

ЭКОТОКСИЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ МЕТОДАМИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И ЛИХЕНОИНДИКАЦИИ

Т.Ю. Толпышева, А.П. Зарубина*

Проведена оценка экологического состояния г. Москва при использовании двух экспрессных тест-систем – индикации на основе фотобионтов лишайников и биотестирования на основе бактериальной люминесценции. Экспресс методом биотестирования определены индексы токсичности корки форофитов в местах произрастания лишайников. Определяли размеры клеток фотобионтов лишайников. Получены доказательства постоянного вредного эффекта хронического загрязнения на специфическое сообщество используемой тест-системы лишайников и возможного недавнего загрязнения при использовании тест-системы бактериальной люминесценции.

Ключевые слова: биотестирование, бактериальная люминесценция, лишайники, фотобионты лишайников, кора деревьев.

Ссылка для цитирования: Толпышева Т.Ю., Зарубина А.П. Экотоксикологическая оценка качества городской среды методами бактериальной люминесценции и лишеноиндикации // Жизнь Земли. 2023. Т. 45, № 4. С. 519–526. DOI: 10.29003/m3533.0514-7468.2019_45_4/519-526.

Поступила 25.06.2023 / Принята к публикации 29.11.2023

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF THE URBAN ENVIRONMENT QUALITY USING BACTERIAL LUMINESCENCE AND LICHENOINDICATION METHODS

T.Yu. Tolpysheva, Dr. Sci. (Biol.), A.P. Zarubina, PhD

Lomonosov Moscow State University (Faculty of Biology)

The ecological status of the city of Moscow was assessed using two test kits, namely, a display based on luminescent bacteria and a lichen photobiont indicator. The toxicity of tree bark in lichen ecotops was estimated by a biotest method. Changes in the cell diameters of lichen photobionts were evaluated. Evidence has been obtained of a permanent detrimental effect of chronic contamination on the specific community of the lichen test system used and possible recent contamination by the use of our bacterial luminescence test system.

Keywords: biotesting, luminescent bacteria, lichens, lichen photobionts, tree bark.

For citation: Tolpysheva, T.Yu., Zarubina, A.P., “Ecotoxicological assessment of the urban environment quality using bacterial luminescence and lichenoindication methods”, *Zhizn Zemli* [Life of the Earth] 45, no 4, 519–526 (2023) (in Russ., abstr. in Engl.). DOI: 10.29003/m3533.0514-7468.2019_45_4/519-526.

Введение. В Начиная с 90-х гг. XX века экологическая ситуация в г. Москва начала меняться. С одной стороны, закрытие многих промышленных предприятий способствовало улучшению чистоты воздуха, с другой – резко возросло количество автотранспорта, что негативно сказалось на уровне загрязнения. Всё это повлекло за собой изменения в качественном и количественном составе загрязняющих веществ, поступающих в ат-

* Толпышева Татьяна Юрьевна – вед.н.с., д.б.н., tolpysheva@mail.ru; Зарубина Алевтина Петровна – с.н.с., к.б.н., al-zar1@yandex.ru; биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова.

мосферу. Методы биологической индикации, в отличие от других методов, определяют реакцию живых организмов, внутриорганизменных структур, систем и сообществ организмов на различные негативные воздействия. Одним из таких методов является метод лишеноиндикации. Лишайники чутко реагируют на происходящие изменения, поэтому их часто используют при проведении экологического мониторинга [2]. Биотестирование на основе бактериальной люминесценции широко используют в экспресс-оценке действия физических факторов, химических веществ, их смесей и в мониторинге объектов окружающей среды [4, 5, 17]. Сочетание двух методов – лишенологического и биотестирования – позволяет определить характер происходящих изменений [6].

Материалы и методы. Лишайники *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. и *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.) Moberg и корки собирали со стволов живых деревьев на высоте 1,5–2 м из мест озеленённых дворов улиц разных округов Москвы, а из пунктов 2, 9, 14 – вблизи крупных магистралей (табл. 1).

Контролем служили клетки фотобионтов лишайников, собранных с деревьев в Зубцовском районе Тверской области (экологически чистая зона).

Измеряли диаметры 20 клеток фотобинтов лишайников, проводили статистическую оценку достоверности различий размеров клеток фотобинтов по критерию Стьюдента (уровень значимости 95 %). Полученные данные обрабатывали в программе MS Excel.

