

ОЦЕНКА качества воды **РОДНИКОВ** г. РОСТОВА-НА-ДОНУ НА ОСНОВЕ микробиологических И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ



Приведены результаты микробиологического исследования воды родников г. Ростова-на-Дону (2011 г.), а также данные по их загрязнению токсинами различной природы, полученные при помощи бактериальных lux-биосенсоров. Выявлены родники, наиболее загрязненные генотоксинами. Показано, что 87 % родников не соответствует требованиям безопасности по микробиологическим показателям.

Введение

Родники — это уникальные естественные источники воды, которые играют большую роль в питании других поверхностных водоёмов, а также в поддержании водного баланса близлежащих биоценозов. С давних времен родниковая вода используется населением для питьевых целей благодаря ее особым свойствам. Кроме питьевого предназначения, родники представляют ценность как в научном, так и в культурно-историческом плане.

В связи с увеличением антропогенной нагрузки на территории населенных мест и ухудшением качества поверхностных вод, роль питьевых подземных вод, которые считаются стратегическим источником хозяйственно-бытового водоснабжения, возрастает. Тем не менее, родники на территории населенных мест также испытывают высокое антропогенное влияние. Одной из важных экологических проблем, которая возникает в результате антропогенного прессинга,

М.А. Сазыкина*,
кандидат биологических наук, доцент, заведующая лабораторией промышленных микроорганизмов, ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Научно-исследовательский институт биологии

является качество водных источников, что влечет за собой необходимость контроля родниковой воды. При мониторинге состояния родников должны оцениваться различные показатели качества воды. В первую очередь это микробиологические, токсикологические и химические показатели, характеризующие экологическое состояние экосистем.

Составной частью экологического мониторинга окружающей природной среды является биотестирование. Оно включает в себя систему наблюдений, состоящую из оценки качества среды и прогноза различных изменений в биоте, вызванных факторами антропогенного происхождения. Использование биотестирования дает возможность суммировать все биологически важные данные об окружающей среде и оценивать ее состояние в целом.

*Адрес для корреспонденции: submarinas@list.ru

Высокую экспрессность и производительность в биотестировании позволяет достичь использование светящихся бактерий [1–3]. Чувствительность и экономичность биолюминесцентных тестов дает возможность использовать их для первичного скрининга больших массивов природных образцов с целью выделения групп для последующего химического анализа [4, 5].

Целью данной работы было изучение качества воды родников г. Ростова-на-Дону при помощи бактериальных lux-биосенсоров, а также исследование ее санитарно-микробиологического состояния.

Материалы и методы исследования

Образцы воды для биотестирования отбирались из 15 родников г. Ростова-на-Дону осенью (1 октября и 1 ноября) 2011 г. в соответствии с ГОСТ Р 51592-2000 [6].

Микробиологические показатели (общее микробное число и общие колиформные бактерии) в воде определялись в соответствии с МУК 4.2.1018-01 [7].

Для определения генотоксичности и содержания тяжелых металлов использовали бактериальные lux-биосенсоры, которые представляют собой комплекс из сенсорных биолюминесцентных штаммов, отвечающих изменением люминесценции на специфические для каждого штамма токсиканты, и регистрирующий эти изменения люминометр.

В качестве тест-системы для определения генотоксичности был использован SOS-lux тест [8]. Репортером SOS-ответа служил lux-оперон. Использовали штамм *E. coli* C600, трансформированный плазмидой pPLS-1, в которой оперон биолюминесценции находится под контролем SOS-промотора — C600[pPLS-1]. SOS-промотор взят из *sd* гена плазмиды ColD [9, 10].

Для обнаружения в среде таких тяжелых металлов, как ртуть и кадмий, был использован биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pMerR-lux), для определения мышьяка — биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pArsR-lux).

Бактерии растили в бульоне Лурия-Бертани, содержащем 100 мкг/мл ампициллина, с аэрацией при 37 °С. Ночную культуру разво-

З.С. Кхатаб, аспирант, ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Научно-исследовательский институт биологии

Е.М. Кудеевская, младший научный сотрудник, ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Научно-исследовательский институт биологии

И.С. Сазыкин, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет, Научно-исследовательский институт биологии

дили до концентрации 10^7 клеток/мл в свежем бульоне и растили при 37 °С в течение 2 ч. Затем пробы по 100 мкл переносили в лунки 96-луночных планшетов, часть которых служила контролем (в них добавляли 100 мкл дистиллированной воды), а в другие лунки вносили по 100 мкл образца природной воды. При определении генотоксичности с использованием метаболической активации в лунки вносили по 10 мкл активирующей смеси, содержащей фракцию микросомных ферментов печени крыс S-9 фирмы «Almalab» [11].

