

УДК 628.356+574.64

М. А. Сазановец, аспирант (БГТУ);**А. В. Игнатенко**, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ)**АНАЛИЗ ДЕТОКСИКАЦИИ ВОДНЫХ СРЕД
МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**

В статье рассматривается проблема загрязнения сточных вод тяжелыми металлами и их удаления в процессе водоочистки. Для контроля детоксикации сточных вод использован метод биотестирования относительной подвижности тест-культуры клеток микроводоросли *E. gracilis* на свету и в темноте. Показано, что клетки *E. gracilis* наиболее физиологически активны в органико-минеральной среде на свету и обладают большей чувствительностью к солям тяжелых металлов в темноте. Скорость движения и жизнеспособность клеток *E. gracilis* снижались с ростом концентрации ионов Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} в водной среде от 10^{-7} до 10^{-2} М и времени их действия. Биотестирование подвижности клеток *E. gracilis* позволяет в течение 15–30 мин оценить уровень детоксикации сточных вод на разных стадиях их технологической очистки.

The article is devoted to the problem of waste water clearing from heavy metals. For analyses of water detoxication it was examined testing of microalgae *E. gracilis* movement at light and dark conditions. It was shown that cells *E. gracilis* were the most active in organic-mineral media at light and more sensitive to heavy metals in dark. Velocity of cells motion and their life ability were decreased with increasing of heavy metals Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+} concentration from 10^{-7} to 10^{-2} М and time of testing in water medium. Biotesting of cells movement makes it possible to appreciate in for 15–30 min a level of waste water detoxication at different stages of technological water cleaning.

Введение. Токсичность является одним из основных показателей экологической безопасности водных сред и оценки эффективности работы очистных сооружений. Среди опасных загрязнителей в городских сточных водах присутствуют труднорастворимые органические вещества (нефтепродукты, пестициды, моющие-дезинфицирующие вещества и др.), а также неорганические загрязнители (тяжелые металлы, нитраты, фосфаты и др.). Их содержание в сточных водах нормировано и ежедневно контролируется на очистных станциях [1].

Наиболее опасными и часто встречаемыми загрязнителями сточных вод являются тяжелые металлы, которые оказывают токсичное действие на микроорганизмы активного ила. Содержание отдельных тяжелых металлов на входе городской очистной станции колеблется от 1 до 10 ПДК, а в условиях залповых выбросов может достигать 100 ПДК и более [1, 2].

Для наблюдения за содержанием тяжелых металлов в сточных водах обычно используются химические, физико-химические и физические методы анализа. Однако они позволяют только косвенно судить о токсичности сточных вод по расчетному значению суммарного индекса токсичности (ИТ):

$$\text{ИТ} = \sum(C_i / \text{ПДК}_i), \quad (1)$$

где C_i , ПДК_i – текущие и предельно допустимые концентрации ионов тяжелых металлов [3].

Анализ сточных вод очистных сооружений по элементному составу не дает адекватных оценок безопасности воды и не учитывает эф-

фекты антагонизма, аддитивности, синергического действия веществ.

Возрастание числа загрязнителей, попадающих в водную среду в результате хозяйственной деятельности человека, а также их взаимодействие между собой с образованием новых соединений, иногда более токсичных, чем анализируемые вещества, требует применения большого количества отдельных методов химического анализа на каждое вещество.

Трудоемкость и длительность химического анализа, высокая стоимость оборудования при использовании физических методов контроля снижают экономическую эффективность измерений и вызывают необходимость биотестирования токсичности водной среды.

Для скрининга уровня токсичности сточных вод наиболее привлекательно использование низших форм живых организмов – одноклеточных микроорганизмов: бактерий, микроводорослей, простейших [3].

Контроль за уровнем токсичности водной среды проводится по оценке ее влияния на интегральные функции жизнедеятельности тест-культур клеток – размножение, дыхание, тепловыделение, подвижность и др.

Одной из высокочувствительных биоиндикаторных функций, характеризующих жизнеспособность подвижных форм микроорганизмов, является скорость их движения. Она отражает поведенческие реакции микроорганизмов на присутствие токсичных веществ и связана с биоэнергетикой клеток.

Микроводоросль *E. gracilis* является одноклеточным организмом, широко распространенным

в пресных водоемах и участвующим в процессах самоочистки водной среды, а также проявляющим достаточно высокую чувствительность к ее загрязнению.

