i>E. coli</i> MG1655 (pSoxS-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pKatG-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pMerR-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pArsR-lux)
		- S9	+ S9				
1.	Ботанический сад	2,00*	1,16	1,91*	1,78*	1,02	1,16
2.	Район ж/д вокзала (ул. Сиверса)	1,95*	1,05	1,49*	1,61*	1,05	1,34
3.	Район аэропорта, (ул. Шолохова)	3,22*	1,14	1,72*	1,96*	1,08	1,17
4.	Район ТЭЦ-2 (2-я Краснодарская ул.)	5,47*	1,10	1,93*	1,75*	1,08	1,34
5.	Каменка, в районе р. Темерник	1,81*	1,21	1,79*	1,85*	1,05	1,54*
6.	Западный микрорайон, пр. Стачки	0,60	1,22	1,56*	1,94*	1,07	2,00*
7.	Район ТЭЦ-2 (Таганрогское шоссе)	2,25*	1,64*	2,01*	2,04*	0,90	1,28
8.	Центр (пр. Буденновский)	2,20*	1,34	6,98*	2,52*	1,11	3,59*
9.	Змиевская балка	4,06*	0,99	2,18*	2,66*	1,07	1,30

Примечание: * – отличия от контроля статистически значимы при $p < 0,05$.

черкасская ГРЭС (I класс опасности). На её долю приходится 52% от общего количества выбросов в городе стационарными источниками [12]. От этого предприятия в атмосферу в основном поступают оксиды азота, диоксид серы, оксид углерода, зола.

Генотоксичность почв, выявленная в районе крупнейшего источника загрязнения области ОАО «Новочеркасская ГРЭС», по всей видимости, является результатом её выбросов.

Обнаруженные генотоксические эффекты в почвах других городов, скорее всего, также объясняются высокой концентрацией промышленных предприятий в данных районах. Так, в г. Новошахтинск и г. Шахты постоянными экологически опасными объектами загрязнения окружающей среды являются расположенные на территории города породные отвалы (терриконы) угольных шахт. Негорящие породные отвалы выделяют пылевые твёрдые частицы (зола). Горящие отвалы, кроме твёрдых частиц, выбрасывают оксид углерода, оксиды азота, диоксид серы, сероводород и другие вредные загрязнители. В г. Волгодонске основными источниками загрязнения атмосферного воздуха являются такие отрасли промышленности, как химическая, электроэнергетическая, деревообрабатывающая, пищевая, автотранспортный комплекс.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что в экстрактах почв г. Ростова-на-Дону преобладают прямые мутагены – они зафиксированы во всех пробах (89%), кроме шестой.

Присутствие веществ промутагенной природы отмечено лишь в одной пробе № 7 (11%). В экстракте почвы № 6 генотоксичный эффект, по всей видимости, не выявлен ввиду её высокой интегральной токсичности (данные по токсичности не приводятся). Полученные эффекты, вероятно, обусловлены индустриальным загрязнением г. Ростова-на-Дону. Основными загрязнителями территории города являются автотранспорт, предприятия теплоэнергетики, машиностроения и стройиндустрии, а также суда воздушного транспорта.

Самый высокий генотоксический эффект (величина фактора индукции составила 5,47 ед.) выявлен в пробе почвы № 4, которая была отобрана в районе Ростовской ТЭЦ-2. Известно, что энергетика является одной из самых загрязняющих отраслей народного хозяйства, а ТЭЦ – главные загрязнители атмосферы твёрдыми частицами золы, оксидами азота, другими веществами, оказывающими вредное воздействие на здоровье людей, а также

углекислым газом, способствующим возникновению «парникового эффекта».

Вещества, вызывающие окислительный стресс, зафиксированы в трёх пробах (60%) почв городов Ростовской области при тестировании с помощью штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), и во всех пробах почв – с помощью биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) (табл. 1).

