

УДК 628.16

И. Н. Юркова, В. Р. Эстрела-Льопис

КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ АЛЬГОТЕСТ КАЧЕСТВА ВОДНОЙ СРЕДЫ

В связи с возрастающим загрязнением водных сред токсичными веществами (тяжелые металлы, пестициды, ПАВ и др.) в последние годы все большее внимание уделяется методам биоиндикации и биотестирования качества природных и сточных вод.

Хотя все известные биологические методы тестирования водных сред уступают химическим и физико-химическим методам в селективности и чувствительности, они менее сложны и трудоемки, а, главное, учитывают биологический эффект загрязнения (физиологически активные формы токсичных веществ). Поэтому объективная оценка качества воды лишь на основании результатов химических и физико-химических методов анализа часто бывает затруднена. Это приводит к неправильной оценке экологической опасности содержания токсичных веществ в воде [1]. Разработка и применение биологических методов анализа качества воды, основанных на определении физиологических форм токсичных веществ, является необходимым дополнением для получения более полной и объективной санитарно-гигиенической оценки качества воды, а в ряде стран (США, Англия, Япония и др.) биотестирование служит составной частью обязательных методов мониторинга водной среды, причем его признают основным показателем токсичности [2].

Применяемые для оценки физиологических процессов кондуктометрические измерения суспензий живых клеток связаны с определенными трудностями, с одной стороны, осмотической реакцией клеток и, с другой, влиянием прижизненных клеточных выделений. Это приводит к изменению электропроводности дисперсионной среды и суспензии клеток во времени [3].

Ранее [4] нами была исследована возможность оценки интегрального показателя интенсивности обменных процессов клетки на основании определения электропроводности дисперсионной среды после удаления из нее клеток. Изменения электропроводности зависели от физиолого-биохимической активности и возраста культуры. Наибольшее изменение соответствовало концу экспоненциальной фазы роста, когда наблюдалось максимальное выделение внеклеточных ионогенных метаболитов.

Цель настоящих исследований заключалась в разработке биотеста токсичности водных сред, основанного на кондуктометрических измерениях дисперсионной среды после контакта с клеточной биомассой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тест-объекта для определения токсичности водной среды использовали зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3. Альгологически чистую культуру выращивали в люминостате при круглосуточном освещении

лампами ЛД-20 в накопительном режиме при 36-38 °С на питательной среде Тамийя [5] в течение 6 суток (конец экспоненциальной фазы роста).

Выбор объекта был связан с тем, что для мониторинга водоемов в большой степени важен контроль физиологического состояния микроводорослей, являющихся первичным звеном трофических цепей, создающих материальную основу для дальнейшего превращения веществ и энергии в водных экосистемах. Кроме того, указанный штамм является промышленным и имеет высокую скорость роста, легко культивируется и не зависит от сезонных колебаний.

В качестве токсикантов использовали растворы солей тяжелых металлов: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, AgNO_3 в концентрации от 0,05 мг/л до 5 мг/л (по металлу).

Для проведения кондуктометрического теста суспензию (от 0,4 до 2,0 г а.с.в./дм³) отделяли от культуральной среды, а затем ресуспендировали в дисперсионной среде заданного состава, электропроводность K_0 которой предварительно фиксировали. Из общего объема суспензии отбирали пробы через определенные промежутки времени и определяли в фильтрате электропроводность K_1 . Относительное $\Delta K/K_0$, где $\Delta K = K_1 - K_0$, изменение электропроводности среды после ее контакта с клетками определяет величину кондуктометрического теста. Электропроводность растворов определяли с помощью моста переменного тока Р-577 и ячейки со строго фиксированными расстояниями между электродами и фиксированным положением электродов в ячейке [6].

Эксперимент проводился по 2-м этапам:

1. Исследование влияния различных концентраций токсикантов на изменение электропроводности дисперсионной среды (растворов токсикантов в дистиллированной воде) после контакта с биомассой.

