



УДК 543.94, 577.151.03

## **Анализ возможности применения биолюминесцентных ферментативных биотестов для оценки загрязнения почв (на примере почв г. Красноярска)**

Е. М. Байгина, Н. В. Римацкая, Л. В. Степанова, В. А. Кратасюк

*Сибирский федеральный университет, Красноярск*

*E-mail: nfsu2betti@mail.ru*

**Аннотация.** Целью исследования явилось обоснование возможности применения биолюминесцентной ферментативной тест-системы NADH:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы для анализа загрязнения почв. Чувствительность биолюминесцентного тестирования проверяли на модельных почвах природного происхождения: песчаная и среднесуглинистая почва дерново-подзолистого типа, тяжелосуглинистый чернозём. Использование биолюминесцентной ферментативной тест-системы для выявления загрязнения почв проведено на водных вытяжках из почв, отобранных в разных районах г. Красноярска и пригородной зоны. Биолюминесцентное свечение биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза использовано в качестве экспрессного анализа для диагностирования загрязнения почвы. Интегральным показателем загрязнения служила величина снижения интенсивности биолюминесцентного свечения, которое обусловлено угнетением ферментативной реакции загрязнителями, содержащимися в почве. Абсорбционные свойства и pH водных вытяжек из почв не влияли на чувствительность биолюминесцентного тестирования. Чувствительность биолюминесцентной ферментативной тест-системы не зависела от гранулометрического состава почвы дерново-подзолистого типа. Содержание гумусового вещества в водной вытяжке из чернозёма снижало чувствительность ферментативной тест-системы. Влияние гумусовых веществ на угнетение ферментативной реакции может быть компенсировано варьированием NADH в составе реакционной смеси. Выявлено сильное загрязнение почв в промышленных районах г. Красноярска. Почвы в озеленённых городских районах определены как незагрязнённые. В перспективе биолюминесцентное ферментативное тестирование возможно использовать в качестве интегрального биотеста для диагностирования загрязнения почвы при условии компенсации интерферирующего влияния содержащихся в образцах гумусовых веществ.

**Ключевые слова:** бактериальная ферментативная система, NADH:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, биолюминесцентный анализ, загрязнение почвы, биотестирование почвы, водная вытяжка из почвы.

### ***Введение***

Почва является важнейшим незаменимым природным ресурсом и подвергается в настоящее время интенсивному загрязнению и деградации, что делает необходимым мониторинг её состояния. Для оценки состояния поч-

вы чаще всего применяют биологические методы, с помощью которых выявляют степень общего загрязнения и общей токсичности на живых организмах. Рассматривают влияние факторов токсичности и загрязнения на разнообразные параметры жизнедеятельности (скорость роста, интенсивность дыхания, смертность) бактерий, простейших, водорослей и других организмов [10].

Наряду с биотестами для оценки качества среды в последнее время широко используют разные ферментативные системы. Преимуществами ферментативных биотестов являются их высокая чувствительность, экспрессность, высокая надёжность и точность анализа по сравнению с тестами, основанными на использовании живых объектов с постоянно меняющимися жизненными характеристиками. Поэтому ферментативная система, основанная на растворимой ферментативной биолюминесцентной реакции бактерий: NADH:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы, широко используется для контроля токсичности природных и сточных вод [4; 5; 8; 11; 12].

В адаптированном виде такая методика имеет перспективы для оценки загрязнения водных вытяжек из почвы при условии определения чувствительности ферментативной системы к конкретному образцу и подбора условий для биотестирования.

Несмотря на вышеперечисленные преимущества ферментативных систем, основанные на них биотесты пока не используются при оценке загрязнения почвенной среды.

Целью настоящей работы является экспериментальное обоснование возможности применения биолюминесцентной ферментативной системы NADH:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы для анализа загрязнения почв.