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о наличии прооксидантов во всех исследованных экстрактах почв г. Ростова-на-Дону. Самый большой эффект зафиксирован при помощи биосенсора *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) в центре города в районе пр. Будёновский (величина фактора индукции составила 6,98 ед.). Пр. Будёновский – одна из самых оживлённых автотрасс города. В составе отработавших газов автомобильных двигателей внутреннего сгорания содержатся сотни вредных компонентов, среди которых наиболее существенными являются оксид углерода, углеводороды, оксиды азота, альдегиды и др. Оксиды азота, например, в результате фотохимических реакций с другими органическими веществами выхлопных газов, образуют свободные радикалы, пероксиды и другие соединения, вызывающие окислительный стресс.

Содержание мышьяка и ртути, дающих высокий статистически значимый эффект, ни в одной из исследованных проб не обнаружено (табл. 1, 2).

Самый большой коэффициент индукции биолюминесценции биосенсора *E. coli* MG1655 (pMerR-lux), зафиксированный в экстрактах почв, составил 1,52 ед. Этот фактор индукции соответствует концентрациям ртути менее 0,0002 мг/л (10^{-9} моль/л). Так как биосенсор *E. coli* MG1655 (pMerR-lux) достаточно высокоспецифичен, чувствительность к ртути на несколько порядков выше, чем к кадмию, поэтому при оценке качества природных образцов ответ штамма расценивался как реакция на присутствие солей ртути.

Максимальный коэффициент индукции *E. coli* MG1655 (pArsR-lux) сенсора составил 3,59 ед. (этот фактор индукции соответствует концентрациям мышьяка менее 0,00075 мг/л (10^{-8} моль/л)). Учитывая тот факт, что в большинстве своём фоновое содержание мышьяка в почвах составляет сотые доли миллиграмма на килограмм почвы, обнаруженные нами концентрации не представляют опасности.

Следует отметить, что если в области контроля и охраны атмосферного воздуха и природных вод разработаны методы анализа и ПДК

для довольно большого числа веществ и элементов, то в области мониторинга и охраны почв выявление уровня токсичности тяжёлых металлов затруднено. Для почв с разными механическими составами и содержанием органического вещества этот уровень будет неодинаков. В настоящее время ПДК для ртути составляет 2,1 мг/кг, для мышьяка – 2,0 мг/кг [13]. Для кадмия предложен ОДК, равный 0,5–2,0 мг/кг [14].

В исследованных нами образцах почв содержание ртути и мышьяка, как отмечено выше, невелико. Возможно, благодаря тому факту, что именно почвенный покров в конечном итоге принимает на себя давление потока промышленных и коммунальных выбросов и отходов, выполняя важнейшую роль буфера и детоксиканта. Тяжёлые металлы, фтор, оксиды азота и серы в первоначальном или преобразованном виде интенсивно связываются минеральными и органическими веществами почвы, что резко снижает их доступность, и соответственно общий уровень токсичности. Сопротивляемость почв химическому загрязнению также зависит от их гранулометрического состава, содержания гумуса, ёмкости поглощения, водного режима, водопроницаемости, преобладания нисходящих или восходящих токов влаги и т.п. [15].

Возможно, в исследованных образцах почв преобладают другие металлы. Известно, что для каждого города характерен определённый набор доминантов-загрязнителей. Эти элементы определяют «геохимический фон города» и соответственно уровень загрязнения окружающей среды. К примеру, Ростов-на-Дону — это «хромово-свинцово-цинковый» город, г. Каменск-Шахтинский — «цинково-свинцово-ванадиево-хромовый» с высоким уровнем загрязнения. Для других городов области характерен слабый или средний уровень загрязнения. По доминантам-загрязнителям г. Шахты — «хромово-свинцово-медный», Зверево, Гуково, Донецк, Новшахтинск — «свинцово-медные» города, Красный Сулин и Морозовск — «медно-свинцово-цинковые» города [16].

Таким образом, в результате проведённого тестирования с помощью серии lux-биосенсоров, можно сказать, что по уровню загрязнения пробы почвы далеко не однородны. Наиболее загрязнённой можно считать почву, отобранную в районе ГРЭС (2-км зона) в г. Новочеркасске, и пробы № 4 и 8, отобранные в г. Ростове-на-Дону в районе ТЭЦ-2 и в центральном районе (пр. Буденновский) соответственно.