2. Для исследования реальных водных сред (природные и сточные воды), удельная электропроводность которых составляет 10^{-4} - 10^{-2} Ом⁻¹/см⁻¹, растворы токсикантов получали на фоне 10^{-3} М КСl. Биомассу микроводорослей предварительно экспонировали в модельных растворах токсикантов, а затем ресуспендировали в дисперсионной среде заданного состава электролита, после чего ее отделяли и в дисперсионной среде определяли электропроводность K_1 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения оптимальных условий биотестирования было исследовано влияние концентрации биомассы и времени экспозиции на изменение электропроводности дистиллированной воды в качестве дисперсионной среды. Перепад концентрации электролита при введении клеток хлореллы из концентрированной питательной среды в дистиллированную воду приводит к осмотическому шоку, резко усиливающему выделение клеткой в среду метаболитов. Как видно из данных, представленных на рис.1, изменение удельной электропроводности пропорционально концентрации биомассы (углы наклона начальных участков кривых). Первый, более крутой участок кривых связан с осмотическими явлениями. Второй, пологий, соответствует стационарному состоянию. С ростом концентрации клеток наклон этого участка кривых

уменьшается, что свидетельствует о взаимном влиянии (угнетении) клеток. Пороговая концентрация клеток, выше которой заметно проявляется их взаимное угнетение, составляет 1 г а.с.в./дм³ (рис. 1, кривая 2).

При экспозиции биомассы клеток хлореллы в растворах, содержащих токсичные ионы тяжелых металлов, увеличение удельной электропроводности дисперсионной среды (исходные растворы металлов) по сравнению с контролем (дистиллированная вода) наблюдалось уже после 5 минут контакта, а к 30 минутам достигало 40-150 % (рис. 2). При этом максимальный прирост электропроводности наблюдался в растворах серебра (кривая 4) и далее следовал в ряду: медь > хром > кадмий.

Наибольший эффект соответствовал концентрации меди, хрома и кадмия 0,05-1,0 мг/дм³, когда электропроводность исходных растворов металлов мала по сравнению с дистиллированной водой. Для серебра этот интервал увеличивается вплоть до максимальной концентрации 5 мг/дм³, что в значительной мере связано с более низкой электропроводностью растворов однозарядного иона серебра по сравнению с остальными двузарядными ионами, а также высоким олигодинамическим действием серебра.

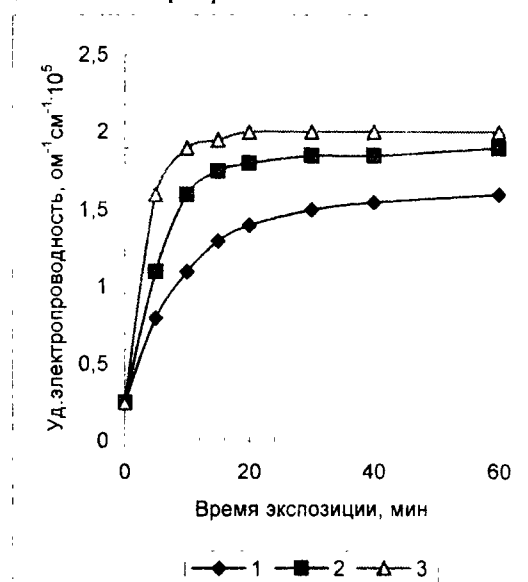


Рис. 1. Влияние времени экспозиции биомассы *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3 на удельную электропроводность дисперсионной среды (дистиллированная вода):
 1 - концентрация биомассы 0,4 г а.с.в./дм³; 2 - 1,0 г а.с.в./дм³; 3 - 2,0 г а.с.в./дм³.
 Исходная удельная электропроводность $0,25 \cdot 10^{-5} \text{ Ом}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Однако эти же экспериментальные данные, представленные в виде относительного изменения электропроводности $\Delta K/K_0$ (рис. 3), показывают, что вначале наблюдается увеличение эффекта в интервале концентраций меди, хрома и кадмия 0,05-0,2 мг/дм³, а серебра - до 1,0 мг/дм³, а затем - понижение, что связано с возрастанием электропроводности исходных растворов металлов от их

концентрации, т.е. уменьшением градиента концентрации между внутренним содержимым клетки и внешней средой. Поэтому исследование токсичного воздействия на клетку веществ, вносящих значительный вклад в электропроводность, более корректно проводить на дисперсионных средах с одинаковой исходной электропроводностью.