### *Материалы и методы*

В качестве модельных в работе использованы образцы природных почв разных типов и гранулометрического состава, характерные для Красноярского края (табл. 1). Кроме этого были отобраны 15 проб почв в разных районах Красноярска и пригородной зоне: в промышленных районах города (Ленинский – номера проб 8, 10, 13 на карте-схеме (рис. 1); Советский – 4, 6; Кировский – 7); в удалённых от промышленной зоны районах города (Октябрьский – 8, 10, 13; Центральный – 3, 12, 14; Железнодорожный – 5), а также в пригородном Емельяновском административном районе (11).

*Таблица 1*

Характеристика исследуемых модельных почв природного происхождения

№ модельной пробы	Тип почвы	Характеристика почвы [1]
1	Дерново-подзолистая	Дерново-подзолистая типичная, среднемошная, слабо гумусированная, песчаная на супеси
2		Дерново-подзолистая типичная, среднемошная, слабо гумусированная, среднесуглинистая на супеси
3	Чернозём выщелоченный	Агрочернозём глинисто-иллювиальный, среднемошный, сильно гумусированный, тяжелосуглинистый, на глине

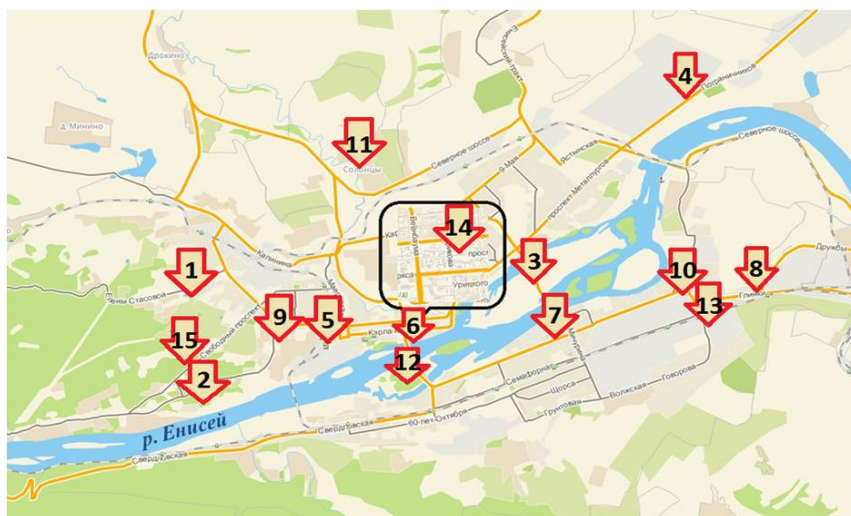


Рис. 1. Карта-схема точек отбора проб почвы на территории г. Красноярска и пригорода. Рамкой выделен участок застройки в центральной части города

Отбор проб почв, их транспортировку и хранение осуществляли в соответствии с нормативными требованиями [3; 6; 7]. Образцы почв высушивали при 105 °С в течение 1 ч до воздушно-сухого состояния. После охлаждения пробу растирали в ступке, просеивали через сито с отверстиями 3 мм и тщательно перемешивали. Навеску почвы массой 5,0 г помещали в коническую колбу, добавляли пятикратный объём дистиллированной воды (рН = 6,9) и взбалтывали в течение 5 мин на орбитальном шейкере (Biosan PSU-20i, Латвия). Затем экстракт фильтровали через бумажный фильтр (белая лента) и центрифугировали в течение 10 мин при 3500 об/мин (центрифуга Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия)).

В качестве биотеста использовали бактериальную ферментативную систему NADH:FMN – оксидоредуктаза и люцифераза. Реакционная смесь включала 0,05М калий-натрий фосфатный буфер (рН = 6,9), комплект реактивов аналитической билюминесценции (КРАБ) (Институт биофизики СО РАН, Красноярск), 0,0025%-ного тетрадеканала (C<sub>14</sub>) (Merck, Германия), 0,4 мМ никотинамидадениндинуклеотида (NADH) (Sigma, США); 0,5 мМ фламинмононуклеотида (FMN) (Serva, Германия).

