

Биомониторинговые возможности микроорганизмов при оценке степени токсичности синтетических поверхностно-активных веществ

© 2018. Л. В. Кондакова^{1,2}, д. б. н., профессор, Л. И. Домрачева^{2,3}, д. б. н., профессор,
Т. Я. Ашихмина^{1,2}, д. т. н., профессор, В. С. Симакова³, аспирант,

¹Вятский государственный университет,
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36,

²Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
167982, Россия, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28,

³Вятская государственная сельскохозяйственная академия,
610017, Россия, г. Киров, Октябрьский проспект, 133,
e-mail: dli-alga@mail.ru

Доказана возможность использования отдельных групп микроорганизмов для выявления степени токсичности синтетических поверхностно-активных веществ (СПАВ), которые используются в качестве автошампуней. Показана высокая чувствительность двух видов цианобактерий *Nostoc paludosum* и *Fischerella muscicola*, применяемых в качестве тест-организмов на действие трёх марок автошампуней. При инкубировании культур цианобактерий в растворах автошампуней с концентрацией, равной рекомендуемой дозе (1 р. д.), происходит резкое падение численности жизнеспособных клеток. Биотестирование с помощью бацилл проводили путём высева бактериальных суспензий на питательный агар с предварительно внесённым лаурилсульфатом натрия (ЛСН). Критерием токсичности служило снижение числа выросших колоний бацилл в опытных вариантах. Индикационным признаком на токсичность СПАВ послужило снижение процента обрастания почвенных комочков бактериями р. *Azotobacter*. Отмечено также снижение видового разнообразия микроскопических водорослей и цианобактерий в почве при действии ЛСН. Наиболее чувствительными к загрязнению почвы ЛСН оказались представители отделов Xanthophyta и Eustigmatophyta. Наибольшее количество видов водорослей наблюдалось в контрольном варианте и в варианте 0,5 р. д. ЛСН.

Полученные результаты по негативному воздействию испытуемых СПАВ на микроорганизмы разной систематической принадлежности доказывают необходимость осторожного обращения с автошампунями на автомойках и при индивидуальном использовании, чтобы исключить возможность их попадания в почву.

Ключевые слова: синтетические поверхностно-активные вещества, автошампуни, биотестирование, биоиндикация, цианобактерии, бациллы, альгофлора, *Azotobacter*.

Biomonitoring capabilities of microorganisms when assessing the degree of toxicity of synthetic surfactants

© 2018. L. V. Kondakova^{1,2} ORCID: 0000-0002-2190-686X, L. I. Domracheva^{2,3} ORCID: 0000-0002-7104-3337,
T. Ya. Ashikhmina^{1,2} ORCID: 0000-0003-4919-0047, V. S. Simakova³ ORCID: 0000-0003-0250-1936

¹Vyatka State University,

36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

²Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Branch of RAS,
28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

³Vyatka State Agricultural Academy,
133, Oktyabrskiy Prospect, Kirov, Russia, 610017,

e-mail: dli-alga@mail.ru

High sensitivity of the two species of cyanobacteria (*Nostoc paludosum* and *Fischerella muscicola*) as test-organisms by means of stating their hydrogenase activity with the tetrazolium-topographical method was proved; presence of formazan in cyanobacteria living cells served as a marker. It was stated that decrease in species composition of algae and cyanobacteria can serve as a bioindication sign of synthetic surface-active substances in the environment. Formazan

accumulation decreased considerably under the influence of car wash of three trade-marks. When cyanobacteria cultures are incubated in solutions of car shampoos with a recommended dose concentration, the number of viable cells drops sharply. Bioassay with the help of bacilli was carried out by means of bacterial suspension inoculation on nutrient agar with preliminary added sodium lauryl sulfate (SLS). The toxicity criterion consisted in decreasing number of the grown bacilli colonies in experimental variants. It is shown that the degree of toxicity of SLS can be tested using bacteria of the genus *Bacillus*, judging from decrease of the percent of soil-balls encrusting with bacteria of the genus *Azotobacter*.

The representatives of Xanthophyta and Eustigmatophyta were the most sensitive to soil pollution with SLS. The number of algae species was the most in the control variant and in the variant with 0.5 recommended dose of SLS. The results showing negative influence of the tested synthetic surface-active substances on microorganisms with different systematic characteristics proved the fact that it is necessary to carefully use car wash and to avoid car wash getting into soil.

Keywords: synthetic surface-active substances (SSAS), car wash, bioassay, bioindication, cyanobacteria, *Bacillus*, algoflora, *Azotobacter*.

