

УДК 543.94, 577.151.03

КОМПЛЕКСНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ БИОТЕСТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ

Е. М. Колосова¹, О. С. Суторин^{1,*}, Е. Н. Есимбекова^{2,1},
В. И. Лоншакова-Мукина¹, В. А. Кратасюк^{1,2}

Представлено академиком РАН И. И. Гительзоном 05.06.2019 г.

Поступило 14.06.2019 г.

Предложена концепция комплексной оценки загрязнения почвы, в которой заключение о наличии токсических веществ в анализируемой пробе делают на основе ингибирования ими ферментативных реакций, отвечающих за проявление разных функций живого организма, таких как свечение, дыхание и др., принятых как тестовые функции в классическом биотестировании с использованием живых объектов (светящиеся бактерии, дафнии, водоросли и др.). Установлены закономерности воздействия разных классов токсикантов на активность отдельных ферментов или олигоферментных цепей сопряжения, выбранных в качестве потенциальных тест-объектов — маркёров загрязнения. Для комплексной ферментативной тест-системы выбраны три ферментные системы, обладающие максимальной чувствительностью к разным классам токсикантов (бутирилхолинэстераза, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза и лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза). Показана возможность использования ферментативных тестов вместо живых организмов при биотестировании сложных природных сред.

Ключевые слова: биолюминесцентный анализ, почва, оценка токсичности, ферментативные биотесты токсичности, экологический мониторинг, бутирилхолинэстераза, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза, люцифераза, лактатдегидрогеназа.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524891103-107>

В условиях возрастающего антропогенного воздействия на окружающую среду усложнилась задача аналитического контроля экологической безопасности воды, почвы, атмосферного воздуха, растительного покрова и других объектов окружающей среды. Для принятия оперативных мер по устранению загрязнений и минимизации последствий загрязнений необходимо своевременное их выявление. При загрязнении почвенных агроценозов, например, несколькими химическими веществами часто неизвестной природы применение традиционных химических или физических методов анализа становится малоинформативным с точки зрения безопасности для живых организмов. В этом случае оправдано использование биотестов, сигнализирующих интегрально об опасности загрязнения анализируемых образцов. Однако точность современных биологических тестов, основанных на изменении функций живых организмов под влиянием токсических воздействий среды, невысока, что делает их

ненадёжными для экспрессной оценки загрязнения окружающей среды. Причина этого в изменчивости функций живых организмов в зависимости от используемых живых тест-объектов и условий их получения и хранения [1]. В связи с этим активно разрабатываются и используются для экологического мониторинга ферментативные тесты [2], главным преимуществом которых перед классическими биотестами с использованием организмов является повышение точности и чувствительности [2, 3]. Однако ферментативные биотесты используются поодиночке, и поэтому возникает вопрос о корректности такого анализа. По-видимому, правильнее было бы создать набор ферментативных биотестов, в которых заключение о наличии токсических веществ в анализируемой пробе делают на основе ингибирования ими ферментативных реакций, отвечающих за проявление разных функций живого организма, таких как свечение, дыхание и др., принятых как тестовые функции в классическом биотестировании с использованием живых объектов (светящиеся бактерии, дафнии, водоросли и др.) [2]. Важно понять, обеспечит ли переход с живого организма на набор ферментативных биотестов решение проблемы анализа сложных сред.

¹Сибирский федеральный университет,
Красноярск

²Институт биофизики Сибирского отделения
Российской Академии наук, Красноярск

*E-mail: OSutormin@sfu-kras.ru

Цель исследования состояла в подборе репрезентативного набора ферментных тест-систем для оценки загрязнения сред сложного состава на примере почвы для развития концепции ферментативного биотестирования.

В работе установлены закономерности влияния модельных образцов почв, загрязнённых токсическими веществами, на ферментативные системы *in vitro*, потенциально пригодные для включения в состав комплексного ферментативного теста. В качестве токсических веществ были выбраны представители различных классов загрязнителей: пестициды малатион, диазинон и γ -гексахлорциклогексан (γ -ГХЦГ), наночастицы диоксида титана TiO_2 , а также хлорид меди (II). В работе проводили оценку ингибирующего эффекта токсикантов на функционирование следующих ферментативных систем *in vitro*: моноферментные реакции, катализируемые алкогольдегидрогеназой (АДГ), НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой (Ред), трипсином (Тр), бутирилхолинэстеразой (БуХЭ), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой (Г6ФД); биферментную систему НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза (Ред+Люц); триферментные системы: лактатдегидрогеназа + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (ЛДГ + Ред + Люц); НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ + Ред + Люц); НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + алкогольдегидрогеназа (АДГ + Ред + Люц).