Основным свойством данных организмов является их способность к миксотрофному питанию. На свету они используют фотосинтез и ведут себя как организмы с автотрофным типом питания. В темноте клетки *E. gracilis* переходят на гетеротрофный тип питания и ведут себя как простейшие [4].

В условиях действия токсичных веществ одним из показателей биотестирования безопасности водной среды может служить изменение относительной скорости движения клеток.

Основная часть. Целью настоящей работы была проверка возможности использования метода биотестирования скорости движения тест-культуры клеток *E. gracilis* для оценки степени детоксикации сточных вод на городских очистных сооружениях.

В качестве объекта исследования служили сточные воды Минской очистной станции (МОС), отобранные на входе в цех механической очистки, после решеток, песколовков, в первичных отстойниках, в секциях аэротенка, во вторичных отстойниках, в местах сброса очищенных сточных вод в реку Свислочь.

Пробы сточной воды отбирали в соответствии с ГОСТ Р 51592–2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ПНД Ф 12.15.1-08 «Методические указания по отбору проб для анализа сточных вод». Отобранные образцы сточных вод фильтровали через бумажный фильтр и использовали для биотестирования их токсичности по изменению двигательной активности микроорганизмов.

В качестве тест-культуры служили клетки микроводоросли *E. gracilis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии.

Для проверки возможности биотестирования присутствия токсичных веществ в водной среде использовали соли тяжелых металлов: FeSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 , K_2CrO_4 . Концентрации ионов тяжелых металлов в образцах изменяли в интервале 10^{-8} – 10^{-1} М.

Коллекционную культуру клеток *E. gracilis* высевали в минеральную питательную среду Лозино-Лозинского (Л-Л), а также в органические среды: питательный бульон (ПБ), сусло бульон (СБ), смешанную органо-минеральную (ОМ) среду (среда Л-Л : ПБ) и выращивали в течение 3 сут в колбах Эрленмейера на свету при освещенности 1000 лк и в темноте при $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Содержание клеток определяли с помощью камеры Горяева и светового микроскопа «Биолам» [5].

Для биотестирования токсичности воды использовали клетки в логарифмической ста-

дии роста. При анализе токсичности образцов к 9 мл анализируемой водной среды добавляли 1 мл 3-суточной тест-культуры клеток *E. Gracilis*, выдерживали образцы в течение 15 мин при комнатной температуре на свету или в темноте, и измеряли скорость движения клеток под микроскопом [6].

Относительную подвижность (B) тест-культуры клеток в присутствии токсикантов характеризовали величиной:

$$B = v_i / v_k, \quad (2)$$

где v_k , v_i – средние скорости движения клеток в водной среде в отсутствии и присутствии токсичных веществ, соответственно.

$$v_{i,k} = l / t_{i,k}, \quad (3)$$

где l – путь пробега, мм; $t_{i,k}$ – время пробега клеток между фиксированными метками, с.

Степень токсичности водной среды (T , %) определяли по формуле

$$T = (v_k - v_i) / v_k \cdot 100. \quad (4)$$

Усреднение показаний двигательной активности клеток проводили по $n = 10$ измерениям. Полученные данные обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

В начале работы был проведен отбор питательных сред, пригодных для культивирования тест-культуры *E. gracilis* в темноте и на свету. В качестве критерия отбора использовали содержание клеток в питательных средах после их 3-суточного выращивания при освещении и в темноте.

На рис. 1 приведены данные по изменению содержания клеток *E. gracilis* при их культивировании в питательных средах на свету и в темноте.

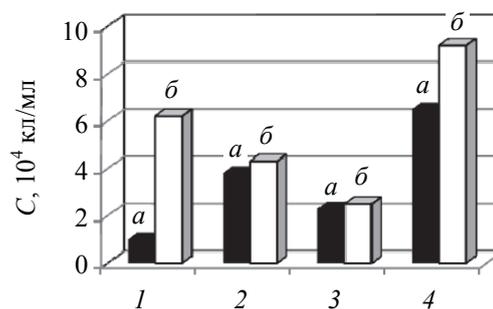


Рис. 1. Концентрации клеток *E. gracilis* после 3-суточного культивирования в питательных средах в темноте (а) и на свету (б): 1 – среда Лозино-Лозинского; 2 – ПБ; 3 – СБ; 4 – органо-минеральная среда

Как видно из рис. 1, минеральная среда Л-Л хороша для выращивания клеток *E. gracilis* на свету, но плохо подходит для их культивирования

в темноте. Органические среды ПБ и СБ обеспечили примерно одинаковую ростовую активность клеток в темноте и на свету, однако меньшую, чем для Л-Л среды при освещении. Максимальная ростовая активность клеток микроводоросли отмечена для смешанной ОМ среды на свету.