К числу поллютантов, объём попадания которых в окружающую среду постоянно возрастает на 2–5% в год, относятся синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ) [1]. Хотя определение степени их токсичности для живых организмов началось сравнительно недавно, установлено, что в некоторых случаях СПАВ являются более опасными загрязнителями среды, чем полагали ранее [2–7]. При этом, как и для других загрязняющих веществ, степень токсичности СПАВ для биоты проводят, используя тест-организмы и организмы-индикаторы различной систематической принадлежности [8]. Однако анализ литературных данных показывает, что среди тестируемых СПАВ практически отсутствуют автошампуни, популярность которых для мойки автомобилей возрастает с каждым годом так же, как и количество автомоек. Поэтому возникает необходимость проведения исследований, связанных с изучением экологических последствий циркуляции автошампуней в окружающей среде.

Цель данной работы – определение характера действия СПАВ на различные группы микроорганизмов и оценка их устойчивости к возрастающим концентрациям автошампуней марок Концентрат, Felix, Uni и лаурилсульфата натрия (ЛСН).

Объекты и методы

Объектами исследования, которые использовались в качестве тест-организмов на действие изучаемых автошампуней и ЛСН, были 2 вида цианобактерий (ЦБ) *Nostoc paludosum* Kütz. № 18 и *Fischerella muscicola* (Thur.) Gom. № 300 из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской ГСХА, выращенных на питательной среде Громова № 6 без азота в течение 12 недель при температуре 22–24 °С и 12-часовом освещении; а также 2 вида бак-

терий рода *Bacillus* (*B. mesentericus* и *Bacillus* sp.), выделенных из гербарных образцов бурых водорослей и обладающих повышенной устойчивостью к тяжёлым металлам. В качестве организмов-индикаторов выступала альгофлора дерново-подзолистой почвы, образцы которой были отобраны в черте г. Кирова, и бактерии р. *Azotobacter*, присутствующие в почве пойменного и суходольного лугов.

На изучаемые объекты действовали автошампуни и ЛСН в возрастающих концентрациях. Такое вещество, как ЛСН повсеместно начали использовать уже с 1930 г. В настоящее время его используют при производстве мыла, зубных паст и автошампуней. По норме для мойки машин расчётная (рекомендуемая) доза (1 р. д.) составляет 130 мг порошка на 1 л дистиллированной воды. Из автошампуней для исследования были выбраны 3 марки, наиболее часто используемые на рынке г. Кирова: Концентрат, Uni и Felix, для которых 1 р. д. составляет 10, 35 г и 30 г на 1 л воды соответственно.

Для биотестирования степени токсичности СПАВ с помощью ЦБ использован тетразольно-топографический метод [9]. Критерием токсичности служило снижение числа жизнеспособных клеток. Биотестирование с помощью бацилл проводили путём высева бактериальных суспензий на питательный агар с предварительно внесённым ЛСН. Критерием токсичности служило снижение числа выросших колоний бацилл в опытных вариантах.

Индикационная роль азотобактера учитывалась по методике, основанной на учёте обрастания комочков почвы, разложенных в чашках Петри на агаризованной среде Эшби [9]. Критерий токсичности – снижение количества комочков почвы, обросших азотобактером. Метод альгоиндикации основан на постановке почвенных чашечных культур со стёклами обрастания. Критерий токсичности – снижение видового разнообразия водорослей и ЦБ.

Результаты и обсуждение

Биотестирование автошампуней тетразольно-топографическим методом. При инкубировании культур ЦБ *N. paludosum* и *F. muscicola* в растворах автошампуней с концентрацией 1 р. д. в течение 24 часов происходит резкое падение численности жизнеспособных клеток (табл. 1). Маркерным признаком таких клеток является накопление в них ярко красных кристаллов формазана, который образуется в результате восстановления бесцветного 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида под действием фермента дегидрогеназы. Очень маленький процент мёртвых клеток ЦБ в контрольном варианте (1,0–2,9%) указывает на высокую физиологическую активность тестируемых культур. Поэтому единственной причиной обвального падения жизнеспособности обоих видов ЦБ в опытных вариантах можно считать действие автошампуней, используемых в дозах, применяемых на практике при мойке автомобилей.

Сравнение полученных результатов по вариантам показывает, что наиболее токсичными для ЦБ являются автошампуни Uni и Felix, воздействие которых приводит к гибели от 98,5 до 99,7% клеток. Ингибиторная активность автошампуня Концентрат несколько ниже: в этом варианте гибель клеток *N. paludosum* со-

ставляет 71,8%, а у *F. muscicola* – 94,4%. Для обоих видов ЦБ количество жизнеспособных клеток, которые подвергались действию автошампуней, увеличивается в ряду: Uni > Felix > Концентрат.

