

УДК 621.391+317.532.783+535

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ “ЭКОЛЮМ” ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА ТОКСИЧНОСТЬ БЫТОВЫХ СТОКОВ

А.П. Зарубина, М.Г. Гапочка*, Л.А. Новоселова, Л.Д. Гапочка

(кафедра микробиологии, кафедра гидробиологии; e-mail: al-zar1@ayndex.ru)

Облучение сточной воды электромагнитным излучением низкой интенсивности ($\nu = 42,25$ ГГц) влияет на интегральную токсичность воды разной степени очистки, выявленную экспресс-методом на основе бактериальной люминесценции тест-системы “Эколюм-08”. Показано, что чем меньше степень очистки воды, тем больше токсическое действие ЭМИ. Это позволяет предложить бактериальный люминесцентный биосенсор тест-системы “Эколюм” для первичной оценки действия ЭМИ.

Ключевые слова: бактериальный люминесцентный тест, электромагнитное излучение (ЭМИ), токсичность, сточная вода разной степени очистки.

Основной задачей охраны окружающей среды является обеспечение объективного контроля изменения состояния водоемов, почв и атмосферы. Создание в XX в. мощных источников электромагнитного излучения (ЭМИ) для радиосвязи, локации, применения в промышленности, медицине, быту обусловило появление нового и мощного биосферного фактора — ЭМИ искусственного происхождения, оказывающего воздействие на живые организмы и среду их обитания. Данные литературы о биологической активности ЭМИ некоторых диапазонов не могут быть объяснены только тепловыми механизмами ввиду небольшой энергии электромагнитного поля [1]. В связи с этим актуальна разработка технологии на основе использования биотестов для оценки биологических эффектов ЭМИ.

В современной токсикологии при биотестировании активно используют новый класс аналитических систем — биологические сенсоры, чувствительным элементом которых являются клетки бактерий, обладающие способностью к биолюминесценции. Воздействия различной природы на бактериальные светящиеся клетки и опосредованно на их метаболизм приводят к изменению интенсивности их свечения [2–6]. В лаборатории биологически активных веществ кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова разработана бактериальная люминесцентная тест-система “Эколюм” [7]. Удобная и экономически выгодная тест-система на основе бактериальной люминесценции широко используется для первичной экспресс-оценки токсичности самых различных химических веществ и их смесей, а также физических воздействий [7–9]. Значение EC_{50} (EC_{50} — эффективная концентрация или объем,

вызывающие тушение биолюминесценции на 50%) коррелирует с LD_{50} эукариотных организмов [10]. Коэффициент корреляции для многих ксенобиотиков составляет от 0,8 до 0,95 [11]. Если ксенобиотики имеют цитотоксическое действие, то при их действии на люминесцентные бактерии тушение бактериального свечения обязательно связано не только с их токсическим действием, но и с гибелью клеток бактерий [12, 13]. Этот тест позволяет не только быстро и экономно определить токсичность, но и выяснить во время анализа другие важные свойства исследуемых препаратов: стабильность, токсичность продуктов деградации и способность к биоаккумуляции [14].

Самым первым и до настоящего времени актуальным является использование биолюминесцентной системы бактерий в мониторинге токсичности водных образцов [15]. Применение бактериального люминесцентного биосенсора особенно широко в анализе сбросов промышленных предприятий и контроле чистоты воды, для оценки качества воды рек, искусственных и естественных водоемов, атмосферных осадков, грунтовых вод, питьевой воды, стоков промышленных предприятий и очистных сооружений и т.п. [15–18]. Биолюминесцентный тест используют для оценки качества воды после всех видов фильтрации, а также воды, полученной в процессе регенерации на специальных установках, например при длительных космических полетах, и др. [19, 20].

В настоящей работе проведена оценка биологического действия электромагнитного поля низкой интенсивности на токсичность сточной воды разной степени очистки экспресс-методом на основе бактериальной люминесценции тест-системы “Эколюм”.

* Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова.

Объекты и методы исследования

Используемый биосенсор. В анализах использовали тест-систему “Эколюм-8” на основе генно-инженерных бактерий *Escherichia coli K12 TG1* с клонированным в них *lux*-опероном почвенных светящихся бактерий *Photorhabdus luminescens ZM1* [6].

Подготовка биосенсора “Эколюм-8” к использованию в качестве биотеста. Перед проведением анализа биотест приводили в рабочее состояние, т.е. регидратировали лиофильно высушенные бактерии разработанным методом [8, 21]. Использовали в анализах “рабочую” суспензию бактерий с $1,4 \times 10^7$ кл./мл.