Приготовленные таким образом планшеты с клетками lux-биосенсора помещали в микропланшетный люминометр LM-01T («Immunotech») и через определенные интервалы времени измеряли интенсивность биолюминесценции клеточной суспензии. Инкубацию проб проводили при температуре 37 °С. Мерой загрязнения служил фактор индукции, определяемый как отношение интенсивности свечения суспензии штамма, содержащей тестируемое соединение (L_c), к интенсивности свечения контрольной суспензии штамма (L_k):

$$I = L_c / L_k,$$

где L_c — интенсивность свечения суспензии lux-штамма в присутствии тестируемого соединения; L_k — интенсивность свечения контрольной суспензии.

Достоверность отличия биолюминесценции в опыте от контрольной величины оценивали по t-критерию [12].

Вывод о генотоксичности пробы делали при $p < 0,05$. Если при достоверном отличии опыта от контроля значения фактора индукции были меньше 2, обнаруженный генотоксический эффект оценивали как «слабый»; если они лежали в диапазоне от 2 до 10 — как «средний», а при превышении 10 — как «сильный».

Содержание ртути и мышьяка оценивали по градуировочным графикам, для построения которых использовали ацетат ртути и арсенат натрия аналитической чистоты («Sigma-Aldrich»). По градуировочному графику можно оценить количество ртути или мышьяка, способное индуцировать эквивалентный ответ биосенсора [13].

Все эксперименты проводили в 3-5 независимых повторностях.

Микробиологические и токсикологические показатели в воде родников г. Ростова-на-Дону (осень 2011 г.)

№	Название родника, его расположение	Дата отбора	Общее микробное число (число образующих колонии микробов в 1 мл)	Общие колиформные бактерии (число бактерий в 100 мл)	Фактор индукции (I)			
					E. coli C600 (pPLS-I)		E. coli MG1655 (pMerR-lux)	E. coli MG1655 (pArsR-lux)
					- S9	+ S9		
1	Нижний Железнодорожный проезд, д. 37 [#]	01.10.2011	15	16	1,0	1,1	1,4	1,3
		01.11.2011	68	70	1,3	1,6*	1,2	1,1
2	В районе Ростовского зоопарка, на правом берегу р. Темерник [#]	01.10.2011	50	1100	1,0	0,9	1,2	1,3
		01.11.2011	17	1600	1,4	2,0*	1,6*	1,1
3	Ул. Береговая, на территории Парамоновских складов	01.10.2011	830	2200	1,3	1,1	1,6*	1,2
		01.11.2011	250	2400	1,5*	1,4	1,5*	1,4
4	Источник «Серебряный», район ж/д станции Первомайская, ГПЗ-10	01.10.2011	39	260	1,2	1,3	1,4	1,2
		01.11.2011	250	80	1,5*	1,4	1,4	1,4
5	Пересечение улиц Борко и Капустина	01.10.2011	28	80	1,0	0,9	1,3	1,3
		01.11.2011	27	30	1,3	1,2	1,7*	1,1
6	«Сурб-Хач», у мемориального комплекса «Сурб-Хач» [#]	01.10.2011	21	0	1,0	0,9	1,3	1,2
		01.11.2011	18	0	1,0	1,3	1,4	1,3
7	Источник им. Преподобного Серафима Саровского, на территории Боганинского сада [#]	01.10.2011	53	0	1,6*	1,1	1,7*	1,3
		01.11.2011	75	2	1,7*	1,4	1,7*	1,3
8	Район ул. Можайская, у водосемов [#]	01.10.2011	30	130	1,3	0,9	2,2*	1,2
		01.11.2011	25	70	1,5*	1,6*	1,5*	1,6
9	«Гремучий», вблизи ж/д станции «Ростов-Берег», ул. Амбулаторная, 55 [#]	01.10.2011	0	0	1,0	1,0	2,1*	1,2
		01.11.2011	10	0	1,6*	2,2*	1,8*	1,6*
10	Ул. Каяльская, 71 [#]	01.10.2011	24	240	1,0	1,5*	1,8*	1,4
		01.11.2011	210	250	1,5*	1,5*	1,9*	1,4
11	«Пост ВОХР», ул. Кобякова, 32	01.10.2011	370	900	1,1	1,4	1,3	1,3
		01.11.2011	430	1500	1,5*	1,6*	1,6*	1,4
12	Ул. Кржижановского, 396 [#]	01.10.2011	17	2	0,9	1,2	1,6*	1,3
		01.11.2011	19	100	1,7*	1,4	1,6*	1,6*
13	Район ж/д станции «Аксай»	01.10.2011	0	0	1,8*	1,5*	1,8*	1,7*
		01.11.2011	149	200	1,7*	1,6*	1,8*	1,7*
14	На правом берегу р. Темерник, на ул. Куликовская, около д. 37 [#]	01.10.2011	16	40	0,9	1,0	2,0*	1,3
		01.11.2011	18	7	1,6*	2,0*	1,9*	1,5*
15	«Богородичный», на правом берегу р. Темерник в районе женского монастыря Иверской Иконы Божьей Матери [#]	01.10.2011	12	15	0,9	0,9	2,0*	1,4
		01.11.2011	25	200	1,6*	2,6*	1,8*	1,4
16	Норматив [§]		100	отс.	–	–	–	–