В качестве биосенсора при биотестировании на основе бактериальной люминесценции служили бактерии генно-инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TGI с созданным светящимся фенотипом при клонировании в него lux-оперона из светящихся почвенных бактерий *Photorhabdus luminescens* ZMI. Штамм получен и хранится на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,

Таблица 1. Адреса сбора материала исследования
Table 1. Locations of sampling

Округа города Москва	Адреса сбора материалов	Пункты, №
Центральный (Ц)	Средний Овчинниковский пер., д. 1	1
	Сухаревская пл., д. 10/31	2
Северный (С)	Бутырская ул., д. 89	3
	Долгопрудная ул., д. 13	4
Северо-Восточный (СВ)	ВВЦ	5
	Полярная ул., д. 10	6
Северо-Западный (СЗ)	ул. Народного ополчения, д. 19	7
	Туристская ул., д. 15	8
Южный (Ю)	Варшавское шоссе, д. 32	9
	Чертановская ул., д. 21	10
	Братеевская ул., д. 27	11
Юго-Восточный (ЮВ)	Шоссейная ул. д. 29	12
Восточный (В)	Ивантеевская ул., д. 4/1	13
Западный (З)	Можайское шоссе, д. 20	14

известен как биосенсор тест-системы «Эколюм-08» [11]. В эксперименте лиофильно-высушенные клетки биосенсора регидратировали холодной дистиллированной водой в течение 30 минут и использовали суспензию в разведении необходимого уровня биолюминесценции. Плотность бактериальных суспензий определяли нефелометрически ($\lambda=670$ нм) на фотоэлектроколориметре KF77 и выражали числом клеток в 1 мл (кл/мл) по калибровочной кривой.

Для биотестирования использовали полусухую одревесневшую корку ($\approx 5-7$ см), снимая её с деревьев на той же высоте, где найдены лишайники. Перед тестированием корку подсушивали при 25°C в течение суток и измельчали. Измельчённые образцы заливали стерильной дистиллированной водой ($\text{pH}=7,5$) в соотношении 1 : 5, встряхивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 24 часов. Экстракцию проводили в стеклянных плотно закрытых бюксах. В анализах использовали верхний отстоявшийся водный слой экстракта. Водные экстракты фильтровали через бумажные широкопористые мягкие фильтры. Определение pH водных образцов осуществляли потенциометрически. Для оценки свойств исследуемой корки дерева использовали иономер «ЭВ-74».

Интенсивность свечения бактерий (имп/сек) регистрировали с помощью люминометра «Биотокс 6МС» (Россия) при температуре 20°C . В каждую контрольную и опытную кювету типа Эппендорфа объёмом 1,5 мл наливали 0,1 мл суспензии биосенсора. В контрольную кювету добавляли 0,9 мл дистиллированной воды, в опытную кювету – такой же объём водного экстракта корки. Значение pH контрольного образца доводили 2 М раствором NaOH до соответствующих значений pH опытных образцов.

Интенсивность свечения биосенсора контрольного и опытного образцов (в 3-х повторностях) определяли одновременно через 5 и 30 минут.

Индекс токсичности (Т) образцов определялся автоматически по программе люминометра по формуле $T = 100 (I_k - I) / I_k$, где I_k – интенсивность свечения контроля, I – интенсивность свечения опыта. Оценка токсичности исследуемых образцов корки деревьев классифицировали по трём группам: значение $T < 20$ – образец нетоксичен; значение $20 < T < 50$ – образец токсичен; значение $T > 50$ – образец очень токсичен [11]. Иногда наблюдали стимуляцию свечения тест-организма, т. е. значение Т с отрицательным знаком.

Результаты и их обсуждение. У исследованных видов лишайников фотобионтами являются зелёные водоросли рода *Trebouxia*. У лишайника *Xanthoria parietina* фотобионт *T. arboricola*, а у лишайника *Phaeophyscia orbicularis* – *T. impressa* [12, 13]. Клетки фотобионта *Phaeophyscia orbicularis* крупнее, чем клетки фотобионта *Xanthoria parietina*: у *T. impressa* – 12,65 мкм, у *T. arboricola* – 11,48 мкм. Различие в размерах клеток фотобионтов у этих видов лишайников отмечалось ранее [6].

В экологически чистой зоне древесная порода не влияла на размеры клеток фотобионтов. Размеры клеток одного и того же вида р. *Trebouxia* на разных древесных породах колебались незначительно (рис. 1).