Плотность бактериальных суспензий оценивали нефелометрически (при длине волны $\lambda = 670$ нм) и выражали числом клеток в 1 мл по предварительно составленным калибровочным кривым.

Интенсивность свечения бактерий, выраженную в относительных единицах (отн. ед.), регистрировали с помощью люминометра “Биотокс” (Россия) автоматически по программе люминометра определяя индекс токсичности исследуемых образцов воды.

Подготовка к анализу проб воды. 3 образца воды разной степени очистки получены из Курьяновской станции аэрации: образец № 1 — механическая очистка и первичный отстойник, образец № 2 — механическая очистка, первичный отстойник и аэротенк, образец № 3 — механическая очистка, первичный отстойник, аэротенк и песчано-гравийные фильтры.

Обработку исследуемой воды разной степени очистки (50 мл) электромагнитным излучением (ЭМИ) низкой интенсивности ($\nu = 42,25$ ГГц) осуществляли с помощью прибора Г4-141 (Россия) в течение 30 мин в тефлоновых стаканах.

Постановка эксперимента (процедура проведения анализа и определение индекса токсичности). Измерения токсичности образцов проводили при комнатной температуре (22°C) следующим образом. Наливали в чистые пробирки (Эпендорфа) объемом 1,5 мл по 0,1 мл рабочей суспензии биосенсора. Для определения индекса токсичности трех исследуемых образцов воды к контрольной кювете добавляли 0,9 мл дистиллированной воды (для всех образцов — дистиллированная вода, pH = 7,0), к опытной — 0,9 мл водного экстракта исследуемого образца необлученной воды. Общий объем растворов в пробирке равен 1 мл.

Биологический эффект ЭМИ на облученных образцах воды разной степени очистки выявляли следующим образом: в качестве контрольного образца использовали необлученную воду каждого образца воды, а опытным образцом служили те же образцы воды, но облученные.

Измерение свечения контрольного образца предшествовало измерению опытного. Эффективность действия токсического вещества может меняться во времени, поэтому время экспозиции опытного и контрольного образцов воды с биосенсором было одно-

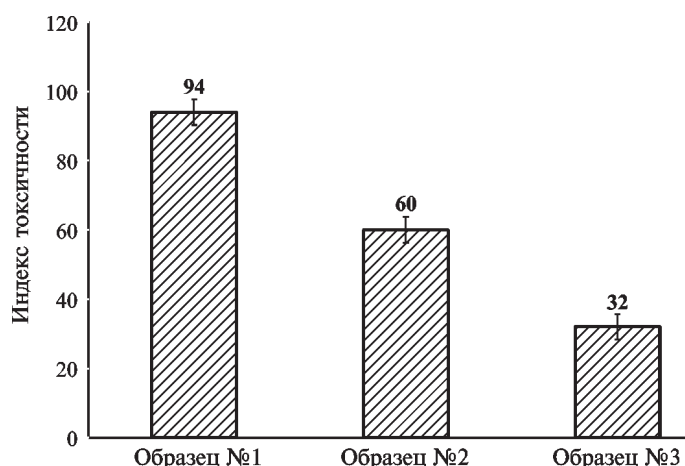
временным и строго фиксированным — через 30 мин экспозиции биосенсора с образцами воды. Ставили в кюветное отделение люминометра пробирки с образцами воды с биосенсором и регистрировали биолюминесцентный сигнал (в относительных единицах — отн. ед.), интенсивность свечения контрольного образца — I_0 , затем — интенсивность свечения опытного образца I , определяя величину индекса токсичности $T = 100 \times (I_0 - I)/I_0$ автоматически по программе люминометра “Биотокс” ($T_{\max} = 100$).

В анализах с бактериальным люминесцентным тестированием приняты следующие критерии токсичности: 1) T — равен или менее 20 — образец нетоксичен, $T = 20$ — “пороговая” токсичность, 2) T — от 20 до 50 — образец токсичен, 3) T — от 50 и более — образец очень токсичен [4, 7].