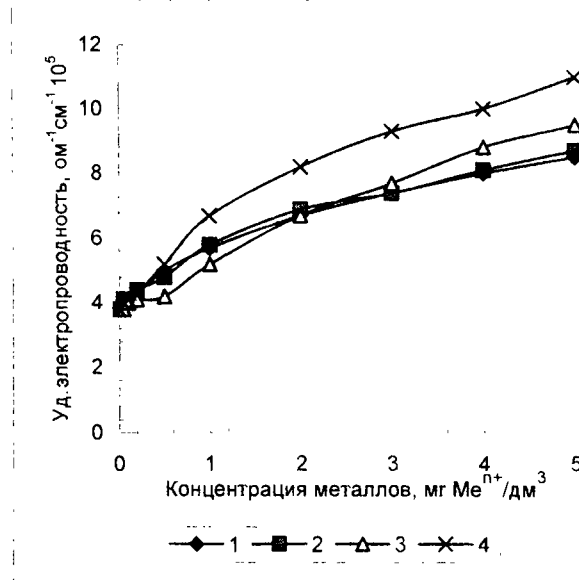


Рис. 2. Влияние концентрации ионов тяжелых металлов на удельную электропроводность дисперсионной среды (исходные растворы металлов) после контакта с биомассой *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3: 1 – кадмий; 2 – хром; 3 – медь; 4 – серебро. Время экспозиции 30 минут.

Этот вывод подтверждается результатами, полученными на средах, моделирующих реальные природные и сточные воды (этап 2), фоновым электролитом в которых служил раствор 10^{-3} М КСl. Как видно из данных, представленных на рис. 4, после 30-минутного контакта дисперсионной среды (дистиллированная вода) с биомассой, предварительно экспонированной в течение 30 минут в растворах солей исследуемых металлов, $\Delta K/K_0$ увеличивается до 117%.

Известно [7], что ионы тяжелых металлов вызывают нарушения барьерных функций цитоплазматической мембраны, что приводит к нарушениям концентрационных градиентов и выходу электролитов из клетки. Изменения проницаемости мембраны связывают с конформационными изменениями фосфолипидных глобул мембран, механизм которых пока не установлен [8]. Полученные нами результаты изменения электропроводности дисперсионной среды после контакта клеток с ионами тяжелых металлов, с одной стороны, подтверждают нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны, а, с другой, могут свидетельствовать о защитных механизмах микроорганизмов к токсичным веществам, связанных с усилением выделения экзогенных полисахаридов, образующих с ионами тяжелых металлов комплексы, менее токсичные, чем свободные ионы [9].

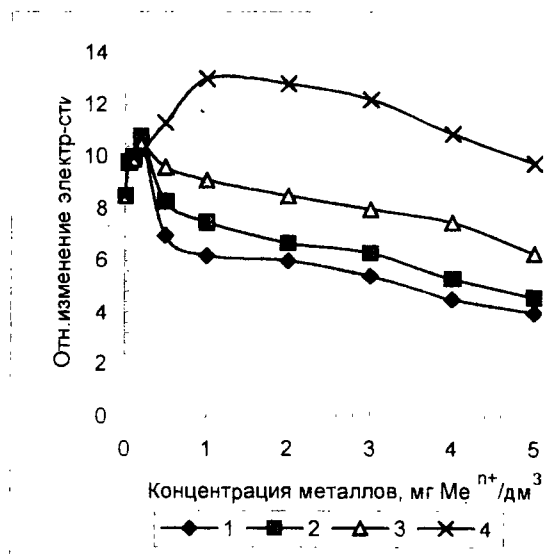


Рис. 3. Влияние концентрации ионов тяжелых металлов на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды $\Delta K/K_0$ (исходные растворы металлов) после контакта с биомассой *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3: 1 – кадмий; 2 – хром; 3 – медь; 4 – серебро. Время экспозиции 30 минут.

