

УДК 579.6.69:633.64

Васильєва Н. Ю., інж., **Панченко М. М.**, канд. біол. наук,**Васильєва Т. В.**, канд. біол. наук,**Іваниця В. О.**, професор, д-р. біол. наук, зав. кафедрою,Одеський національний університет, кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

КОМПЛЕКСНИЙ МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ПРИРОДНИХ ВОД ПОЛІГОНА “БАЛАЙ”

Вивчено якість природних вод полігона “Балай” із використанням мікробіологічних методів біоіндикації і біотестування. Визначені чисельність і співвідношення авто-, алохтонних і амоніфікуючих бактерій. З’ясовано токсичність і мутагенну активність природних вод із застосуванням мутантного штаму *Salmonella typhimurium* TA 100 і модифікованого тесту Еймса. Робота проведена в рамках виконання комплексного агроекологічного моніторингу на полігоні “Балай”.

Ключові слова: біотестування, біоіндикація, полігон, природні води

Обмежити надходження в гідросферу біологічно небезпечних речовин можливо за умови достовірної і максимально повної інформації про якість і склад природних і промислових вод. Стандартною і загальноприйнятною є система контролю, основана на диференційному визначенні вмісту забруднюючих речовин і співставленні цього показника з гранично допустимими нормативами. Однак реальна природоохоронна значимість цієї форми моніторингу малоефективна. Інтегральні методи контролю біоіндикація і біотестування, які давно і широко використовуються у світовій практиці екологічного моніторингу, — дають можливість оцінити якість води відносно біологічних систем.

У роботі наведено результати комплексного мікробіологічного контролю природних вод полігона “Балай”, проведеного в рамках виконання пілот-проекту агроекологічного моніторингу.

Метою нашої роботи було дослідження сучасного стану природних вод полігона “Балай” за допомогою мікробіологічних методів біоіндикації та біотестування.

Матеріали і методи

Об’єктами вивчення були поверхневі і ґрунтові води полігона “Балай”, розташованого в басейні Тилігульського лиману, у долині річки Балай. Вивчення якості природних вод проведено із застосуванням мікробіологічних методів біоіндикації і біотестування. При проведенні біоіндикації як об’єкти-монітори використані домінуючі в досліджуваних водних джерелах групи гетеротрофних бактерій. Чисельність авто-, алохтонних і амоніфікуючих бактерій визначали за допомогою стандартних мікробіологічних методик [1].

Тест-об’єктом при біотестуванні слугував мутантний штам *Salmonella typhimurium* TA 100, дефектний за гістидиновим і біотиновим оперонами і внас-

лідок цього — нездатний до самостійного розмноження поза лабораторними умовами. Делеція *gal bio uvrB* призводить до додаткових порушень систем ексцизійної репарації, підвищення проникності клітинної стінки бактерій. Плазміда рКМ 101 забезпечує стійкість до ампіциліну і підвищує частоту спонтанного та індукованого мутагенезу. Використання зазначеного штаму дозволяє реєструвати токсичні ефекти і виявляти мутації типу заміни пар основ [2, 3].

Методичною основою біотестування токсичності і мутагенності була уніфікована мікробіологічна методика [4, 5], суть якої полягає в попередньому короткочасному (4-6 годин) культивуванні клітин тест-бактерій у рідких сольових середовищах [5] із додаванням випробуваних агентів (дослід) і без них (контроль). В повноцінному середовищі (МПА) усі життєздатні клітини сальмонели формують колонії; в селективному середовищі (САС) колонії утворюють клітини бактерій, які відновлюють в результаті зворотних генних мутацій спроможність синтезувати гістидин [4, 5]. Про токсичність робили висновок за зменшенням числа життєздатних клітин (%) у досліді в порівнянні з контролем; поява His⁺-ревертантів свідчила про наявність мутагенної активності.

У таблиці 1 наведено перелік тестованих водних об'єктів полігона "Балай", результати оцінки токсичних і мутагенних характеристик досліджуваних проб.