Полученные результаты указывают на то, что ОМ среда является наиболее полноценной для размножения клеток *E. gracilis* как на свету, так и в темноте.

На втором этапе работы были изучены кинетические и концентрационные зависимости влияния отдельных ионов тяжелых металлов на относительную подвижность клеток *E. gracilis* в ОМ среде.

На рис. 2 приведены результаты изменения относительной подвижности клеток *E. gracilis* в зависимости от времени тестирования в присутствии ионов меди.

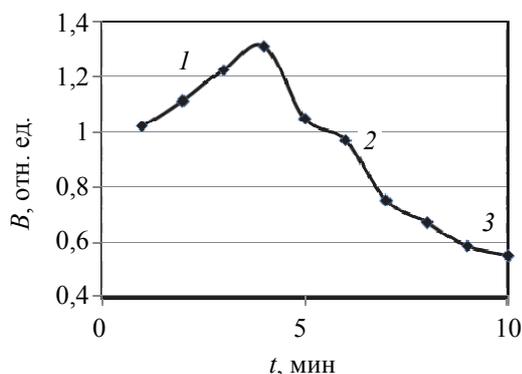


Рис. 2. Изменение относительной подвижности клеток *E. gracilis* от времени действия ионов Cu^{2+} ($C = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$): 1 – область активации; 2 – область ингибирования; 3 – стационарный режим

Как видно из рис. 2, на кинетической кривой выделяются три области изменения двигательной активности клеток.

Аналогичные изменения подвижности микроорганизмов наблюдались в присутствии других растворов тяжелых металлов, а также в случае анализа сточных вод. Это указывает на протекание переходных процессов и стрессовый характер действия тяжелых металлов на клетки.

Из полученных данных следует, что для развития стрессового ответа и достижения стационарного значения изменения величины V необходимо время порядка 10–15 мин.

Данное время было выбрано для биотестирования подвижности клеток для всех анализируемых образцов.

В условиях влияния токсикантов скорость и характер изменения подвижности клеток зависят также от концентрации веществ.

На рис. 3 приведены результаты изменения относительной подвижности клеток *E. gracilis* от логарифма концентрации ионов Cr^{6+} на свету и в темноте.

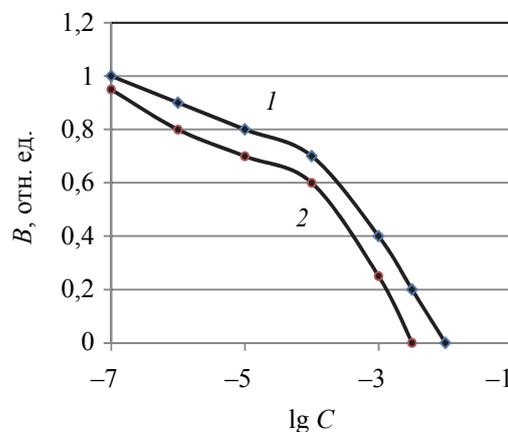


Рис. 3. Изменение относительной подвижности клеток *E. gracilis* от $\lg C$ ионов Cr^{6+} ($(20 \pm 2)^\circ\text{C}$): 1 – на свету; 2 – в темноте

Как видно из рис. 3, наблюдается 2-стадийный характер изменения подвижности клеток от $\lg C$ в присутствии ионов Cr^{6+} . Аналогичные зависимости были характерны и для других тяжелых металлов.

При увеличении концентрации ионов тяжелых металлов от 10^{-7} до 10^{-4} М наблюдалось снижение двигательной активности клеток. Изменения носили обратимый характер, на что указывало восстановление подвижности микроорганизмов при их переводе в чистую питательную среду.

При концентрациях 10^{-4} – 10^{-1} М ионы тяжелых металлов кобальта, никеля, кадмия, хрома оказывали токсичное действие на клетки микроводоросли *E. gracilis*.

С увеличением концентрации тяжелых металлов выше 10^{-4} М характер движения клеток изменялся с прямолинейного на вращательный вплоть до полной остановки.