В работе использовали следующие реактивы: НАД⁺ (“AppliChem”, Германия), спирт этиловый (“Медхимпром”, Россия), ФМН (“Serva”, Германия), НАДН (“Gerbu”, Германия), HCl (ГОСТ 14261-77, Россия), α -N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир (БАЭЭ), бутирилхолин йодид, 5,5'-дитио-бис (2-нитробензойная кислота), β -НАДФ, L-(+)-лактат (“Sigma-Aldrich”, Германия), MgCl_2 (“ЛенРеактив”, Россия), тетрадеканаль (“Merck”, Германия). В качестве токсикантов использовали следующие коммерческие препараты: малатион (“Алсико-Агропром”, Россия), диазинон (“МедЛис”, Россия),

γ -гексахлорциклогексан (γ -ГХЦГ) (ГСО 7308–96, Россия), хлорид меди (II) (НПФ “Невский химик”, Россия), наночастицы диоксида титана (“Альбион”, Россия).

Активность АДГ, БуХЭ, Г6ФД, НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы и трипсина оценивали по скорости изменения оптической плотности растворов спектрофотометрическими методами. Активность би- и триферментных систем определяли по величине максимальной интенсивности свечения. Действие токсиканта на активность АДГ, БуХЭ, Г6ФД, Ред и трипсина определяли по величине остаточной активности (ОА) ферментов в присутствии токсиканта. Значения ОА рассчитывали как отношение скорости ферментативного гидролиза субстрата в анализируемой пробе к скорости ферментативного гидролиза субстрата в контрольном растворе. Для оценки влияния токсиканта на активность би- и триферментных систем рассчитывали остаточную интенсивность свечения би- и триферментных систем в присутствии токсикантов [4]. В качестве контрольного раствора использовали дистиллированную воду. Количественную оценку степени влияния загрязняющих веществ на активность ферментных систем выражали в виде величин IC_{20} и IC_{50} , представляющих собой концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности ферментативной системы на 20 и 50% соответственно.

Каждая экспериментальная точка — результат не менее трёх последовательных измерений. При статистической обработке полученных результатов использовали критерий *t* Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. Обработку расчётов проводили в пакете прикладных программ Excel (“Microsoft”, США).

Первоначально была определена чувствительность ферментативных систем *in vitro* к растворам токсикантов в дистиллированной воде. Показаны различия ферментативных систем по чувствительности к действию токсических веществ (табл. 1).

По параметру IC_{20} наибольшей чувствительностью к малатиону обладает моноферментная БуХЭ-сис-

Таблица 1. Значения параметров IC_{20} и IC_{50} (мг/л) для модельных токсикантов по сравнению с максимально допустимыми уровнями их содержания в воде

Модельный токсикант	ПДК, мг/л	БуХЭ		Ред + Люц		ЛДГ + Ред + Люц	
		IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}	IC_{20}	IC_{50}
Малатион	0,05	0,001*	0,04	7,8	39	0,4	0,6
Диазинон	0,004	0,14	3	0,27	0,59	0,07	0,1
γ -ГХЦГ	0,002	25	11	—	—	—	—
TiO_2	0,1	17	0,35	—	—	—	—
Хлорид меди (II)	1	—	—	0,012*	0,024*	0,0008*	0,003*

тема, к диазину — триферментная система ЛДГ + Ред + Люц. Пестицид γ -ГХЦГ и наночастицы TiO_2 в максимально возможных для изучения концентрациях ингибировали активность только БУХЭ.

Исследование действия водных растворов хлорида меди (II) на ферментативные системы *in vitro* выявило ограничения используемых оптических методов оценки активности ферментов. В частности, использованный в работе метод анализа активности БУХЭ является непригодным для установления токсического эффекта хлорида меди (II) на данный фермент, так как ионы тяжёлых металлов изменяют структуру красящего комплекса, вследствие чего создаётся ложное представление об ингибировании активности БУХЭ [5]. Следует отметить, что ферментативные системы *in vitro* различались по чувствительности к хлориду меди. Увеличение чувствительности к водным растворам хлорида меди (II) наблюдалось в последовательности АДГ < Ред < < (Ред + Люц) < (ЛДГ + Ред + Люц).

Вследствие ограничений используемых аналитических методов не удалось установить достоверных закономерностей влияния пестицидов малатиона и диазинона на функционирование моноферментных реакций (АДГ, Тр, Ред и Г6ФД). Данное ограничение связано с ложными эффектами стимулирующего действия пестицидов на активность ферментов из-за высоких значений оптической плотности растворов малатиона и диазинона на используемой в анализе длине волны регистрации сигнала.