Таблиця 1

Токсичність і мутагенність проб природної води полігона "Балай"

Територіальне розташування	Водний об'єкт	Токсичність (чисельність життєздатних клітин, %)	Мутагенна активність (відн. од. *)
0,8 км на південь від с. Петрівка	Русло р. Копанки	96,0	1,1
1,0 км на схід від с. Ониськово, біля водосх. № 9	джерело	4,0	7,4
Східна околиця с. Черногорка	водосх. № 4	20,0	5,3
1,0 км на схід від с. Ониськово	водосх. № 9	28,0	2,1
Східна околиця с. Ониськово	водосх. № 10	30,0	1,5
Північна околиця с. Ставкове	водосх. № 27	31,0	23,4
Південна околиця с. Нейкове	водосх. № 19	46,0	1,0
с. Балайчук	артсвердловина	64,0	1,4
Околиця с. Новомиколаївка	криниця у поймі р. Балай	70,0	5,3
с. Чигирин	криниця	6,0	3,6

Примітка: * — за одиницю прийняті значення спонтанного рівня мутацій.

Результати досліджень оброблено статистично за стандартним методом [5].

Результати досліджень

Досліджувані природні води характеризувалися властивими слаболужні значення рН у межах 8,3-9,5, низькі концентрації нітратів і амонійного азоту. Концентрація нітритів складала 0,576-0,153 мг/л при допустимому рівні — 0,02 мг/л. Вміст фенолу перевищував допустимий рівень на 1-2 порядки; концентрація нафтопродуктів відповідала нормативним вимогам або дещо перевищувала їх. Концентрації міді, цинку і заліза в поверхневих водах полігона “Балай” значно перевищували допустимий рівень. Вміст марганцю і кобальту в зазначених водних джерелах був у допустимих межах, і лише в річці Копанка він досягав 1,226 і 0,108 мг/л при нормі 0,05 і 0,01 мг/л [6]. На підставі хімічного аналізу досліджувані природні води полігона “Балай”, як поверхневі, так і ґрунтові, не можна віднести до категорії чистих [6, 7]. Крім того, з огляду на територіальне розташування водних джерел ймовірно, що їхнє забруднення є наслідком побутових, а не промислових причин.

Природні води полігона “Балай” мали токсичну дію і призводили до зниження чисельності життєздатних клітин *Salmonella typhimurium* ТА 100. Проби води з водосховищ № 4 (с. Черногірка), № 9 (с. Ониськово), № 10 (с. Ониськово) і № 19 (с. Нейково) призводили до зниження числа клітин бактерій, здатних до росту й утворення колоній на МПА (табл. 1). За тестування проб води джерела с. Ониськово відзначали практично повну загибель клітин *Salmonella typhimurium* ТА 100. В протилежність цьому вода річки Копанка (с. Петрівка) токсичної дії не виявляла.

Ґрунтові води з колодязів, розташованих у селах Новомиколаївка і Чигирин, та вода з артсвердловини знижували чисельність життєздатних клітин штаму тест-об’єкта на 30,0, 94,0 і 36,0 % відповідно (табл. 1).

На фоні вираженої токсичної дії природні води індукують мутації типу заміни пар основ [2, 3] у бактеріальній тест-системі *Salmonella typhimurium* ТА 100. У наших дослідах спостерігалось збільшення числа колоній, сформованих His⁺-мутантами тест-об’єкта, в 5,3; 2,1; 1,5 і 23,4 рази відповідно за випробування поверхневих вод із водосховищ № 4 (с. Черногірка), № 9 і № 10 (с. Ониськово) та № 27 (с. Ставкове). Вода із джерела (с. Ониськово) індукувала збільшення виходу His⁺ревертантів сальмонели в 7,4 рази (табл. 1). Мутагенна активність ґрунтових вод колодязів і артсвердловини в 5,3, 3,6 і 1,4 рази перевищувала спонтанний рівень мутацій (табл. 1).

Чисельність гетеротрофних бактерій слугує стандартним показником якісного стану природних водойм. Результати визначення кількості гетеротрофних мікроорганізмів — алохтонних, автохтонних і амоніфікуючих — тих, що живуть у природних водоймах полігона “Балай”, наведені у таблиці 2.

