

УДК 576.851.315

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ ЦИНКА И МЕДИ МЕТОДОМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Абдураманова Э.Р., Федотова А.А., Кацев А.М.

*Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского
E-mail: e.r.abduramanova@mail.ru*

В работе использованы морские светящиеся бактерии *Vibrio fischeri* F1, *Vibrio harveyi* Ms1, *Photobacterium phosphoreum* F2 и *Photobacterium leiognathi* Sh1. Установлено, что наиболее чувствительным штаммом бактерий к ионам меди (II) и цинка является штамм *P. phosphoreum* F2. Сравнительное изучение действия ионов металлов на биолюминесценцию различных штаммов фотобактерий показало, что максимальной воспроизводимостью результатов измерений характеризуется штамм *V. harveyi* Ms1. Погрешность измерений всего диапазона определяемых концентраций анализируемых веществ находится в пределах $2 \div 20\%$. Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о возможности использования биолюминесцентного метода в аналитических целях при строгом соблюдении алгоритма проведения анализа.

Ключевые слова: биотестирование, биолюминесцентный анализ, аналитические характеристики.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для анализа биоцидности (токсичности) широко применяют биотестирование. Для качественного и количественного определения токсических веществ используют инструментальные методы. В последнем случае о токсичности судят по превышению предельно допустимых концентраций токсикантов. Среди существующих биотестов особое место занимают морские светящиеся бактерии, которые сочетают в себе преимущества биотеста и инструментальных способов регистрации аналитического сигнала. В этом биотесте токсичность определяется по изменению интенсивности биолюминесценции, которая является количественным показателем жизнедеятельности бактериальной клетки и дает возможность оценить интегральное влияние среды на живой организм [1, 2].

Цель работы состояла в изучении аналитических характеристик биолюминесцентного метода биотестирования при количественном определении ионов тяжелых металлов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали морские светящиеся бактерии *Vibrio fischeri* F1, *Vibrio harveyi* Ms1 и *Photobacterium phosphoreum* F2, выделенные из Черного моря, а также бактерии *Photobacterium leiognathi* Sh1 - из Азовского моря [3]. Объектами исследования также были соли тяжелых металлов: хлориды цинка и меди (II), которые использовали в качестве модельных токсических веществ. Биотестирование проводили по методике определения острой токсичности, при комнатной температуре, в течение 15 минут с регистрацией интенсивности биолюминесценции с помощью биолюминометра БЛМ 8801, СКТБ «Наука», Россия [4]. Все исследования повторялись шестикратно, а результаты анализа представляли в виде эффективных концентраций солей, ингибирующих биолюминесценцию на определенное значение. Полученные результаты статистически обрабатывали с 95% доверительной вероятностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенностью используемого метода, является сочетание биотестирования с инструментальным способом регистрации аналитического сигнала. Светящиеся бактерии сами по себе являются чувствительными индикаторами на различные вещества с токсическими, поверхностно-активными, антибактериальными и другими свойствами, реагируя изменением интенсивности биолюминесценции на различные воздействия [5-7]. Регистрация же излучений в видимой области спектра в настоящее время хорошо разработана и производится с высокой чувствительностью и точностью, что широко используется в различных областях химии и биологии [2]. В связи с этим, возникает возможность использовать этот биотест не только для оценки биологического действия, но и как универсальный аналитический метод количественного анализа. В качестве анализируемых веществ были выбраны две соли тяжелых металлов (CuCl_2 ZnCl_2), которые одновременно являются международными стандартами при работе со светящимися бактериями [4, 8].

Для определения аналитических характеристик биотеста использовали методику биолюминесцентного анализа на острую токсичность [4], по которой были определены эффективные концентрации токсического фактора. Результаты выражали в процентах от контрольных значений, по которым строили калибровочные графики зависимости интенсивности биолюминесценции (I) от концентрации образца (C) (рис. 1). Кривые имели двухфазный характер, который заключался в резком спаде биолюминесценции бактерий в интервале концентраций ингибитора от 0 до 5 – 20 мкг/мл в зависимости от штамма, и медленном - при дальнейшем возрастании концентрации тяжелых металлов. Средний коэффициент аппроксимации линейных участков калибровочных кривых ионов меди (II) и цинка с участием всех рассматриваемых штаммов бактерий (1 фаза кривой) составлял 0,95.

С использованием полученных калибровочных графиков определяли основные аналитические характеристики метода: пределы обнаружения, интервалы определяемых концентраций, воспроизводимость и точность измерений.