Таким образом, выявлено, что наибольшей чувствительностью к анализируемым токсическим веществам обладают следующие ферментативные системы: моноферментная реакция, катализируемая БУХЭ; биферментная система Ред + Люц и триферментная система ЛДГ + Ред + Люц (табл. 1).

В дальнейшем проведена оценка чувствительности ферментативных систем к воздействию токсических веществ при их внесении непосредственно в экстракты из почв. Поведение токсикантов в почве значительно зависит от её типа и свойств [6–8], поэтому для проведения экспериментов были выбраны пять стандартных почвенных образцов (незагрязнённых модельных почв: песчаная, лёгкий суглинок, средний суглинок, тяжёлый суглинок и чернозём). Для исключения влияния компонентов незагрязнённой почвы на результаты тестирования в качестве контроля использовали водный экстракт из почвы без добавления токсических веществ.

При исследовании почвенных экстрактов, загрязнённых токсикантами, установлено, что для большинства ферментных систем характерно неко-

торое снижение чувствительности к воздействию токсикантов, что обусловлено взаимодействием токсических веществ с компонентами почвенных экстрактов. Так, например, чувствительность БУХЭ к малатиону в растворах почв существенно снижается: параметры IC_{20} и IC_{50} в дистиллированной воде составили 0,001 и 0,04 мкг/л соответственно, а в растворе чернозёма повысились до 7 и 50 мкг/л соответственно (рис. 1).

Похожий результат получен при изучении влияния на активность БУХЭ наночастиц диоксида титана 100–190 нм (рис. 2).

В то же время для диазинона чувствительность БУХЭ к пестициду в дистиллированной воде

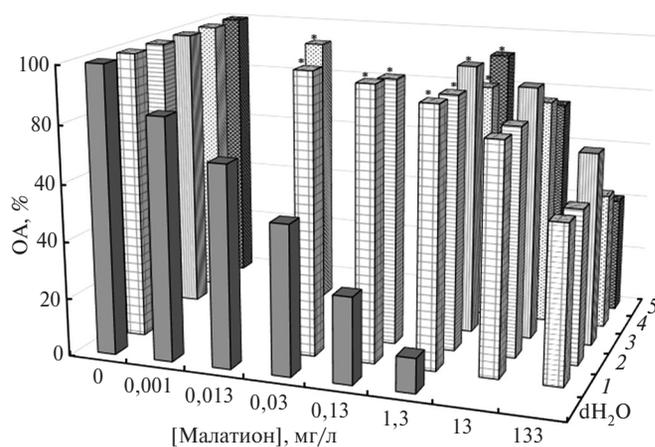


Рис. 1. Остаточная активность (ОА) БУХЭ в присутствии различных концентраций малатиона в дистиллированной воде dH_2O и почвенных экстрактах. Здесь и на рис. 2, 3: 1 — песок, 2 — лёгкий суглинок; 3 — средний суглинок; 4 — тяжёлый суглинок; 5 — чернозём, * $p > 0,05$ по сравнению с остаточной активностью БУХЭ в дистиллированной воде.

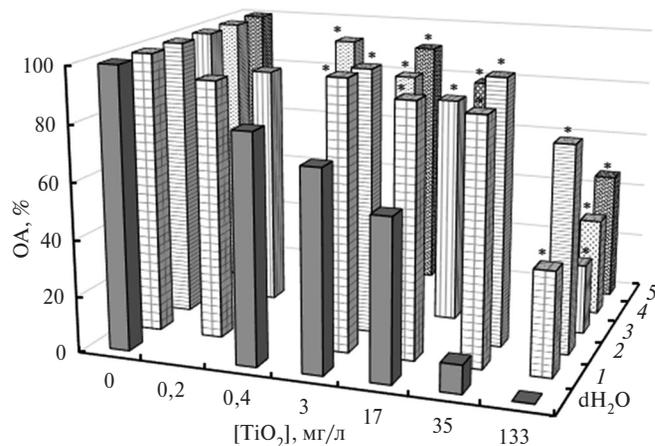


Рис. 2. Остаточная активность (ОА) БУХЭ в присутствии различных концентраций наночастиц диоксида титана в дистиллированной воде dH_2O и почвенных экстрактах.