Таким образом, данный метод биотестирования показал, что испытанные автошампуни даже в дозах, рекомендуемых для практического использования, вызывают необратимые изменения в клетках ЦБ *N. paludosum* и *F. muscicola*, которые приводят к гибели абсолютного большинства членов цианобактериальной популяции.

Биотестирование ЛСН с использованием бацилл. Несмотря на то, что бактерии рода *Bacillus* считаются наиболее устойчивыми микроорганизмами по отношению к различным стресс-факторам, внесение ЛСН в питательную среду привело к резкому снижению их численности (табл. 2). Сила угнетающего эффекта ЛСН на оба штамма бацилл увеличивалась по мере увеличения концентрации поллютанта: для *B. mesentericus* в 407 раз в варианте 2 р. д. и в 19,6 раз – для *Bacillus* sp. при 0,5 р. д. Полное прекращение роста бацилл наблюдалось при 4 р. д. для *B. mesentericus*. Чувствительность *Bacillus* sp. к данному поллютанту была намного сильнее: полное подавление роста наступало уже при 1 р. д. ЛСН. Таким образом, поддержание в музейной

Таблица 1 / Table 1

Влияние автошампуней на количество жизнеспособных клеток цианобактерий (%)
Car wash influence on the number of viable cells of cyanobacteria (%)

Вид цианобактерий Cyanobacteria species	Вариант Variant			
	Контроль (вода) Control (water)	Uni	Felix	Концентрат Concentrate
<i>Nostoc paludosum</i>	97,1±1,0	0,3±0,02	0,6±0,1	28,2±3,2
<i>Fischerella muscicola</i>	99,0±0,7	0,8±0,1	1,5±0,1	5,6±0,2

Таблица 2 / Table 2

Влияние возрастающих концентраций лаурилсульфат натрия на численность бацилл
Influence of increasing concentration of sodium lauryl sulfate on bacilli number

Вариант Variant	Численность клеток, КОЕ/мл Cells number, colony-forming units/ml	
	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
Контроль / Control	149600±3500	80400±7200
0,25 р. д. / 0.25 rated dose	14300±1900	5500±400
0,5 р. д. / 0.5 rated dose	11000±1200	4100±600
1,0 р. д. / 1.0 rated dose	6300±960	0
2,0 р. д. / 2.0 rated dose	367±57	0
4,0 р. д. / 4.0 rated dose	0	0

Таблица 3 / Table 3

Влияние возрастающих концентраций лаурилсульфат натрия на степень обрастания комочков почвы пойменного и суходольного лугов бактериями рода *Azotobacter* (%) / Influence of increasing concentration of sodium lauryl sulfate on the degree of soil-balls encrusting with bacteria *Azotobacter* (%) in flood plain meadows and upland meadows

Концентрация СПАВ SSAS concentration	Почва пойменного луга Flood plain meadow soil	Почва суходольного луга Upland meadow soil
Контроль / Control	100	100
0,25 р. д. / 0.25 rated dose	40	34
0,5 р. д. / 0.5 rated dose	31	33
1,0 р. д. / 1.0 rated dose	25	26
2, 0 р. д. / 2.0 rated dose	21	25
4,0 р. д. / 4.0 rated dose	19	10

культуре данных штаммов бацилл позволит успешно использовать их как тест-организмы на различные виды СПАВ, в состав которых входит ЛСН.

Биоиндикация с помощью бактерий р. *Azotobacter*. Для изучения интенсивности развития бактерий р. *Azotobacter* под влиянием СПАВ были отобраны образцы почвы пойменного и суходольного лугов. В ходе проведения этого опыта комочки почвы раскладывали на агаризованной среде Эшби (по 50 комочков почвы на чашку Петри в двукратной повторности), в которую предварительно вносили ЛСН в возрастающих концентрациях. О степени ингибирования азотобактера судили по снижению процента обрастания почвенных агрегатов азотобактериальными колониями.

Негативный эффект действия ЛСН по отношению к азотобактеру наблюдался на шестые сутки после постановки опыта (табл. 3). Так, если в контрольном варианте обрастание почвенных комочков составляло 100%, то по мере возрастания концентрации препарата происходило неуклонное снижение этого показателя, достигающего 19% для почвы пойменного луга и 10% – для почвы суходольного луга при 4 р. д. ЛСН.

Таким образом, испытанный метод биоиндикации, основанный на интенсивности развития азотобактера, широко применяемый для диагностики плодородия почвы или токсичности различных поллютантов, приемлем и при испытании ЛСН.