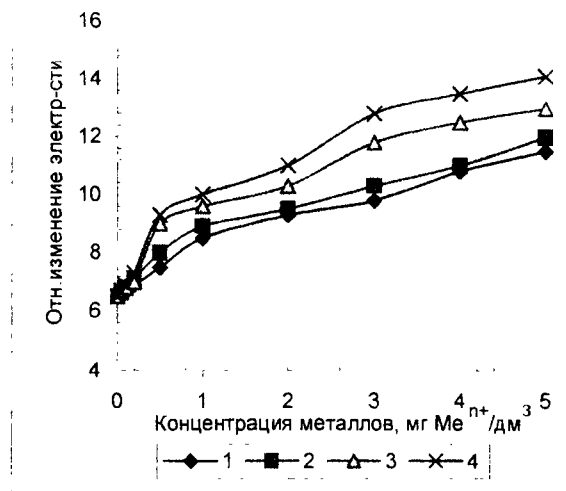


Рис. 4. Влияние концентрации ионов тяжелых металлов на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды $\Delta K/K_0$ (дистиллированная вода) после 30-минутной экспозиции биомассы *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3. Время предварительной экспозиции биомассы в растворах металлов 30 минут. 1 – кадмий; 2 – хром; 3 – медь; 4 – серебро.

Как нами было показано ранее [4] на примере микроводорослей и микроорганизмов других таксономических групп (бактериях и дрожжах), в

присутствии коллоидных и ионных металлов (меди, кадмия, серебра, золота, платины) увеличивается выделение экзогенных полисахаридов, которые являются ионогенными полиэлектролитами и вносят значительный вклад в электропроводность общих внеклеточных метаболитов. Кроме того, комплексы некоторых ионов металлов (например, золота и меди) обладают меньшей сорбционной активностью по сравнению со свободными ионами [10].

Изменение проницаемости цитоплазматической мембраны клеток под влияние неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе тяжелых металлов, является первичным звеном неспецифической ответной реакции организма на внешнее воздействие. Наблюдаемые при этом изменения электропроводности дисперсионной среды характеризуют происходящие интегральные изменения в клетке и предшествуют появлению видимых симптомов поражения клеток, когда изменения в клетке не носят еще необратимый характер.

Таким образом, предложенный кондуктометрический биотест позволяет легко контролировать не только влияние тяжелых металлов, но и других токсичных веществ, содержащихся в водных средах, на физиолого-биохимическую активность микроводорослей и может быть использован для ранней диагностики токсиканта. В качестве тест-объектов возможно применение микроорганизмов других таксономических групп, например, морских микроводорослей в биомониторинге качества морских вод, загрязненных тяжелыми металлами.

Список литературы

1. Методы биоиндикации и биотестирования природных вод. – Л.: Гидрометиздат, 1987. – С. 19.
2. Методы биологических исследований по водной токсикологии. – М., 1971. – 217с.
3. Андреев В.С. Кондуктометрические методы и приборы в биологии и медицине. – М.: Медицина, 1973. – 335с.
4. Эстрела-Льопис В.Р., Овчаренко Ф.Д., Юркова И.Н. Диффузионный слой внеклеточных метаболитов, сверхдальнодействие и избирательная гетерокоагуляция минеральных частиц и микроорганизмов // Физ.-хим. механика и лиофильность дисп. систем. – 1991. В. 22. – С. 1-11
5. Владимирова М.Г., Семенов В.Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. – М.: МГУ, 1962. – 45с.
6. Лопатин Б.А. Кондуктометрия. – Новосибирск: Изд-во СО АН СССР, 1964. – 112с.
7. Ивалов А.Ю., Фомченков В.М., Хасанова Л.А. Токсическое действие гидроксированных ионов тяжелых металлов на цитоплазматическую мембрану бактериальных клеток // Микробиология. – 1997. – Т. 66. – № 5. – С. 89-91.
8. Приходько Н.В. Изменение проницаемости клеточных мембран как общее звено механизмов неспецифической реакции растения на внешнее воздействие // Физиол. и биохимия культур. раст. – 1977. – Т. 9. – № 3. – С. 301-309.
9. Таширев А.Б. Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиол. журн. – 1995. – Т. 57. – № 2. – С. 95-101.
10. Эстрела-Льопис В.Р. Внеклеточные биополимеры *Chlorella vulgaris* Beijer. ЛАРГ-3 (Chlorophyta) в биокolloидных и биосорбционных процессах извлечения металлов из водных суспензий и растворов // Альгология. – 1999. – Т. 9. – № 2. – С. 166.

Поступила в редакцию 20.10.2002 г.