Все компоненты реакционной смеси совместно с дистиллированной водой (контрольное измерение) или водной вытяжкой из почвы (опытное измерение) последовательно вносили в кювету, перемешивали встряхиванием, помещали в люминометр и регистрировали максимальную интенсивность свечения. Билюминесцентный анализ проб почвы проводили на люминометре GloMax 20/20 (Promega Corporation, США) в течение 300 с в 3-кратной повторности с отклонением значений не более 10 %.

По снижению средней максимальной интенсивности билюминесценции опытных измерений ( $I$ ) к среднему контрольному, дающим максимальное свечение ( $I_k$ ), рассчитывали величину остаточного свечения по формуле:

$$T = \frac{I}{I_k} \cdot 100 \%$$

Значение остаточного свечения ( $T$ , %) использовали в качестве показателя общего загрязнения. При  $T > 80$  % исследуемые почвы считали незагрязнёнными,  $50$  %  $< T < 80$  % – загрязнёнными,  $T < 50$  % – сильно загрязнёнными.

Кислотно-щелочной показатель в водных вытяжках из почв измеряли с помощью pH-метра HI 2211 (HANNA Instruments, Германия).

Влияние оптического (мутность) и абсорбционного (рассеяние) свойства водной вытяжки из почв на величину интенсивности свечения образца корректировали по данным спектрофотометрического измерения, проведённого на двухлучевом сканирующем спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu Corporation, Япония) в диапазоне длин волн 420–630 нм. Коэффициент корректировки рассчитывали согласно формуле (2) [2]:

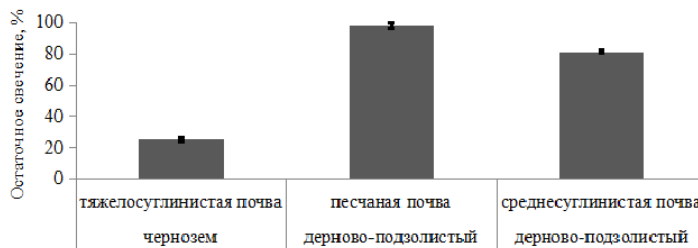
$$I_0 = \frac{I(L)}{\sum_{i=1}^n \frac{g(\lambda_i)}{D_i(\lambda_i) \left(\frac{L}{\rho}\right)} \left[ 1 - \exp\left(-D_i(\lambda_i) \left(\frac{L}{\rho}\right)\right) \right]}, \quad (2)$$

где  $I(L)$  – экспериментально определенная интенсивность биолюминесценции в исследуемом образце толщиной  $L$ ;  $g(\lambda_i)$  – доля интенсивности биолюминесценции на длине волны  $\lambda_i$  от суммарной интенсивности биолюминесценции;  $D_i(\lambda_i)$  – значение поглощения.

Эффект светорассеяния учитывали, если значение абсорбции на длине волны 420 нм ( $A_{420}$ ) превышало 0,100.

### Результаты и обсуждение

Водные вытяжки из модельных почв природного происхождения по-разному ингибировали интенсивность биолюминесцентного свечения бактериальной ферментативной тест-системы (рис. 2).



Водные вытяжки из проб почв

Рис. 2. Ингибирование биолюминесцентного свечения ферментативной тест-системы в водной вытяжке из модельных почв природного происхождения, отличающихся по гранулометрическому составу (в рис. 2–4 указаны планки погрешностей стандартного отклонения)

Водная вытяжка из песчаной почвы дерново-подзолистого типа не ингибировала интенсивность биолюминесцентного свечения ферментативной тест-системы ( $T = 96,1 \pm 1,9 \%$ ), среднесуглинистая же почва дерново-подзолистого типа ингибировала незначительно ( $T = 81,6 \pm 0,3 \%$ ). Сильное ингибирование интенсивности биолюминесцентного свечения ферментативной тест-системы показывала водная вытяжка из тяжелосуглинистого чернозёма ( $23,3 \pm 0,9 \%$ ).