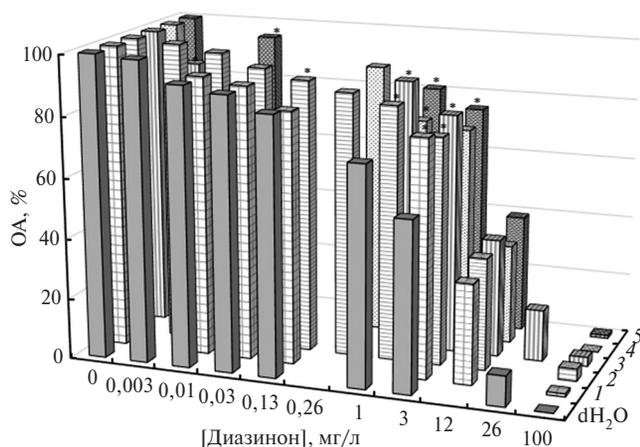


Рис. 3. Остаточная активность (ОА) БухЭ в присутствии различных концентраций диазинона в дистиллированной воде (dH₂O) и почвенных экстрактах.

и экстрактах почв различается незначительно (пробы № 2, 3, 5), рис. 3.

На основе проведённых экспериментальных исследований по анализу чувствительности ферментативных систем к разным классам токсических веществ показано, что первоначально предлагаемое количество ферментативных методов для включения в комплексную тест-систему является избыточным, поскольку некоторые ферментативные реакции не чувствительны к воздействию модельных токсикантов. Для включения в комплексный ферментативный биотест отобраны следующие ферментативные системы: моноферментная, катализируемая бутирилхолинэстеразой, биферментная система Ред+Люц и триферментная система ЛДГ+Ред+Люц. Важно, что выбранные три ферментативные системы проявляют избирательную реакцию к определённым классам токсикантов и разным типам почв, что обеспечивает всесторонний ответ при оценке загрязнения сред сложного состава.

Таким образом, доказана способность ферментативных тестов заменить живые организмы при биотестировании сложных природных сред.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Лаборатории билюминесцентных биотехнологий Сибирского федерального университета за предоставленные данные по влиянию модельных токсикантов на моноферментные системы.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научных проектов № 18–44–242003 и № 18–47–240005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Terekhova V., Gladkova M.* // Eurasian Soil Sci. 2013. V. 46. P. 1203–1210.
2. *Есимбекова Е.Н.* Билюминесцентные биотесты: современное состояние и перспективы: монография / Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А., Немцева Е.В., Кудряшева Н.С., Медведева С.Е., Кириллова М.А. Красноярск: Сиб. фед. ун-т, 2018. 256 с.
3. *Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O.* Application of Enzyme Bioluminescence in Ecology // Biochem. Eng. Biotechnol. 2014. V. 144. P. 67–109.
4. *Сутормин О.С., Колосова Е.М., Немцева Е.В. и др.* // Цитология. 2018. Т. 60. № 10. С. 826–829.
5. *Nunes B.* // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2011. V. 212. P. 29–55.
6. *Семенов А.М., Соколов М.С.* // Агрохимия. 2016. № 1. С. 3–16.
7. *Van Gestel C.A.M.* // Zookeys. 2012. V. 176. P. 275–296.
8. *Bierkens J., Klein G., Corbisier P., et al.* // Chemosphere. 1998. V. 37. № 14/15. P. 2935–2947.

SET OF ENZYMATIC BIOASSAYS FOR ASSESSMENT OF SOIL POLLUTION

**E. M. Kolosova¹, O. S. Sutormin¹, E. N. Esimbekova^{2,1},
V. I. Lonshakova-Mukina¹, V. A. Kratasyuk^{1,2}**

¹*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

²*Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS I.I. Getelzon June 5, 2019

Received June 14, 2019

A concept of the comprehensive assessment of soil contamination is proposed. In this concept, the conclusion regarding the presence of toxic substances in a sample, which is being analyzed, is connected with the inhibition of enzymatic reactions that are responsible for various functions of a live organism, such as luminescence, respiration, etc., these functions are taken as test functions in classical bioassays, which are using live objects (luminous bacteria, daphnia, algae, etc.). The regularities of the impact of different classes of toxicants on the activity of individual enzymes or coupled oligo-enzyme chains have been established. These enzyme reactions are selected as potential test objects — markers of pollution. The set of enzymatic bioassays consists of three enzyme systems with maximum sensitivity to different classes of toxicants: butyrylcholinesterase, NAD(P)H:FMN-oxidoreductase + luciferase and lactate dehydrogenase + NAD(P)H:FMN-oxidoreductase + luciferase. The possibility of using enzymes instead of living organisms in the bioassay of natural complex systems is shown.

Keywords: bioluminescent analysis, the soil, toxicity assessment, enzymatic bioassays for toxicity, environmental monitoring, butyrylcholinesterase, NAD(P)H:FMN-oxidoreductase, luciferase, lactate dehydrogenase.