Для получения достоверных данных в анализах использовали контрольные и опытные образцы воды в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены данные об интегральной токсичности трех исследуемых образцов сточной воды, полученных с помощью биотеста люминесцентной тест-системы “Эколюм” (для всех образцов биосенсора со сточной водой контролем является биосенсор в дистиллированной воде, pH = 7,0). Как видно из рисунка, исследуемая вода образца № 1 очень токсична ($T > 95$), у более очищенной воды образца № 2 также высокая токсичность ($T > 65$), а наиболее чистая вода образца № 3 — слаботоксична (T около 30), что превышает “пороговую” токсичность ($T = 20$). Следует отметить, что московская хлорированная водопроводная вода во многих на-



Индекс токсичности (T) трех образцов сточной воды разной степени очистки, полученный экспресс-методом на основе бактериальной люминесценции тест-системы “Эколюм-08”. Обозначения: образец воды № 1 — вода прошла механическую очистку и первичный отстойник; образец воды № 2 — вода очищенная, прошла механическую очистку, первичный отстойник и аэротенк; образец воды № 3 — вода доочищенная, прошла механическую очистку, первичный отстойник, аэротенк и песчано-гравийные фильтры

ших домах и лабораториях МГУ после отстаивания также часто имеет индекс токсичности (Т) от 20 до 30.

Для четкого представления о влиянии ЭМИ на исследуемую воду разной степени очистки мы использовали в контрольных образцах сами образцы воды разной степени очистки, а не дистиллированную воду, как в предыдущих экспериментах. В качестве опытных образцов воды брали те же самые образцы воды, но только облученные. Следует отметить, что биотестированием мы также оценивали токсичность облученных образцов воды разной степени очистки по отношению к необлученному контрольному образцу в дистиллированной воде. Эти данные соответствуют превышению токсичности облученных образцов воды разной степени очистки, суммированными с данными токсичности этих же необлученных образцов воды (рисунок и таблица). В таблице приведены данные о вкладе ЭМИ в общую токсичность исследуемых образцов воды. Представленные результаты свидетельствуют об увеличении токсичности воды исследуемых образцов после облучения. Из-за высокой токсичности воды образца № 1 с малой очисткой ($T > 100$) действие ЭМИ не удастся выявить при использовании контрольного образца биосенсора в дистиллированной воде. Однако при использовании в качестве контрольного образца биосенсора в воде образца № 1 вклад ЭМИ в общую токсичность воды наиболее выражен при действии на самую “грязную” воду: индекс токсичности (Т) воды в этом случае значительно увеличивается (на 60—68). Меньшее действие облучения оказывает на воду образца № 2: значение Т увеличивается до 30, т.е. облученный образец этой воды еще более токсичен (облученный контрольный образец — биосенсор в дистиллированной воде — имеет Т около 80). У образца № 3 вклад ЭМИ в токсичность воды менее значителен — Т увеличен на

18—21, т.е. чем чище вода, тем меньше выражено действие ЭМИ на показатель интегральной токсичности сточной воды.

Таким образом, биотестирование с помощью бактериальной люминесцентной тест-системы позволило (предварительно до облучения ЭМИ) оценить качество исследуемых образцов сточной воды: образец № 3 наиболее очищен и имеет наименьшую токсичность (Т самой воды около 30), наибольшая токсичность у образца воды с наименьшей очисткой — образец № 1 (Т самой воды более 95). Эти данные подтверждают качество очистки сточной воды на Курьяновской станции аэрации.

Особый интерес представляют данные биотестирования о влиянии ЭМИ на воду разной степени очистки: облучение ЭМИ сточной воды увеличивает ее токсичность (таблица). Установлено, что вклад облучения в интегральную токсичность воды зависит от чистоты воды: чем более загрязнена вода, тем более выражено токсическое действие ЭМИ (Т увеличивается до 60). При более высокой степени очистки воды действие ЭМИ выражено меньше (Т увеличивается до 20).

Одним из объяснений механизма действия ЭМИ на водные системы является структурирование воды. Полученные данные в этой работе подтверждают ранее полученные нами данные в других экспериментах. Так, было показано, что действие облучения зависит от чистоты раствора воды [22—24]. В данной работе использовали ЭМИ низкой интенсивности ($\nu = 42,25$ ГГц), так как проведенные ранее исследования показали эффективность этого воздействия на другие биологические объекты [24].