Чисельність і співвідношення алохтонних і автохтонних бактерій природних вод полігона “Балай” варіювали в широких межах і не залежали від водного джерела. Так, у поверхневих водах річки Копанка (с. Петрівка) і джерела (с. Ониськово) чисельність автохтонних бактерій практично в 2 рази перевищувала кількість алохтонної мікробіоти: $2,0 \pm 0,45 \times 10^4$ і $4,6 \pm 0,80 \times 10^4$ КУО/мл відповідно (табл. 2). Чисельність автохтонних бактерій у поверхневих водах, відібраних із водосховищ, або дорівнювала кількості алохтонних мікроорганізмів, або була в 22,5 рази меншою (табл. 2). Подібні результати одержані при біоіндикації ґрунтових вод, отриманих із колодязів та артсвердловини. Певних закономірностей у

розподілі чисельності амоніфікуючих бактерій, ізольованих із проб води досліджуваних водних джерел не було виявлено (табл. 2), однак показники чисельності виділених бактерій дозволяють віднести водосховища, які досліджувались, до груп α -мезо- і β -полісапробних за рівнем забруднення.

Таблиця 2

Чисельність гетеротрофних бактерій природних водойм полігону “Балай”

Місце добору проб води	Чисельність бактерій (КОУ/мл*) та рівень сапробності водного джерела			
	Алохтонні бактерії	Автохтонні бактерії	Амоніфікуючі бактерії	Рівень сапробності
С. Черногорка	$1,6 \pm 0,40 \times 10^4$	$1,5 \pm 0,25 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,22 \times 10^5$	брудні, β -полісапробні
С. Ониськово (водосх. № 9)	$2,9 \pm 0,28 \times 10^4$	$1,6 \pm 0,31 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,22 \times 10^3$	брудні, β -полісапробні
С. Ониськово (водосх. № 10)	$2,5 \pm 0,11 \times 10^4$	$2,6 \pm 0,38 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,22 \times 10^4$	брудні, β -полісапробні
С. Ониськово (джерело)	$2,5 \pm 0,35 \times 10^4$	$4,6 \pm 0,80 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,22 \times 10^3$	брудні, β -полісапробні
С. Ставкове	$4,2 \pm 0,58 \times 10^4$	$7,4 \pm 0,82 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,22 \times 10^5$	брудні, β -полісапробні
С. Нейково	$1,5 \pm 0,21 \times 10^4$	$1,7 \pm 0,12 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,22 \times 10^4$	брудні, β -полісапробні
С. Петрівка	$0,9 \pm 0,11 \times 10^4$	$2,0 \pm 0,45 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,22 \times 10^5$	дуже забруднені, α -мезосапробні

Примітка: * КОУ/мл — колоній утворюючі одиниці в 1,0 мілілітрі.

Аналіз результатів

Відповідно до нормативних вимог [7], кількість гетеротрофних бактерій у ґрунтових водах не повинна перевищувати 500,0 кл/мл, що властиве “чистим” — “дуже і цілком чистим”, або β -олігосапробним водам. Ґрунтові води з артсвердловини і колодязів, розташованих у с. Чигирин і с. Новомиколаївка, за чисельністю гетеротрофних бактерій можна віднести до категорії “брудних” — β -полісапробних і α -мезосапробних [7].

Кількісне співвідношення автохтонної і алохтонної мікробіоти у воді досліджуваних водойм вказує на порушення природних процесів самоочищення і початок евтрофікації в поверхневих водах водосховищ.

Порівняльний аналіз результатів біотестування за генотоксичними показниками свідчить про те, що поверхневі і ґрунтові води полігону “Балай” мали виражену токсичну дію на клітини сальмонели і призводили до загибелі 50,0 і більше % клітин тест-об’єкта. На фоні сильної токсичної дії мутагенна активність також була досить високою. Мінімальний кількісний рівень мутагенного потенціалу зареєстрований для води річки Копанка; більш значна мутагенна активність відзначена для води водосховищ і ґрунтових вод.

Аналіз одержаних результатів дає змогу оцінити їх залежність від розташування точок відбору проб води на полігоні “Балай”. Так, близькі за значенням показники чисельності основних груп гетеротрофних бактерій, токсичності і мутагенної активності води із водосховищ № 9 і № 10 можна пояснити сусіднім їх розташуванням і можливим природним водообміном. Сильна токсичність і високий мутагенний потенціал води з джерела (с. Ониськово) і колодязя (с. Новомиколаївка) можуть бути наслідком близькості пунктів складування хімічних добрив і пально-мастильних матеріалів.