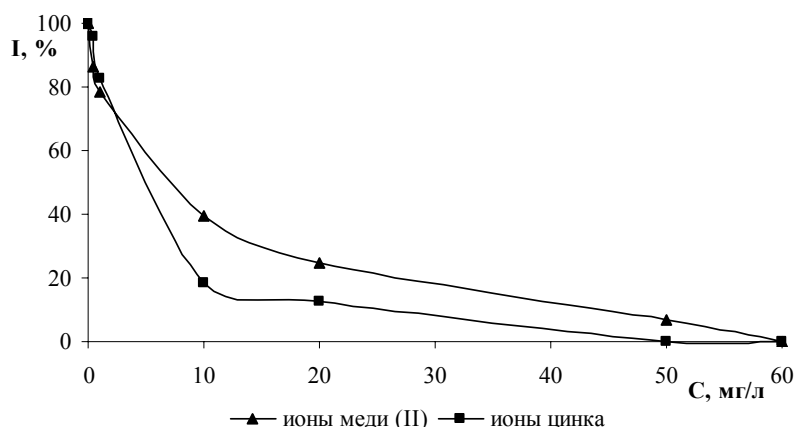


Рис. 1. Калибровочные графики зависимости интенсивности свечения бактерий *V. harveyi* Ms1 от концентрации ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} .

Результаты статистической обработки регистрируемых сигналов снижения интенсивности бактериального свечения, вызванного введением определенного количества токсического вещества, представлены в Таблице 1.

Таблица 1.
Статистические параметры данных калибровочных графиков

Cu^{2+}											
<i>V. fischeri</i> F1			<i>P. phosphoreum</i> F2			<i>V. harveyi</i> Ms1			<i>P. leiognathi</i> Sh1		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C, мг/л	I, %	Δ , %	C, мг/л	I, %	Δ , %	C, мг/л	I, %	Δ , %	C, мг/л	I, %	Δ , %
0,10	93	5,5	0,05	92	5,9	0,50	86	7,9	0,50	95	4,3
0,30	82	8,7	0,10	85	7,3	1,00	79	11,4	1,00	91	6,3
1,00	62	15,6	1,00	55	6,5	10,00	39	15,4	20,00	30	17,1
5,00	13	65,5	5,00	33	27,3	20,00	25	37,3	30,00	19	55,4
10,00	6	78,2	40,00	5	68,7	50,00	7	75,6	50,00	9	78,8
Zn^{2+}											
<i>V. fischeri</i> F1			<i>P. phosphoreum</i> F2			<i>V. harveyi</i> Ms1			<i>P. leiognathi</i> Sh1		
C, мг/л	I, %	Δ , %	C, мг/л	I, %	Δ , %	C, мг/л	I, %	Δ , %	C, мг/л	I, %	Δ , %
0,50	96	3,4	0,1	93	2,7	0,50	96	20,7	0,50	95	4,4
1,00	90	4,5	0,5	71	9,7	1,00	82	14,1	5,00	56	11,6
10,00	53	10,8	1,00	63	24,3	5,00	33	8,8	10,00	32	17,0
20,00	40	22,5	20,00	6	43,5	10,00	19	82,4	20,00	14	47,8
70,00	4	61,7	30,00	5	81,5	40,00	4	113,1	40,00	4	71,8

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ ЦИНКА И МЕДИ

Обнаружено повышение значений относительных ошибок измерений аналитического сигнала, отвечающего концентрации токсического фактора, находящейся в пределах второй фазы калибровочной кривой, которая характеризуется медленным снижением биолюминесценции (рис. 1). Максимальная воспроизводимость результатов характерна для линейных участков кривых, ограниченных в случае использования штаммов бактерий *V. fischeri* F1 и *P. phosphoreum* F2 50% - ным, а в случае *V. harveyi* Ms1 и *P. leiognathi* Sh1 - 70 % - ным ингибированием биолюминесценции бактерий, относительные ошибки измерений которых не превышают 20%.

Критерием нижнего предела обнаружения анализируемых ионов металлов являлось стабильное снижение интенсивности сигнала, значение которого при использовании предложенных штаммов варьировало от 96% до 82% при вероятности (p) в пределах от 0,01 до 0,07. Верхний концентрационный предел ограничивался наименьшим сигналом 7%, отличным от нуля ($p < 0,05$). Данные показатели и лимитировали интервал определяемых концентраций (табл. 2), хотя верхний предел обнаружения может быть в значительной степени повышен за счет простого разведения проб.

Таблица 2.