Представленные образцы модельных почв имели природное происхождение и были незагрязнёнными, поэтому изменение величины остаточного свечения ферментативной тест-системы было обусловлено содержанием гумусового вещества в почвах. Известно, что гуминовые вещества увеличивают скорость расходования эндогенного восстановителя реакции NADH, за счёт чего снижается интенсивность биолюминесценции [9]. Согласно вышепредставленным характеристикам модельных почв (см. табл. 1) чернозём был сильно гумусированным, что вызвало ингибирование биолюминесцентного свечения ферментативной тест-системы на 77 %. Для повышения чувствительности ферментативной тест-системы ингибирующее воздействие гумусовых веществ на интенсивность биолюминесцентного свечения нивелируют увеличением количества NADH в реакционной смеси [9].

Степень загрязнённости почв, определённая по результатам биолюминесцентного тестирования водных вытяжек, оказалась различной как между городскими районами г. Красноярска, так и по сравнению с пригородным Емельяновским административным районом (рис. 3). По величине остаточного свечения была выявлена загрязнённость почв в районах г. Красноярска (табл. 2).

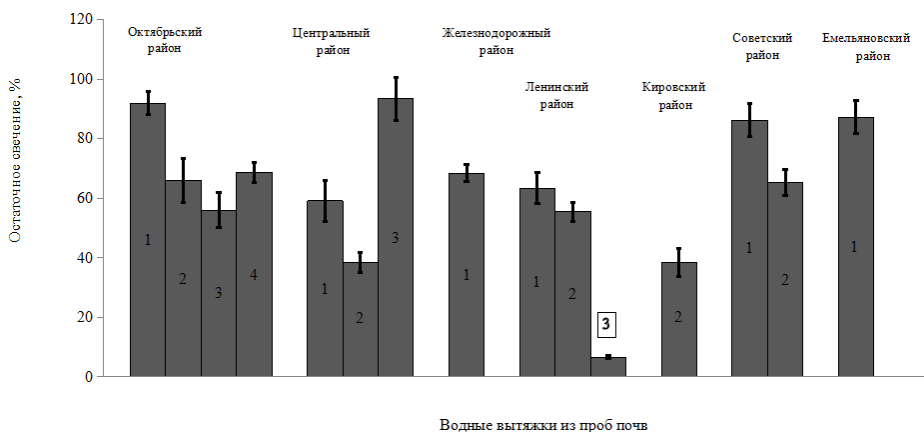


Рис. 3. Ингибирование биолюминесцентного свечения ферментативной тест-системы в водных вытяжках почв, отобранных в разных районах г. Красноярска и пригородного Емельяновского административного района. Номера проб по каждому району соответствуют данным табл. 2

Таблица 2

Сравнительный анализ индивидуальных характеристик и результатов биоломинесцентного анализа водных вытяжек из почв, отобранных из разных районов г. Красноярска и пригорода

Районы		Но- мер про- бы	pH	Значение абсорбции на длине волны 420 нм (A420)	Кoeffи- циент корректи- ровки (I <sub>0</sub> )	Остаточ- ное све- чение, %	Уровень загрязнения
Районы г. Красноярска	Октябрьский	1	7,5	0,01	1,0	91,9±3,9	Не загрязнена
		2	8,0	0,13	1,0	70,6±7,3	Загрязнена
		3	7,9	0,09	1,0	55,9±5,9	Загрязнена
		4	7,2	0,07	1,0	68,5±3,3	Загрязнена
	Центральный	1	8,0	0,11	1,0	60,2±6,9	Загрязнена
		2	7,9	0,44	1,1	40,9±3,3	Сильно за- грязнена
		3	7,9	0,09	1,0	93,3±7,3	Не загрязнена
	Железнодорожный	1	8,0	0,19	1,1	72,3±2,9	Загрязнена
	Ленинский	1	7,9	0,25	1,1	66,2±5,3	Загрязнена
		2	8,0	0,09	1,0	55,4±3,2	Не загрязнена
		3	7,9	0,25	1,1	6,6±0,4	Сильно за- грязнена
	Кировский	1	8,3	0,29	1,1	40,2±4,7	Токсична
	Советский	1	7,8	0,08	1,0	86,2±5,6	Не загрязнена
		2	8,1	0,07	1,0	65,1±4,4	Загрязнена
Емельяновский	1	8,1	0,15	1,0	89,4±5,6	Не загрязнена	