Виды лишайников *X. parietina* и *Ph. orbicularis* относятся к 1 классу токсифобности [3]. Оба вида – нитрофилы, при этом *Ph. orbicularis* более азотолобив, чем *X. parietina* [14]. Несмотря на то, что оба вида устойчивы к высокому уровню загрязнения, некоторые особи лишайников были плохо развиты, размеры талломов небольшие, у некоторых особей отсутствовали органы размножения. В пункте 1 на тополе и ясене у *Ph. orbicularis* был изменён цвет таллома. Изменение цвета у некоторых особей лишайников этого вида, растущих на тополе и вязе, наблюдали также в районе пункта 7. Разрушенный

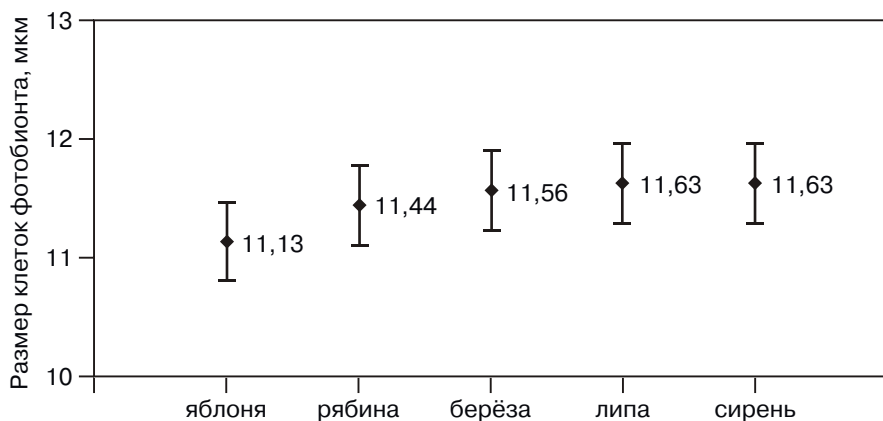


Рис. 1. Размер клеток фотобионта контрольных образцов *Xanthoria parietina* на разных субстратах.

Fig. 1. Photobiont cell sizes of *Xanthoria parietina* control samples on several substrates.

верхний коровый слой был у *Ph. orbicularis* на клёне ясенелистом в пункте 13 [7]. В местах изменённого цвета таллома клетки фотобионтов имели коричневую окраску, что свидетельствует о феофетинизации. Мелкие размеры лишайников, изменение цвета талломов, плохое развитие или отсутствие органов размножения – всё это типично для видов, произрастающих в загрязнённых районах [8].

В пунктах 4, 5, 7 и 8 у *X. parietina* размеры *Trebouxia arboricola* были сходны с размерами этого фотобионта в экологически чистой зоне (**рис. 2**). У *Ph. orbicularis* сходные с контрольными размеры клеток фотобионта *T. impressa* отмечены в таких пунктах произрастания лишайника, как 1, 5–8, 13 и 14 (**рис. 3**).

В пункте 14 клетки фотобионта *X. parietina* были небольшими, что свидетельствует об угнетении водорослевого симбионта этого вида лишайника в отличие от фотобионта

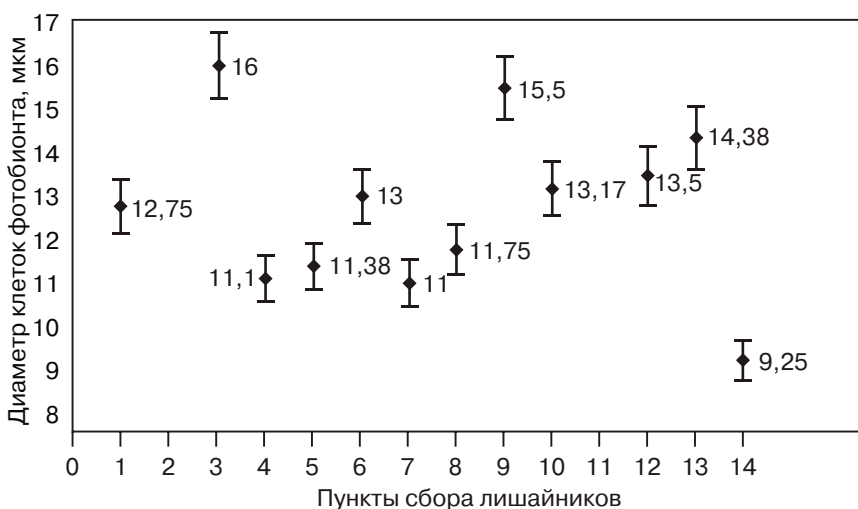


Рис. 2. Размеры клеток фотобионта *Xanthoria parietina* в разных пунктах.