Интервал определяемых концентраций

Бактерии	С, мг/л	
	Cu ²⁺	Zn ²⁺
<i>V. fischeri</i> F1	0,10 ÷ 10	0,50 ÷ 70
<i>P. phosphoreum</i> F2	0,05 ÷ 40	0,10 ÷ 30
<i>V. harveyi</i> Ms1	0,50 ÷ 50	1,00 ÷ 40
<i>P. leiognathi</i> Sh1	0,50 ÷ 50	0,50 ÷ 40

Биотестирование с различными видами светящихся бактерий показало, что наиболее чувствительным к ионам меди (II) и цинка является штамм *P. phosphoreum* F2, для которого нижние пределы их обнаружения составляют соответственно 0,05 мг/л и 0,1 мг/л, а интервал определяемых концентраций находится в пределах от 0,05 мг/л до 40 мг/л для ионов меди (II) и от 0,1 мг/л до 30 мг/л для ионов цинка.

Аналитические характеристики унифицированных методов определения ионов меди (II) (полярография, колориметрия) и цинка (титриметрия) в воде, выбранных исходя из величин их предельно допустимых концентраций (ПДК), имеют следующие значения: нижние пределы обнаружения ионов меди (II) и цинка составляют соответственно от 0,01 до 0,05 мг/л (в зависимости от выбранного метода) и 0,5 мг/л, а верхние соответственно – 5 мг/л и 10 мг/л [9, 10]. Сравнительный анализ представленных данных показал, что разница в величинах значений нижнего предела обнаружений рассматриваемых ионов металлов для стандартных методов и предлагаемого не превышает 5 единиц, а интервал определяемых концентраций в биолюминесцентном методе значительно расширяется, в частности, в случае ионов меди (II) в 10 раз.

Дальнейшие исследования были связаны с определением значений эффективных действующих концентраций анализируемых ионов металлов, ингибирующей бактериальную биолюминесценцию на 50% (ЭК₅₀), и являющихся критерием их токсичности. Величина ЭК₅₀ находилась по калибровочному графику. Средние значения показателя ЭК₅₀ (X, мг/л), дисперсия (S²), среднее квадратичное отклонение (S), минимальные (Min, мг/л) и максимальные (Max, мг/л) значения ЭК₅₀, абсолютные (ε, мг/л) и относительные (Δ, %) ошибки измерений представлены в Таблице 3.

Таблица 3.

Статистические характеристики значений ЭК₅₀

Проба	Штамм бактерий	X	S ²	S	Max	Min	ε	Δ, %
Cu ²⁺	<i>V. fischeri</i> F1	1,8	0,35	0,59	2,3	1,0	0,6	32
	<i>P. phosphoreum</i> F2	1,9	0,41	0,64	2,4	1,0	0,6	33
	<i>V. harveyi</i> Ms1	7,2	0,58	0,76	8,0	6,5	0,9	12
	<i>P. leiognathi</i> Sh1	10,3	4,33	2,08	12	8,0	2,4	23
Zn ²⁺	<i>V. fischeri</i> F1	4,5	2,49	1,58	6,2	2,4	1,6	35
	<i>P. phosphoreum</i> F2	3,2	1,01	1,01	4,0	2,0	1,4	45
	<i>V. harveyi</i> Ms1	3,5	0,01	0,10	3,6	3,4	0,1	3
	<i>P. leiognathi</i> Sh1	6,0	1,59	1,26	7,5	4,3	1,1	19

Данные статистической обработки величин ЭК₅₀ свидетельствуют о хорошей воспроизводимости результатов анализа на основе штамма *V. harveyi* Ms1, для которого значения ЭК₅₀ ионов меди (II) и цинка и относительные ошибки их измерений соответственно равны 7,2 мг/л ± 12% и 3,5 мг/л ± 3%.

Для оценки погрешности биотестирования с использованием светящихся бактерий, как метода количественного анализа, был проведен эксперимент «Внес-определил». Результаты исследования на примере тест-культуры *P. leiognathi* Sh1 с использованием раствора хлорида цинка отражены в Таблице 4.

Таблица 4.

Оценка точности анализа

Внес, мг/л	Определил, мг/л	Относительная погрешность, %
5,00	5,33	±7
6,00	6,17	±3
7,00	6,86	±2
8,00	8,44	±5
10,00	12,00	±20

Согласно экспериментальным данным точность измерений всего диапазона измеряемых концентраций анализируемых веществ, которая характеризуется величиной относительной погрешности, находится в пределах 2 ÷ 20%. Высокий

показатель точности характерен для интервала концентраций, ограничивающих первую фазу калибровочных кривых, а максимальные отклонения результатов анализа от истинных значений имеют место в случае концентраций, отвечающих второй фазе калибровочных кривых.