При концентрациях изученных тяжелых металлов 10^{-2} М и выше клетки микроводоросли *E. gracilis* погибали.

Как следует из рис. 3, в темноте микроводоросль *E. gracilis* проявляла более высокую чувствительность к ионам тяжелых металлов, чем на свету. Различия в подвижности клеток увеличивались с ростом концентрации тяжелых металлов в водной среде.

В основе повреждающего действия тяжелых металлов на биоэнергетику микроводоросли *E. gracilis* в темноте лежит воздействие на транспортную и дыхательную системы клеток. На свету тяжелые металлы оказывают дополнительное воздействие еще и на фотосинтетическую систему клеток.

Более высокая устойчивость к тяжелым металлам для клеток *E. gracilis*, культивируемых на свету, по сравнению с клетками, выращенными в темноте, может быть связана с увеличением их энергетических возможностей для репарации возникающих повреждений, вызванных тяжелыми металлами.

Полученные данные могут также указывать на то, что фотосинтетический аппарат клеток микроводоросли *E. gracilis* обладает повышенной устойчивостью к ионам тяжелых металлов по сравнению с дыхательной и транспортной системами жизнедеятельности клеток, что требует дополнительной проверки.

На следующем этапе работы было изучено изменение уровня токсичности сточных вод МОС-1 и МОС-2 на разных технологических стадиях их очистки. Полученные результаты анализа детоксикации сточных вод в процессе их очистки на МОС-1 и МОС-2 приведены в таблице.

Биотестирование токсичности сточных вод с помощью клеток *E. gracilis* на разных стадиях их очистки на МОС-1 и МОС-2

Образцы	Токсичность, %	
	МОС-1	МОС-2
Песколовки	45,3 ± 3,0	40,2 ± 2,3
Первичный отстойник	43,0 ± 3,3	36,0 ± 2,8
Аэротенк	29,0 ± 1,9	21,0 ± 1,6
Вторичный отстойник	10,5 ± 0,8	5,6 ± 0,4

Знание величины B позволяет оценить индекс токсичности водных сред по изменению скорости движения клеток *E. gracilis* в соответствии с выражением (3).

При $T \leq 10\%$, воды могут рассматриваться как нетоксичные; при $10\% \leq T \leq 20\%$ – как слаботоксичные; при $20\% \leq T \leq 50\%$ – как среднетоксичные; при $50\% < T$ – как высокотоксичные.

Как видно из таблицы на входе очистных сооружений МОС-1 и МОС-2 их сточные воды относятся к среднему уровню токсичности, при этом воды МОС-2 были менее токсичны, чем МОС-1.

Решетки и песколовки незначительно снижали уровень токсичности сточных вод. Более

значительное уменьшение индекса токсичности воды наблюдалось после прохождения первичных отстойников. Максимальная детоксикация сточных вод происходила в секциях аэротенков очистных сооружений МОС-1 и МОС-2.

Детоксицирующая способность активного ила аэротенков составила 75% на МОС-1 и 84% на МОС-2, что указывает на основную роль активного ила аэротенков в процессах детоксикации сточных вод на городских очистных сооружениях.

Оценка индекса токсичности воды в точке сброса в реку Свислочь по данным метода биотестирования подвижности клеток составила $(9,5 \pm 0,6)\%$, что характеризует сбрасываемые воды, как нетоксичные и соответствующие нормативным показателям.

Заключение. Таким образом, полученные в работе результаты указывают на то, что биотестирование двигательной активности клеток *E. gracilis* позволяет в течение 15–30 мин определить уровень острой химической токсичности водной среды и оценить эффективность процессов детоксикации сточных вод на разных технологических стадиях их очистки.

Литература

1. Жмур Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. 512 с.
2. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие: в 2 т. / А. Е. Кузнецов [и др.]. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. Т. 1. 629 с. Т. 2. 485 с.
3. Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование / под ред. О. П. Мелеховой, Е. И. Егоровой. М.: Академия, 2007. 288 с.
4. Попова Т. Г., Сафонова Т. А. Эвгленовые водоросли. Л.: Наука, 1976. 287 с.
5. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина. 1978. 392 с.
6. Игнатенко А. В. Сенсорный контроль качества пищевых продуктов. Лабораторный практикум: учеб. пособие. Минск: БГТУ, 2008. 186 с.

Поступила 22.02.2014