Fig. 2. Cell dimensions of the photobiont *Xanthoria parietina* at several sites.

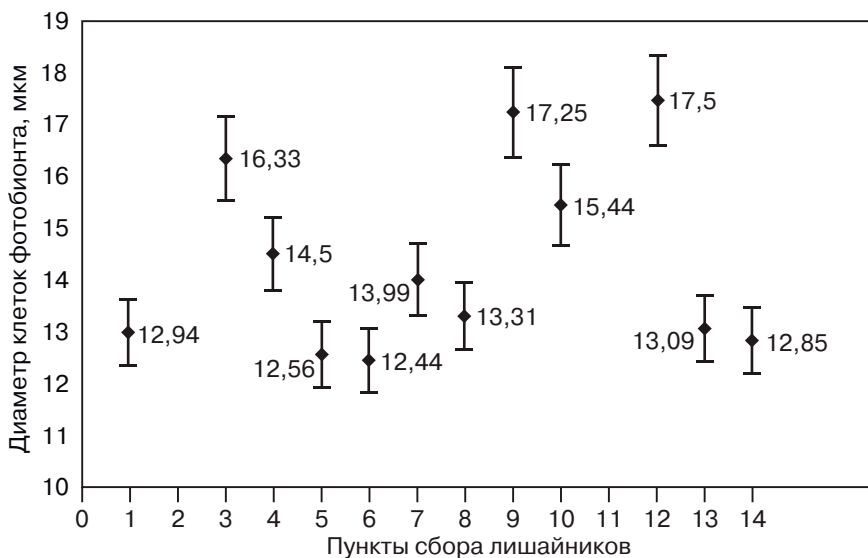


Рис. 3. Размеры клеток фотобионта *Phaeophyscia orbicularis* в разных пунктах.
Fig. 3. Cell dimensions of the photobiont *Phaeophyscia orbicularis* at several sites.

Ph. orbicularis (см. рис. 2, 3). Уменьшение размеров водорослевых клеток отмечено у некоторых видов эпифитных и эпилитных лишайников при загрязнении воздуха [6, 10].

В отличие от чистой зоны размеры клеток фотобионтов на некоторых древесных породах в зависимости от места произрастания различались, что свидетельствует о влиянии загрязнения. Например, около поста № 5 клетки фотобионта лишайника *Ph. orbicularis*, росшего на жёлтой акации, были значительно меньше (10,56 мкм), чем клетки фотобионта лишайника, выросшего на сирени (14,56 мкм). Однако у многих особей лишайников размеры клеток фотобионтов в городской среде были крупнее, чем в контроле. Так, на яблоне размеры фотобионта *X. parietina* в Москве 13,41 мкм, а в Тверской области – 11,13 мкм.

Более крупные размеры клеток фотобионта *X. parietina* отмечены в пунктах 1, 3, 6, 9, 10, 12 и 13, а у *Ph. orbicularis* – в пунктах 3, 4, 9, 12, 10 и 12. Наиболее крупные клетки фотобионтов обоих видов лишайников отмечены в пункте 3 и 9, а у *Ph. orbicularis* – в пункте 12 (рис. 2). Всё это свидетельствует об использовании фотобионтами дополнительных питательных веществ. Известно, что нитрофильные лишайники [16] способны использовать для своего развития соединения азота, загрязняющие атмосферу [9]. Соединения азота влияют на физиологические процессы лишайников, и в местах, более богатых соединениями азота, талломы лишайников обычно крупнее [15]. Отмечено увеличение средних размеров клеток *Trebouxia impressa* лишайника *Ph. orbicularis* в городской среде (14,35 мкм) по сравнению с экологически чистым районом (12,73 мкм). Для *T. arboricola* – фотобионта лишайника *X. parietina*, это не выявлено (различия статистически недостоверны).

В городской среде корки исследованных древесных пород умеренно кислые или субнейтральные: pH корки у липы и вишни 5,5, у яблони – 5,8, лещины – 5,9, сирени – 6,1, жёлтой акации – 6,5, рябины – 6,6. В отличие от городской среды в чистом районе, корка лещины довольно кислая (pH 4,6), а рябины – умеренно-кислая (5,35). Таким

образом, в городских условиях у некоторых древесных пород наблюдается сдвиг рН в сторону защелачивания.