Альгоиндикация. Альгоиндикация – приём, основанный на выявлении и сравнении видового состава загрязнённых и «чистых» почв. Критерием степени нарушения почвенных ценозов является уровень снижения видового разнообразия водорослей и ЦБ.

В модельном опыте определяли видовой состав водорослей и ЦБ в образцах дерново-подзолистой среднесуглинистой почвы, ото-

бранной в городской черте, после внесения в неё ЛСН в возрастающих концентрациях.

Всего было обнаружено 17 видов водорослей и ЦБ, принадлежащих к 4 отделам. Таксономическая структура исследуемой альгофлоры имеет следующий вид: Cyanophyta (Cyanobacteria) – 4 вида (23,5%), Xanthophyta – 1 вид (5,9%), Eustigmatophyta – 2 вида (11,8%), Chlorophyta – 10 видов (58,8%). В альгогруппировках более половины спектра составляют виды отдела Chlorophyta, что указывает на бедность таксономического состава водорослей.

Видовой состав водорослей представлен как широко распространёнными видами, так и видами, характерными для дерново-подзолистых почв, которые, как правило, выступают в качестве доминантов и субдоминантов, определяя в целом облик альгофлоры дерново-подзолистой почвы.

Альгофлора исследуемой почвы включала представителей следующих отделов: Cyanobacteria – *Plectonema boryanum* Gom. f. *boryanum*, *Leptolyngbya foveolarum* Anagn. et Kom., *Leptolyngbya augustissima* (W. et G.S. West) Anagn. et Kom., *Nostoc punctiforme* (Ag.) Elenk.; Chlorophyta – *Chlorococcum infusionum* (Schrank) Menegh., *Chlorococcum hypnosporum* Starr, *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx.) Fott, *Tetracystis aggregate* Brown et Bold, *Chlorella vulgaris* Beijer., *Chlorella minutissima* Fott et Novakova, *Planktosphaeria gelatinosa* G.M. Smith, *Klebsormidium dissectum* (Gay) Ettl et Gärtner, *Stichococcus minor* Näg. s. str. и *Chlorosarcinopsis minor* (Gern.) Herndon; Xanthophyta – *Pleurochloris commutata* Pasch.; Eustigmatophyta – *Vischeria helvetica* Pasch. и *Eustigmatos magnus* (B. Petersen) Hibberd.

Наиболее чувствительными к загрязнению почвы ЛСН оказались представители Xanthophyta и Eustigmatophyta, которые встречались единично.

Наибольшее количество видов водорослей наблюдалось в контрольном варианте и в варианте 0,5 р. д. ЛСН. Далее с увеличением дозы внесения СПАВ количество видов ЦБ и водорослей снижалось (табл. 4).

В целом, характер альгофлоры несёт черты флоры экосистемы в экстремальных условиях. Во всех вариантах преобладали водоросли из отдела Chlorophyta. Вероятно, именно представители данного отдела наиболее адаптированы к ЛСН. Водоросли отдела Eustigmatophyta наблюдались только в контрольном варианте и при внесении 0,5 р. д. ЛСН. В отделе Xanthophyta наблюдалась еще большая чувствительность фототрофов к ЛСН: вид *Pleurochloris commutata* был обнаружен только в контрольном варианте. Нетипична реакция ЦБ, которые не встречаются уже при 2 р. д., хотя известен феномен цианофитизации фототрофных комплексов при загрязнении

почвы другими поллютантами антропогенного и природного происхождения.

Таким образом, и при загрязнении почвы СПАВ можно использовать видовой анализ водорослей и ЦБ в качестве биоиндикационного признака, как и при других видах антропогенного загрязнения почвы, критерием токсичности испытуемых соединений является снижение видового обилия.

Заключение

Проведённые исследования показали допустимость применения широко используемых в биомониторинговой практике методов биотестирования и биоиндикация для оценки степени токсичности определённых СПАВ, в частности, автошампуней.

Так, доказана высокая чувствительность двух видов ЦБ (*N. paludosum* и *Fischerella mus-*

Таблица 4 / Table 4

Влияние внесения возрастающих концентраций лаурилсульфат натрия (в расчётных дозах – р. д.) на видовой состав фототрофной микрофлоры / Influence of input of increasing sodium lauryl sulfate concentrations (in rated doses) on specious composition of phototroph microflora