Примечание к таблице 1

— названия родников статистически значимы, t-критерий, p < 0,05;

* — отличия от контроля статистически значимы, t-критерий, p < 0,05;

§ — нормативы, которым должна соответствовать вода родников согласно СанПин 2.1.4.1175-02 [15];

«—» — показатели не нормируются. Исследование родниковой воды с помощью биосенсорных штаммов E. coli MG1655 (pMerR-lux) и E. coli MG1655 (pArsR-lux) показало, что максимальный фактор индукции, зарегистрированный в родниковой воде, составляет 2,1, что соответствует содержанию ртути менее 0,0002 мг/л.

Результаты и их обсуждение

Микробиологический состав родниковых вод зависит от антропогенного влияния городского хозяйства и является показателем экологического состояния территории. Для санитарно-микробиологического исследования образцов воды родников из перечня контролируемых показателей качества воды были выбраны два — общее микробное число и общие колиформные бактерии.

Полученные данные представлены в *табл. 1*. Исследование проб воды, отобранных в разные даты (октябрь и ноябрь 2011 г.), показало, что только в 2 из 15 исследованных родников (13,3 %) вода соответствует требованиям безопасности по микробиологическим показателям. Это родники «Сурб-Хач» и «Гремучий». Территория родников чистая, оба источника каптированы трубами. В остальных 13 родниках было отмечено превышение числа общих колиформных бактерий. В 5 источниках также было зафиксировано превышение общего микробного числа от 1,49 до 8,3 раз. Основным источником микробного загрязнения родниковых вод, как известно, являются сточные воды. Способствует ему ветхость городской канализации, а также сильная замусоренность водосборных территорий родников.

Самый грязный родник расположен на ул. Береговой, на территории Парамоновских складов. Загрязнению источника способствует антисанитарная обстановка — территория источника замусорена бытовыми отходами. Родник не каптирован, вода пробивается из земляного склона, сквозь арку в кирпичной стене складских развалин. С близлежащих территорий сбрасываются в родник разнообразные стоки. В зоне его питания расположены городские кварталы, большей частью представленные частным сектором со сточными ямами.

Так как родники подпитываются грунтовыми водами, которые просачиваются с поверхности, удовлетворительного качества воды при существующем масштабе загрязнения окружающей среды добиться практически невозможно. При этом состояние воды быстро изменяется, что проиллюстрировано данными в *табл. 1*. Так, величина микробиологических показателей воды в родниках «Серебряный», на ул. Каяльского, в районе ж/д станции «Аксай» в разные даты отбора резко изменялась.

Для обнаружения в среде химических агентов, повреждающих в клетке ДНК (ДНК-тропные агенты), был использован биосенсорный штамм *E. coli* C600 (pPLS-1). Его применение позволило зарегистрировать генотоксический эффект слабой силы без применения метаболической активации в 13 пробах воды, отобранных из 11 источников. В случае метаболической активации генотоксичность обнаружена в 11 пробах из 9 родников, причем в родниках «Гремучий» и «Богородичный» были зафиксированы эффекты средней величины (2,2 и 2,6).