Самый загрязнённый образец почвы по величине остаточного свечения был отобран в Ленинском районе в окрестностях Красноярской ТЭЦ (6,6±0,4 %), самыми «чистыми» образцами оказались пробы почв из Октябрьского района в микрорайоне Ветлужанка (91,9±3,9 %) и из Центрального района вблизи Святопокровского храма (93,3±7,3 %).

Выявлены разные кислотно-щелочные показатели (pH) водных вытяжек из почв (см. табл. 2), что может быть обусловлено их собственными характеристиками или влиянием внешнего загрязнителя. Добавление водных вытяжек из почв в калий-натрий фосфатный буфер показало нейтральность реакционной смеси для анализа активности ферментативной системы NADH:FMN – оксидоредуктаза + люцифераза (табл. 3). Среднее значение pH водных вытяжек из исследованных почв составляло 7,8, что выше необходимого для оптимальной активности биоломинесцентной ферментативной тест-системы (pH = 6,8–7,0). Объём водной вытяжки из почв, добавляемой в реакционную смесь, составлял одну десятую часть от общего объёма. При этом большую часть объёма реакционной смеси составлял калий-натрий фосфатный буфер со средним значением pH = 6,8, поэтому влияние кислотно-щелочного свойства водной вытяжки из почв на фоне калий-фосфатного буфера было незначительным.

Таблица 3

Изменение рН в калий-натриевом фосфатном буфере при смешивании с водными вытяжками из почв, отобранных из разных районов г. Красноярска

Образец	Кислотно-щелочной показатель, рН
Калий-натрий фосфатный буфер	6,8
Водная вытяжка из почвы	7,8
Калий-натрий фосфатный буфер совместно с водной вытяжкой из почвы	7,0

Низкий коэффициент корреляции ( $r = -0,22$ ) между величиной остаточного свечения и значением кислотно-щелочного показателя водных вытяжек из почв (рис. 4) свидетельствовал об отсутствии влияния рН водных вытяжек на чувствительность биолюминесцентной ферментативной тест-системы.

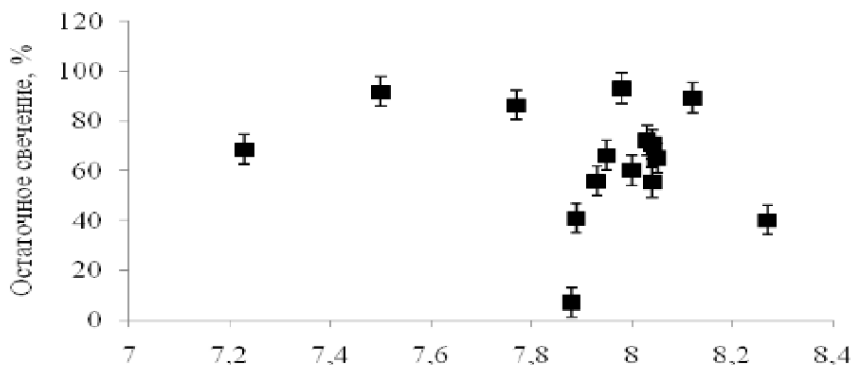


Рис. 4. Зависимость величины остаточного свечения ферментативной тест-системы от кислотно-щелочных свойств водной вытяжки из почв, отобранных из разных районов г. Красноярска и пригорода

Эффект светорассеяния для значения абсорбции при длине волны 420 нм ( $A_{420}$ ), превышающий показатель 0,10, наблюдали на 50 % водных вытяжек из почв, отобранных из разных районов г. Красноярска и пригорода (см. табл. 2). Коэффициент корректировки на мутность для всех водных вытяжек не превышал 6 % при погрешности метода биотестирования до 10 %. С учётом коэффициента корректировки величина интенсивности остаточного свечения незначительно возросла, не изменив показатель загрязнения почв.