Заключение

Вариант биотестирования на основе бактериальных lux-биосенсоров, использованный в данной работе, продемонстрировал возможность оперативно оценивать токсичность почвы как основного компонента экосистем.

С помощью серии бактериальных lux-биосенсоров, позволяющих достичь оптимального сочетания экспрессности, чувствительности и трудоёмкости, был проведён первичный анализ содержания токсинов различной природы в образцах почв урбанизированных территорий Ростовской области.

В ряде проб было зарегистрировано наличие ДНК-тропных соединений, а также веществ, вызывающих состояние окислительного стресса.

Полученные результаты показали, что тесты на основе биолюминесцентных бактерий являются достаточно информативными в отношении загрязнения почв токсикантами различной природы, а также дают возможность идентифицировать тип загрязнителя. Более того, их использование позволяет оптимизировать стратегию экологического мониторинга. В частности, оно даёт возможность прицельно отбирать пробы для проведения химического анализа, и других, более сложных в исполнении биотестов, что особенно ценно при работе в районах чрезвычайных экологических ситуаций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (проект по аналитической ведомственной целевой программе «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2011 годы)», грант № 2.1.1/5028).

Литература

1. Экологический вестник Дона «О состоянии окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области в 2009 году» / Под ред. Назарова С.М., Скрипки Г.И., Паращенко М.В. Ростов н/Д: «Синтез технологий», 2010. 372 с.
2. Heinlaan M., Kahru A., Kasemets K., Kurvet I., Waterlot C., Sepp K., Dubourguier H.C., Douay F. Rapid screening for soil ecotoxicity with a battery of luminescent bacteria tests // Altern. Lab. Anim. 2007. V. 35. № 1. P. 101–110.
3. Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Сазыкин И.С., Лагутова Л.П., Новикова Е.М., Латышев А.В. Использование бактериального lux-биосенсора для детекции загрязнения природных вод ртутью // Вода: Химия и Экология. 2010. № 5. С. 24–29.

4. Цыбульский И.Е., Сазыкина М.А. Новые биосенсоры для мониторинга токсичности среды на основе морских люминесцентных бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 1–6.
5. Alkorta I., Epelde L., Mijangos I., Amezaga I., Garbisu C. Bioluminescent bacterial biosensors for the assessment of metal toxicity and bioavailability in soils // *Rev. Environ. Health*. 2006. V. 21. № 2. P. 139–152.
6. Su L., Jia W., Hou C., Lei Y. Microbial biosensors: a review // *Biosens. Bioelectron*. 2011. V. 26. P. 1788–1799.
7. ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб почвы для химического, бактериологического и гельминтологического анализа.
8. ГОСТ 17.4.3.01–83. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб.
9. Пат. 2179581. Российская Федерация, МПК С12Q1/02, С12Q1/66. Способ определения генотоксичности химических веществ / Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Воинова Н.В.; заявитель и патентообладатель Государственное унитарное предприятие Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства. № 2000118945/13; заявл. 2000.07.17; опубл. 2002.02.20. Бюл. № 5. 5 с.: табл. 2.
10. Ptitsyn L.R., Horneck G., Komova O., Kozubek S., Krasavin E.A., Bonev M., Rettberg P. A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant *Escherichia coli* cells // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. № 11. P. 4377–4384.
11. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
12. Экологический вестник Дона «О состоянии окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области в 2007 году» / Под ред. С.М. Назарова, Г.И. Скрипки, М.В.Паращенко Ростов н/Д: «Синтез технологий», 2008. 372 с.
13. ГН 2.1.7.2041-06. Гигиенические нормативы. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве.
14. ГН 2.1.7.2511-09. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве
15. Лозановская И.Н., Орлов Д.С., Садовникова Л.К. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. М.: Высшая школа, 1998. 287 с.
16. Государственный доклад «О состоянии окружающей природной среды Ростовской области в 1998 году» / Под ред. В.А. Литвинова, В.Н. Агеева, В.М. Парашенко Ростов н/Д.: «АУФ», 1999. 274 с.