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что бактериальный люминесцентный биосенсор тест-систем может быть использован не только для оценки токсичности воды, что известно и

Вклад ЭМИ ($\nu = 42,25$ ГГц) в интегральную токсичность образцов сточной воды разной степени очистки

Образцы воды	Вид очистки исследуемых образцов воды	Индекс токсичности (Т)	Вывод о вкладе ЭМИ в токсичность образцов воды
№ 1 — контрольная вода	Контроль — вода прошла механическую очистку и первичный отстойник	809 отн. ед.	
№ 1 — облученная вода	Облученная ЭМИ вода образца № 1	64 ± 4	Очень увеличивает токсичность
№ 2 — контрольная вода	Контроль — вода очищенная, прошла механическую очистку, первичный отстойник и аэротенк	3307 отн. ед.	
№ 2 — облученная вода	Облученная ЭМИ вода образца № 2	30 ± 2	Увеличивает токсичность
№ 3 — контрольная вода	Контроль — вода доочищенная, прошла механическую очистку, первичный отстойник, аэротенк и песчано-гравийные фильтры	3492 отн. ед.	
№ 3 — облученная вода	Облученная ЭМИ вода образца № 3	18 ± 3	Пороговая токсичность

широко используется на практике [4; 5; 7; 14–16; 19; 21], но и для выявления биологического действия ЭМИ. При этом лиофильно высушенные люминесцентные бактерии биосенсора представляют стандартный материал биотестирования, длительно хранятся (более полугода) и могут быть использованы по мере необходимости.

Очень важно подчеркнуть, что наличие в настоящее время в биосфере мощных источников ЭМИ искусственного происхождения может повышать токсичность объектов окружающей среды, в частности загрязненных водоемов, что диктует необходимость экспрессного мониторинга их состояния методами биотестирования.

Выводы

1. Проведено биотестирование качества очистки сточной воды (трех образцов разной степени очистки) на Курьяновской станции аэрации экспресс-методом на основе люминесцентной бактериальной

тест-системы “Эколюм-08”. Подтверждено качество очистки исследуемых образцов воды: вода, прошедшая три ступени очистки имеет наименьший индекс токсичности (Т около 30); наибольшая токсичность у сточной воды, прошедшей только механическую очистку и первичный отстойник (Т более 95).

2. Облучение ЭМИ низкой интенсивности сточной воды разной степени очистки увеличивает ее токсичность. Обнаружено, что чем выше степень очистки, тем меньше выражено влияние ЭМИ на показатель интегральной токсичности исследуемых образцов воды.

3. Бактериальный люминесцентный биосенсор тест-системы “Эколюм” может быть рекомендован для экспрессного выявления биологического действия ЭМИ.

Благодарим сотрудника Курьяновской станции аэрации Н.В. Щеголькову за предоставленные образцы сточной воды разной степени очистки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь, 1991. 169 с.
2. Steinberg S.M., Poziomek E.J., Engelmann W.H., Rogers K.R. A review of environmental applications of bioluminescence measurements // *Chemosphere*. 1995. Vol. 30. N 11. P. 2155–2197.
3. Ганишин В.М., Данилов В.С. Клеточные сенсоры на основе бактериальной биолуминесценции // *Сенсорные системы*. 1997. Т. 11. № 6. С. 245–255.
4. Зарубина А.П., Мажуль М.М., Новоселова Л.А., Гапочка М.Г. Бактериальный люминесцентный биотест // *Сенсор*. 2005. № 3. Р. 14–21.
5. Медведева С.Е., Тюлькова Н.А., Кузнецов А.М., Родичева Э.К. Биолуминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий // *Журнал Сибирского федерального университета*. Сер. Биология. 2009. Т. 2. № 4. С. 418–452.
6. Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity // *Environ. Toxicol.* 2002. Vol. 17. N 3. P. 291–296.
7. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошиков Г.Е., Соловьева Л.Н., Карташев Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолуминесцентные системы на основе люмоперонов разных видов люминесцентных бактерий // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология*. 2002. № 3. С. 20–24.
8. Mantel J., Freidin M., Bulich A., Perry H. The effect of radiation on bioluminescent bacteria: possible use of luminescent bacteria as a biological dosimeter // *Physics in Medicine and Biology*. 1983. Vol. 28. N 5. P. 599–602.
9. Страховская М.Г., Пархоменко И.М., Зарубина А.П., Румбаль Я.В., Данилов В.С., Странадо Е.Ф. Фотоиндуцированное подавление биолуминесценции генно-инженерного штамма бактерий *Escherichia coli* TG1 (pXen 7) в присутствии фотодитозина // *Микробиология*. 2002. Т. 71. № 3. С. 345–348.
10. Bulich A. A., Tung K.-K., Scheibner G. The luminescent bacteria toxicity test: its potential use as an in vitro alternative // *Biolum. Chemilum.* 1990. Vol. 5. N 2. P. 71–77.
11. Kaiser K.L. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // *Environ. Health Perspect.* 1998. Vol. 106. N 2. P. 583–591.
12. Backhaus T., Grimme L.H. The toxicity of antibiotic agents with aid of intact luminous bacterium *Vibrio fischeri* // *Chemosphere*. 1999. Vol. 38. N 14. P. 3291–3301.
13. Jassim S.A.A., Ellison A., Denyer S.P. et al. In vivo bioluminescence: a cellular reporter for research and industry // *Biolum. Chemilum.* 1990. Vol. 5. N 3. P. 115–122.
14. Данилов В.С., Ганишин В.М. Бактериальные биосенсоры с биолуминесцентным выводом информации // *Сенсорные системы*. 1998. Т. 12. № 1. С. 56–68.
15. Bulich A.A., Isenberg D.L. The use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity // *Instr. Soc. Am. Transactions*. 1981. Vol. 20. N 1. P. 29–33.
16. Bulich A.A. A practical and reliable method for monitoring of aquatic samples // *Proc. Biochemistry*. 1982. Vol. 17. N 2. P. 45–47.
17. Araujo C.V.M., Nascimento R.B., Oliveira C.A., Strotmann U.J., Da Silva E.M. The use of microtox to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camacari (BA, Brazil.) // *Chemosphere*. 2005. Vol. 58. N 9. P. 1277–1281.
18. Mueller J.G., Middaugh D.P., Lantz S.E., Chapman P.J. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: chemical and biological assessment // *Appl. Environ. Microb.* 1991. P. 1277–1285.
19. Stewart G.S.A.B. In vivo bioluminescence: new potentials for microbiology // *Lett. Appl. Microbiol.* 1990. Vol. 10. P. 1–8.
20. Rabbow E., Rettberg P., Baumstark-Khan C., Homeck G. The SOS-LUX-LAC-FLUORO-Toxicity-test on the International Space Station (ISS) // *Adv. Space Res.* 2003. Vol. 31. N 6. P. 1513–1524.
21. Ревазова Ю.А., Данилов В.С., Зарубина А.П., Маркелова С.И., Соловьева Л.Н., Аверин А.В. Методика экспрессного определения токсичности воды с помощью лю-