Таким образом, влияния абсорбционных и кислотно-щелочных свойств водных вытяжек из почв, отобранных из разных районов г. Красноярска и пригорода, на чувствительность биолюминесцентной ферментативной тест-системы не было выявлено.

### **Выводы**

1. Бактериальная ферментативная тест-система NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза, основанная на биолюминесцентном анализе токсичности природных и сточных вод, применима для анализа загрязнения водных вытяжек из почв.

2. Биолюминесцентный анализ на основе бактериальной ферментативной тест-системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза выявил незначительную степень загрязнённости большинства почв г. Красноярска.

3. На чувствительность биолюминесцентной ферментативной тест-системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза не влияют абсорбционные и кислотно-щелочные свойства водных вытяжек из почв.

4. На чувствительность биолюминесцентной ферментативной тест-системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза не влияют слабо гумусированная песчаная и среднесуглинистая модельная почва природного происхождения дерново-подзолистого типа, сильно гумусированный тяжелосуглинистый чернозём ингибирует интенсивность остаточного свечения.

5. Биотестирование с помощью биолюминесцентной бактериальной ферментативной тест-системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза является перспективным методом для оценки загрязнения почвы при повышении чувствительности с учетом коэффициента корректировки для водных вытяжек из почв с высокими (более 10 %) абсорбционными свойствами и варьирования концентрации NADH в реакционной смеси при анализе почв с высоким содержанием гумусовых веществ.

*Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 16-14-10115).*

*Авторы благодарны В. В. Чуровой за предоставленные почвенные пробы.*

### Список литературы

1. Классификация и диагностика почв России / Л. Л. Шишов [и др.]. – Смоленск : Ойкумена, 2004 – 342 с.

2. Коррекция результатов биолюминесцентного анализа с учетом оптических свойств исследуемых углеродных наноматериалов / Е. С. Алешина [и др.] // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. – 2010. – № 112. – С. 141–146.

3. Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб. Межгосударственный стандарт. ГОСТ 17.4.3.01-83-2008. – Введ. 1984-07-01. – М. : ИПК Изд-во стандартов, 2008. – 4 с.

4. Патент № 2413772 РФ Биолюминесцентный биомодуль для анализа токсичности различных сред и способ его приготовления / В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова; заявитель и патентообладатель Сибирский федеральный университет. № 2009110636; заявл. 23.03.2009.; опубл. 10.03.2011.

5. Патент № 2413771 РФ Экспресс-способ биотестирования природных, сточных вод и водных растворов / В. А. Кратасюк, Е. Н. Есимбекова; заявитель и патентообладатель Сибирский федеральный университет. № 2009113656; заявл. 10.04.2009.; опубл. 10.03.2011.



6. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. Межгосударственный стандарт. ГОСТ 17.4.4.02-84-2008. – Введ. 1986-01-01. – М. : Стандартиформ, 2008. – 8 с.

7. Почвы. Отбор проб. Межгосударственный стандарт. ГОСТ 28168-89-2008. – Введ. 1990-04-01. – М. : Стандартиформ, 2008. – 7 с.

8. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для ферментативных анализов / Е. Н. Есимбекова [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2015. – Т. 461, № 4. – С. 472–475.

9. Тарасова А. С. Использование биолюминесцентных систем для изучения закономерностей детоксикации растворов модельных поллютантов гуминовыми веществами : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / А. С. Тарасова. – Красноярск, 2012. – 22 с.

10. Терехова В. А. Биотестирование почв: подходы и проблемы / В. А. Терехова // Почвоведение. – 2011. – № 2. – С. 190–198.

11. Kratasyuk V. A. Principle of luciferase biotesting / V. A. Kratasyuk // Proc. 1st Int. School "Biological Luminescence", Wroclaw, Poland, June 20–23, 1989. – World Scientific Publishing, 1990 – P. 550–558.

12. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V. A. Kratasyuk [et al.] // Chemosphere. – 2001. – Vol. 42, N 8. – P. 909–915.

## **On the Possibility of Application of Bioluminescent Enzyme System for the Analysis of Soil Contamination of the Krasnoyarsk Territory**

E. M. Baigina, N. V. Rimatskaya, L. V. Stepanova, V. A. Kratasyuk  
*Siberian Federal University, Krasnoyarsk*

**Abstract.** The purpose of this study was to substantiate the possibility of using bioluminescent enzyme test system NADH: FMN oxidoreductase and luciferase for soil contamination analysis. The sensitivity of bioluminescent bioassay was tested on model soils of natural origin: sandy and medium loam soil of sod-podzolic type, heavy loam chernozem. The use of a bioluminescent enzymatic test system to detect soil contamination was carried out on water extracts from soils selected in different districts of Krasnoyarsk and the suburbs. The intensity of luminescence of the enzyme test system NADH: FMN oxidoreductase and luciferase is used as an express analysis for the diagnosis of soil contamination. The integral indicator of pollution was the magnitude of the decrease in the intensity of luminescence, which is due to the inhibition of the enzymatic reaction by pollutants contained in a soil. The absorption properties and pH of water extracts from soils did not effect on the sensitivity of bioluminescent bioassay. The sensitivity of the bioluminescent enzyme test system did not depend on the grain size composition of the sod-podzolic soil. The content of humic matter in the aqueous extract from the chernozem reduced the sensitivity of the enzymatic test system. The effect of humic substances on the inhibition of the enzymatic reaction can be compensated by the variation of NADH in the composition of the reaction mixture. Strong soil contamination was detected in industrial areas of Krasnoyarsk. Soils in the greened urban areas are not contaminated. In the future, bioluminescent enzyme testing can be used as an integral bioassay to diagnose soil contamination when compensating for the interfering effect of humic substances.

**Keywords:** enzyme system, NADH: FMN-oxidoreductase and luciferase, bioluminescence assay, soil contamination, bioassay of soil, water extract of soil.

*Байгина Елизавета Маратовна*  
аспирант  
Сибирский федеральный университет  
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79  
тел.: (391) 206–20–72  
e-mail: nfsu2betti@mail.ru

*Baigina Elizaveta Maratovna*  
Postgraduate  
Siberian Federal University  
79, Svobodny Av., Krasnoyarsk, 660041  
tel.: (391)206–20–72  
e-mail: nfsu2betti@mail.ru

*Римацкая Надежда Валерьевна*  
научный сотрудник  
Сибирский федеральный университет  
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79  
тел.: (391) 269–01–37  
e-mail: shmanko\_nadya@mail.ru

*Rimatskaya Nadezhda Valeryevna*  
Research Scientist  
Siberian Federal University  
79, Svobodny Av., Krasnoyarsk, 660041  
tel.: (391) 269–01–37  
e-mail: shmanko\_nadya@mail.ru

*Степанова Людмила Васильевна*  
кандидат биологических наук, доцент  
Сибирский федеральный университет  
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79  
тел.: (391)206–20–72  
e-mail: slyudmila@mail.ru

*Stepanova Lyudmila Vasilyevna*  
Candidate of Science (Biology),  
Associate Professor  
Siberian Federal University  
79, Svobodny Av., Krasnoyarsk, 660041  
tel.: (391)206–20–72  
e-mail: slyudmila@mail.ru

*Кратасюк Валентина Александровна*  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой  
Сибирский федеральный университет  
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79  
тел.: (391) 206–20–72  
e-mail: Valkrat@mail.ru

*Kratasyuk Valentina Aleksandrovna*  
Doctor of Science (Biology),  
Professor, Head of the Department  
Siberian Federal University  
79, Svobodny Av., Krasnoyarsk, 660041  
tel.: (391)206–20–72  
e-mail: Valkrat@mail.ru