В исследованиях, проведенных нами ранее [16], максимальный фактор индукции был обнаружен также в роднике «Гремучий». Генотоксичность в роднике выявляется как без применения метаболической активации, так и с ее использованием, что говорит о присутствии генотоксических веществ как прямого действия, так и промутагенной природы. Данный факт свидетельствует о том, что около родника расположен постоянный источник загрязнения ДНК-тропными веществами. Возможно, из-за потенциально высокой токсичности этих веществ в роднике зарегистрированы низкие количества микроорганизмов.

Родники «Сурб-Хач» и расположенный на пересечении улиц Борко и Капустина — единственные источники, в воде которых в 2011 г. не был обнаружен генотоксический эффект. В роднике на пересечении улиц Борко и Капустина при тестировании в 2009 г. с биосенсорным штаммом *E. coli* C600 (pPLS-1) генотоксичность также не была обнаружена [16].

В наших исследованиях использовались и узкоспецифичные биосенсоры, отвечающие повышением уровня биолюминесценции на присутствие в среде ионов ртути, кадмия, мышьяка и сурьмы. Следует отметить, что сенсоры достаточно специфичны. Причем чувствительность сенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pMerR-lux) к ртути на несколько порядков выше, чем к кадмию. Биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (pArsR-lux), помимо мышьяка, реагирует лишь на ионы сурьмы, но с гораздо меньшей чувствительностью. В связи с этим полученные результаты рассматривались применительно к ионам ртути и мышьяка. Следует отметить, что lux-биосенсоры для определения как генотоксичных веществ, так и тяжелых металлов, широко использу-

ются в практике экологического контроля [17-21].

Максимальное значение фактора индукции биолюминесцентного ответа *E. coli* MG1655 (pArS_R-lux) составило 1,7, что равнозначно содержанию мышьяка менее 0,00075 мг/л.

В соответствии с СанПиН 2.1.4.1074-01 [22], ПДК ртути в питьевой воде составляет 0,0005 мг/л, а мышьяка — 0,05 мг/л. ПДК ртути в воде водоемов санитарно-бытового водопользования и водоемов у пунктов питьевого и культурно-бытового водопользования — 0,0005 мг/л, мышьяка — 0,01 мг/л [23].

Таким образом, из полученных данных видно, что зарегистрированные в воде родников количества ртути и мышьяка гораздо ниже вышеуказанных ПДК.

Тем не менее, результаты бактериологического анализа и анализа на генотоксичность свидетельствуют о том, что вода всех исследованных родников г. Ростов-на-Дону, за исключением источника «Сурб-Хач», не соответствует требованиям по санитарно-химическим показателям.

Заключение

Качество родниковой воды напрямую зависит от экологической обстановки. Родники питаются атмосферными осадками, а также водами антропогенного происхождения — промышленными стоками, водами ливневого стока и канализации, водопроводной водой. Большая часть промышленных и бытовых стоков поступает в водоносную систему города практически неочищенной и несет огромное количество токсикантов.

Систематический контроль за санитарным состоянием родников и качеством воды позволит своевременно принимать действенные меры и предупреждать возможные неблагоприятные воздействия на здоровье населения, пользующегося подземной водой для питьевых целей.

Использование чувствительных, экспрессных и экономичных тестов на основе бактериальных lux-биосенсоров для детекции загрязнения различной природы позволит проводить первичный скрининг проб воды родников г. Ростова-на-Дону с целью выявления наиболее загрязненных проб для

проведения детального химического анализа.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.A18.21.0851.