минесцентного бактериального теста “Эколюм” // Методические рекомендации. Гос. сан.-эпид. нормирование РФ. Минздрав России. М, 2000. 19 с.

22. Гапочка М.Г., Королев А.Ф., Костиенко А.И., Мир-Касимов О.Р. Возможность существования неравновесных устойчивых структур воды, возникающих при воздействии электромагнитного излучения миллиметрового диапазона // Тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. “Применение СВЧ энергии в технологических процессах и научных исследованиях”. Саратов: Издание Саратовского политехнического института, 1991. С. 138—139.

23. Гапочка Л.Д., Гапочка М.Г., Королев А.Ф., Костиенко А.И., Сухоруков А.П., Тимошкин И.В. Воздействие электромагнитного излучения КВЧ и СВЧ диапазонов на жидкую воду // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Физика, астрономия. 1994. № 4. С. 71—76.

24. Гапочка Л.Д., Гапочка М.Г., Костиенко А.И., Сухоруков А.П., Шайхалова Г.А. Влияния электромагнитных микроволн низкой интенсивности на оптические свойства одноклеточной зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* // Препринт физического факультета МГУ. № 6. 1998. 16 с.

Поступила в редакцию
29.06.11

BIOTESTING OF INFLUENCE OF THE ELECTROMAGNETIC FIELD OF LOW INTENSITY ON THE TOXICITY OF THE SEWAGE WATER BY THE TEST SYSTEM “ECOLUM”

A.P. Zarubina, M.G. Gapochka, L.A. Novoselova, L.D. Gapochka

Electromagnetic radiation of low intensity ($\nu = 42,25$ GHz) changes integrated toxicity of the sewage water of different degree of treating. It is shown that the less degree of water treating the more toxic effect of ER. It was revealed by express method on basis of a bacterial luminescence of the test system “Ecolum-08” that allows to offer this test system for a primary estimate of the ER action.

Key words: *bacterial luminescent test, electromagnetic radiation (ER), toxicity, sewage water, different degree of water treating.*

Сведения об авторах

Зарубина Алевтина Петровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-03; e-mail: al-zar1@ayndex.ru

Гапочка Михаил Германович — канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры фотоники и физики микроволн физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-10-47; e-mail: gapochka@physics.msu.ru

Новоселова Людмила Александровна — мл. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-03.

Гапочка Людмила Дмитриевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-78.