Статистичне опрацювання одержаних результатів, зроблене на основі методу розрахунку коефіцієнта нелінійної кореляції, її помилки та показника достовірності за t-критерієм Ст'юдента [8], свідчить про наявність нелінійної кореляційної залежності між вмістом у вивчених водах різних форм азоту (нітритного, нітратного, амонійного) і чисельністю амоніфікуючих бактерій ($p < 0,1$). Чисельність автохтонних гетеротрофних бактерій залежала від вмісту амонійного азоту і мінерального фосфору. Зазначені хімічні сполуки з достовірністю $p < 0,05$ обумовлювали токсичність проб природних вод. Рівень мутагенної активності та вміст у природних водах нітритного і нітратного азоту з рівнем достовірності $p < 0,1$ корелюють між собою з нелінійним характером зв'язку. З важких металів, що присутні у природних водоймах, максимальний вплив на генотоксичні показники мав вміст Fe^{2+} (при коефіцієнті кореляції 0,7).

Дані біологічного контролю свідчать про те, що досліджувані природні води знаходяться в умовах серйозного антропогенного тиску.

З огляду на небезпеку забруднення природних водойм біологічно активними (генотоксичними) сполуками вважаємо за необхідне поширити моніторинг мутагенного забруднення на ґрунти і зразки сільськогосподарської продукції.

Література

1. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии* / Под ред. Н. С. Егорова. — М.: Изд-во МГУ, 1983. — 220 с.
2. Ames B. N. The detection of chemical mutagens with bacteria // *Chemical mutagens. Principles and Methods for their detection.* — New York Plenus Press. — 1971. — V. 1. — P. 267-282.
3. Ames B. N., McCann J. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella // *Mutat. Res.* — 1975. — № 31. — P. 347-364.
4. Васильева Т. В., Панченко Н. И., Васильева Н. Ю. Методика комплексной оценки на токсичность и мутагенность индивидуальных химических веществ и объектов окружающей среды — воды, донных отложений и почвы в бактериальной (*Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100) и водорослевой (*Chlorella vulgaris* A) тест-системах // Сб. научн. трудов “Технические и системные средства экологического мониторинга”. — Киев: НАНУ, Ин-т кибернетики, 1999. — С. 76-84.
5. Панченко Н. Н., Кияницкая М. А. Выявление генотоксического действия приоритетных загрязнителей и культур бактерий на микробных системах // *Методические основы комплексного экологического мониторинга океана* / Под ред. Цыбань А. В. — М.: Моск. отд. гидрометеоздата, 1988. — С. 146-148.
6. *Обобщенный перечень предельно-допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно-безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов.* — М.: ВНИРО, 1990. — 48 с.
7. Жукинский В. Н., Оксьюк О. П., Алейник Г. Н. Принципы и опыт построения экологической классификации и качества поверхностных вод // *Гидробиологический журнал.* — 1981. — Т. 17, № 2. — С. 38-49.
8. Иванов Ю. И., Погорелюк О. Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. — М.: Медицина, 1990. — С. 91-95.

Васильева Н. Ю., Панченко Н. Н., Васильева Т. В., Иваниця В. А.

Одесский национальный университет, кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**КОМПЛЕКСНЫЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ
ПРИРОДНЫХ ВОД ПОЛИГОНА “БАЛАЙ”**

Резюме

Изучено качество природных вод полигона “Балай” с использованием микробиологических методов биоиндикации и биотестирования. Определены численность и соотношение авто-, аллохтонных и аммонифицирующих бактерий. Изучены токсичность и мутагенная активность природных вод с использованием мутантного штамма *Salmonella typhimurium* TA 100 и модифицированного теста Эймса. Работа проведена в рамках выполнения комплексного проекта агроэкологического мониторинга на полигоне “Балай”.

Ключевые слова: биотестирование, биоиндикация, полигон, природные воды.

Vasyljeva N. J., Panchenco N. N., Vasyljeva T. V., Ivanitsa V. A.

Odessa National University, Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**COMPLEX AGROBIOLOGICAL MONITORING
OF NATURAL WATER OF THE AREA “BALAY”**

Summary

The quality of natural water of “Balay” area have been studied by using microbiological methods. The number and correlation between allochtonic, autochtonic and ammonifying bacteria have been determined. Toxic and mutagenic activity of the natural water was studied with the help of mutant strain *Salmonella typhimurium* TA 100 and modified Ames method. The work was done within the frame of the complex project of agrobiological monitoring at the area “Balay”.

Key words: biotesting, bioindicating, area, natural water.