Литература

1. Alkorta I. Bioluminescent bacterial biosensors for the assessment of metal toxicity and bioavailability in soils / I. Alkorta, L. Epelde, I. Mijangos, I. Amezaga, C. Garbisu // Rev. Environ. Health. 2006. V. 21. № 2. P. 139–152.
2. Girotti S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria // S. Girotti, E.N. Ferri, M.G. Fumo, E. Maiolini // Anal. Chim. Acta. 2008. V. 608. P. 2–29.
3. Su L. Microbial biosensors: a review / L. Su, W. Jia, C. Hou, Y. Lei // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. P. 1788–1799.
4. Цыбульский И.Е. Новые биосенсоры для мониторинга токсичности среды на основе морских люминесцентных бактерий / И.Е. Цыбульский, М.А. Сазыкина // Прикл. биохим. и микробиол. 2010. Т. 46. № 5. С. 1–6.
5. Woutersen M. Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? / M. Woutersen, S. Belkin, B. Brouwer, A.P. van Wezel, M.B. Heringa // Anal. Bioanal. Chem. 2011. V. 400. P. 915–929.
6. ГОСТ Р 51592-2000. Вода. Общие требования к отбору проб. М.: Стандартинформ, 2005. 31 с.
7. Методические указания МУК 4.2.1018-01. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды. М.: Минздрав России, 2001. 24 с.
8. Птицын Л.П. Биолюминесцентный анализ SOS-ответа клеток *E. coli* // Генетика. 1996. Т. 32. № 3. С. 354–358.
9. Ptitsyn L.R. A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant *Escherichia coli* cells / L.R. Ptitsyn, G. Horneck, O. Komova, S. Kozubek, E.A. Krasavin, M. Bonev, P. Rettberg // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 11. P. 4377–4384.
10. Frey J. Physical and genetic analysis of the ColD plasmid / J. Frey, P. Ghera, P.G. Palacios, M. Belet // J. Bacteriol. 1986. V. 166. P. 15–19.
11. Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Герхардта Ф.М.: Мир, 1984. Т. 2. 470 с.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
13. Сазыкина М.А. Использование бактериального lux-биосенсора для детекции загрязнения природных вод ртутью / М.А. Сазыкина, В.А. Чистяков, И.С. Сазыкин, Л.П. Лагутова, Е.М.

Новикова, А.В. Латышев // Вода: химия и экология. 2010. № 5. С. 24–29.

14. Решение коллегии администрации г. Ростова н/Д от 06.02.97 № 2 о программе «Родники г. Ростова-на-Дону». Электронный ресурс: <http://www.bestprav.ru/rostov/data06/tex20470.htm>.

15. СанПиН 2.1.4.1175-02. Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников. М.: Минздрав России, 2003. 15 с.

16. Сазыкина М.А. Генотоксичность воды родников г. Ростова-на-Дону (2009 г.) / М.А. Сазыкина, В.А. Чистяков, И.С. Сазыкин, Е.М. Новикова, Э.С. Кхатаб, Л.П. Лагутова, А.В. Латышев // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2011. № 2. С. 44–46.

17. Ahn J.M. Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages / J.M. Ahn, E.T. Hwang, C.H. Youn, D.L. Banu, B.C. Kim, J.H. Niazi, M.B. Gu // Biosens. Bioelectron. 2009. V. 25. P. 767–772.

18. Ivask A. Recombinant luminescent bacterial sensors for the measurement of bioavailability of cadmium and lead in soils polluted by metal smelters / A. Ivask, M. François, A. Kahru, H.C. Dubourguier, M. Virta, F. Douay // Chemosphere. 2004. V. 55. № 2. P. 147–156.

19. Hakkila K. Detection of bioavailable heavy metals in EILATox-Oregon samples using whole-

cell luminescent bacterial sensors in suspension or immobilized onto fibre-optic tips / K. Hakkila, T. Green, P. Leskinen, A. Ivask, R. Marks, M.J. Virta // Appl. Toxicol. 2004. V. 24. № 5. P. 333–342.

20. Ivask A. Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain / A. Ivask, T. Green, B. Polyak, A. Mor, A. Kahru, M. Virta, R. Marks // Biosens. Bioelectron. 2007. V.22. № 7. P. 1396–1402.

21. Parvez S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals / S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji // Environ. Int. 2006. V. 32. № 2. P. 265–258.

22. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. М.: Минздрав России, 2002. 62 с.

23. ГН 2.1.5.1315-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. М.: Минздрав России, 2003. 74 с.



M.A.Sazykina, Z.S.Kkhatab, E.M.Novikova, I.S.Sazykin

ESTIMATION OF SPRING WATER QUALITY IN ROSTOV-ON-DON CITY USING MICROBIOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS

This article represents results of microbiological studies and obtained by lux-biosensors data on pollution by different toxins for springs in Rostov-on-Don city in 2011 year. The most genotoxic contaminated springs were revealed. It was shown that 87% of springs in Rostov-on-Don city are out of keeping with microbial safety requirements.

Key words: spring, pollution, genotoxicity, lux-biosensor, heavy metals