ВЫВОД

Проведение билюминесцентного анализа требует строгого соблюдения алгоритма экспериментальной работы, так как на чувствительность, точность и воспроизводимость результатов биотестирования посредством бактериальной билюминесценции оказывает влияние множество факторов: процедура анализа, подготовка бактерий, период пробоподготовки, состав используемых реагентов и т.д. [9, 11]. Учет этих факторов позволит повысить перспективность использования тест-системы на основе фотобактерий в аналитических целях.

Список литературы

1. Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria /S. Girotti, L. Bolelli, A. Roda [et al] // Anal. Chim. Acta. - 2002. - V. 471. - P. 113–120.
2. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E.N. Ferri, M.G. Fumo [et al] // Ibid. - 2008. - V. 608. - P. 2–29.
3. Кацев А.М. Идентификация светящихся бактерий, выделенных из Черного и Азовского морей / А.М. Кацев, Дж. Макемсон // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». - 2006. - Т. 19(58), № 4. - С. 111–116.
4. Microtox® bioassay *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 // Ocean Sci. J. - 2005. - V. 40, № 2. - P. 91–100.
5. Sikkema J. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons / J. Sikkema, J. de Bont, B. Poolman // Microbiological reviews. - 1995. - Vol. 59, № 2. - P. 201–222.
6. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox chronic toxicity test / Hsieh Chi-Ying, Tsai Meng-Hsiun, Ryan David K.[et al] // The Science of the Total Environment. - 2004. - V. 320. - P. 37–50.
7. Sarter S. Chemiluminescent and bioluminescent assays as innovative prospects for mycotoxin determination in food and feed / S. Sarter, N. Zakhia // Luminescence. - 2004. - № 19. - P. 345–351.
8. Victor L.K. Jennings. Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems / Jennings Victor L.K., M.H. Rayner-Brandes, D.J. Bird // Wat. Res. - 2001. - V. 35, № 14. - P. 3448–3456.
9. Дмитриев М.Т. Санитарно-химический анализ загрязняющих веществ в окружающей среде / Дмитриев М.Т., Казнина Н.И., Пинигина И.А. - Справ. изд. - М.: Химия, 1989. - 368 с.
10. Унифицированные методы анализа вод. / [под общей ред. Ю.Ю. Лурье]. - М.: Химия, 1971. - 375 с.
11. Interlaboratory study of the bioluminescence inhibition tests for rapid wastewater toxicity assessment / M. Farre, F Arranz., J. Ribo [et al] // Talanta. - 2004. - V. 62. - P. 549–558.

Абдураманова Е.Р. Кількісне визначення іонів цинку і купруму методом біолюмінесцентного аналізу / Е.Р. Абдураманова, А.О. Федотова, А.М. Кацев // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. - 2010. - Т. 23 (62). - № 2. - С. 218-224.

У роботі використані морські бактерії, що світяться, *Vibrio fischeri* F1, *Vibrio harveyi* Ms1, *Photobacterium phosphoreum* F2 і *Photobacterium leiognathi* Sh1. Встановлено, що найбільш чутливим штамом бактерій до іонів купруму (II) і цинку є штам *P. phosphoreum* F2. Порівняльне вивчення дії іонів металів на біолюмінесценцію різних штамів фотобактерій показало, що максимальною відтворюваністю результатів вимірювань характеризується штам *V. harveyi* Ms1. Погрішність вимірювань всього діапазону визначуваних

концентрації аналізованих речовин знаходиться в межах $2 \div 20\%$. Отримані в ході дослідження результати свідчать про необхідність дотримання строгого алгоритму при проведенні біоломінесцентного аналізу, який може бути використаний в аналітичних цілях.

Ключові слова: біотестування, біоломінесцентний аналіз, аналітичні характеристики.

Abduramanova E.R. Quantitative determination of zinc and copper (II) ions by the method of bioluminescent analysis / E.R. Abduramanova, A.O. Fedotova, A.M. Katsev // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – V.23 (62). – № 2. – P. 218-224.

The marine luminescent bacteria of *Vibrio fischeri* F1, *Vibrio harveyi* Ms1, *Photobacterium phosphoreum* F2 and *Photobacterium leiognathi* Sh1 were used. It was found, that the most sensible species of bacteria to the copper (II) and zinc ions were bacteria *P. phosphoreum* F2. The comparative study of metals ions action on bioluminescence of different species of photobacteria have shown, that the bacteria *V. harveyi* Ms1 were characterized by maximal reproducibility of the results. Measurement accuracy of the determined concentrations range of analyzing substances was within the limits of $2 \div 20\%$. The results got during research have testified to the necessity of strict observance of the algorithm during the bioluminescent analysis that can be used in analytical aims.

Keywords: bioluminescent analysis, analytical characteristics

Поступила в редакцію 18.05.2010 г.