Группы фототрофов Phototroph groups	Число видов по вариантам Species number in variants				
	Контроль Control	0,5 р.д. 0.5 rated dose	1,0 р. д. 1.0 rated dose	2 р. д. 2 rated dose	4 р. д. 4 rated dose
Cyanobacteria					
<i>Leptolyngbya angustissima</i>	–	+	–	–	–
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	+	–	–	–	–
<i>Nostoc punctiforme</i>	–	+	–	–	–
<i>Plectonema boryanum</i>	+	–	+	–	–
Chlorophyta					
<i>Chlorella minutissima</i>	–	+	–	–	+
<i>Chlorella vulgaris</i>	–	–	+	+	–
<i>Chlorococcum hypnosporum</i>	–	–	–	–	+
<i>Chlorococcum infusionum</i>	+	+	+	+	+
<i>Chlorosarcinopsis minor</i>	–	+	–	–	–
<i>Klebsormidium dissectum</i>	–	+	–	–	–
<i>Planktosphaeria gelatinosa</i>	–	–	–	–	+
<i>Pseudococcomyxa simplex</i>	+	+	–	–	+
<i>Stichococcus minor</i>	–	–	+	–	–
<i>Tetracystis aggregata</i>	+	–	+	–	–
Xanthophyta					
<i>Pleurochloris commutata</i>	+	–	–	–	–
Eustigmatophyta					
<i>Eustigmatos magna</i>	+	+	–	–	–
<i>Vischeria helvetica</i>	+	+	–	–	–
Всего/Total:	8	9	4	2	5

Примечание: Прочерк означает отсутствие вида.
Note: A strikethrough means absence of the species.

cicola) как тест-организмов по определению их гидрогеназной активности тетразольно-топографическим методом с использованием в качестве маркерного признака наличие формазана в живых клетках ЦБ, накопление которого резко снижается под влиянием автошампуней марок Концентрат, Felix и Uni.

Показана возможность тестирования степени токсичности ЛСН с помощью бактерий р. *Bacillus*, резко снижающих свою численность даже при минимальных концентрациях препарата.

Установлено также, что в качестве биоиндикационных признаков на присутствие в среде испытанных СПАВ можно использовать такие показатели, как снижение видового обилия водорослей и ЦБ в почве и снижение процента обрастания комочков почвы бактериями р. *Azotobacter*

Полученные результаты по негативному воздействию испытуемых СПАВ на микроорганизмы разной систематической принадлежности доказывают необходимость очень аккуратного обращения с автошампунями на автомойках и при индивидуальном использовании, чтобы исключить возможность их попадания в почву и предотвратить дополнительный экологический стресс на почвенные микробиомы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Вятского государственного университета «Механизмы адаптации и устойчивости почвенной микробиоты к техногенному воздействию» № 5.4962.2017/Б4.

References

- Ostroumov S.A. Proving the crucial role of the biota in improving water quality // *Water: Technology and Ecology*. 2010. No. 1. P. 32–62.
- Sirisattha S., Momose Y., Kitagawa E., Iwahasi H. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis // *Water Research*. 2004. No. 38. P. 61–70.
- Želimira P., Vidaković-Cifrek Z., Puntarić D.V. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum* // *Chemosphere*. 2005. V. 61. No. 8. P. 1061–1068.
- Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewater // *Environment International*. 2008. V. 34. P. 1033–1049.
- Markina Zh.V., Aizdaicher N.A. The Influence of the detergent ARIEL on growth and physiological state of unicellular algae // *Gidrobiologicheskii zhurnal*. 2009. T. 45. No. 6. P. 52–60 (in Russian).
- Masakoralá K., Turner A., Brown M.T. Toxicity of synthetic surfactant to the marine macroalga *Ulva lactuca* // *Water, Air, Soil Pollut.* 2011. V. 218. P. 283–291.
- Ulloa G., Coutens C., Sánchez M., Sineiro J., Fábregas J., Deive F.J., Rodríguez A., Núñez M.J. On the double role of surfactants as microalgae cell lysis agents and antioxidants // *Green Chemistry*. 2012. No. 4. P. 1044–1051.
- Domracheva L.I., Simakova V.S. Reactions of pro- and eukaryotic microorganisms to the action of synthetic surfactants (review) // *Theoretical and Applied Ecology*. 2018. No. 1. P. 5–17 (in Russian).
- Domracheva L.I., Kondakova L.V., Ashikhmina T.Ya., Ogorodnikova S.Yu., Olkova A.S., Fokina A.I. Using the tetrazolium-topographical method in determining cyanobacteria dehydrogenase activity in polluted environments // *Theoretical and Applied Ecology*. 2008. No. 2. P. 23–28 (in Russian).
- Zenova G.M., Stepanov A.L., Likhacheva A.A., Manucharova N.A. *Practical Soil Biology*. Moskva: Izd-vo MGU, 2002. 120 p. (in Russian).