В разных районах города рН корки одной и той же древесной породы может незначительно различаться. Так, у тополя в пункте 13 рН корки 6,2, в пункте 6 – 6,7, в пункте 12 – 7,3. Увеличение рН корки деревьев связывают с увеличением содержания в ней азотистых соединений в местах с высокой концентрацией этих соединений в атмосферном воздухе, что в свою очередь способствует сокращению ацидофильных и увеличению числа и обилия нитрофильных видов лишайников [14]. В Москве довольно много нитрофильных видов лишайников [3, 7], и их количество в XXI веке по сравнению с началом 90-х гг. прошлого века возросло [1], что свидетельствует об увеличении содержания соединений азота в воздушной среде.

Исследование токсичности корки восьми видов деревьев из разных мест методом биотестирования в течение 5 и 30 мин. анализа показало, что корки акации пункта 5 и вишни пункта 14 токсичны: индекс токсичности (Т) незначительно увеличивался во времени анализа от 5 к 30 мин. экспозиции с бактериальным биосенсом: Т = от 32 ± 1 до 43 ± 3 и от 34 ± 3 до 42 ± 4 , соответственно. Корки рябины в пункте 4, сирени в пункте 5 и лещины в пункте 13 были очень токсичны. При этом во времени анализа их Т составлял от 38 ± 2 до 77 ± 4 , от 45 ± 3 до 69 ± 4 и от 68 ± 3 до 78 ± 5 , соответственно. Корки липы из пункта 14 и яблонь из пунктов 5 и 14 были незначительно токсичны к 5 мин. анализа и практически нетоксичны к 30 мин. анализа даже со стимуляцией люминесценции биосенсора. Т корки липы был от 23 ± 1 до 17 ± 2 , а яблонь – от 14 ± 1 до -29 ± 5 (пункт 5) и от 23 ± 3 до -45 ± 8 (пункт 14). Значительная разница величин токсичности от очень токсичного, токсичного и мало токсичного даже со стимуляцией люминесценции биосенсора была у корок тополей из мест восточных направлений пунктов 6, 12 и 13: Т = от 58 ± 2 до 81 ± 1 , от 39 ± 2 до 45 ± 4 и от 22 ± 1 до -48 ± 7 , соответственно.

В городских условиях отмечено резкое снижение биологической активности корки деревьев по сравнению с контрольными образцами из чистого района. Биологическая активность контрольных образцов на всех исследованных породах деревьев была очень высокая. В Москве, вероятно, в результате загрязнения, у некоторых древесных пород она резко снижается. Различия в токсичности древесной корки наблюдали также у видов одного рода, как это выявлено у клёнов. Прослеживается тенденция увеличения размера клеток фотобионта *Ph. orbicularis* на деревьях с меньшей токсичностью корки. Не исключено, что снижение активности корки («иммунитета» дерева) может стимулировать как проникновение патогенных организмов, так и более активное заселение их лишайниками.

Заключение. В городских условиях отмечено резкое снижение биологической активности корки деревьев по сравнению с контрольными образцами из чистого района. Оценка токсичности корки деревьев на основе бактериальной люминесценции является дополнительным индикатором загрязнения воздушной среды.

Наблюдается вариабельность размеров клеток фотобионтов лишайников *Xanthoria parietina* и *Phaeophyscia orbicularis*, преимущественно в сторону увеличения их размеров. Прослеживается тенденция увеличения размера клеток фотобионта *Ph. orbicularis* на деревьях с меньшей токсичностью корки.

Данные, полученные методом биоиндикации с использованием характеристики фотобионтов лишайников и экспресс-методом биотестирования на основе бактериальной люминесценции, указывают на недостаточно благоприятное состояние городской среды.

Благодарности и источники финансирования. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300081-7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бязров Л.Г. Динамика видовой разнообразия эпифитных лишенизированных грибов Южного округа Москвы // Принципы экологии. 2013. № 1. С. 33–50.
2. Бязров Л.Г. Лишайники в экологическом мониторинге. М.: Научный мир, 2002. 136 с.
3. Бязров Л.Г. Лишайники Москвы: современная динамика видовой разнообразия // М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. 146 с.
4. Зарубина А.П., Мажуль М.М., Новосёлова Л.А., Гапochка М.Г. Бактериальный люминесцентный биотест // Сенсор. 2005. № 3. С. 14–21.
5. Зарубина А.П., Сорокина Е.В. Первый среди равных. Один из самых экспрессных и доступных методов биотестирования – бактериально люминесцентный тест // Евразийский союз учёных (ЕСУ). Биологические науки. 2015. Т. 17, № 8. С. 161–163.
6. Зарубина А.П., Толпышева Т.Ю., Плеханов С.Е. Оценка загрязнения воздушной среды методами биотестирования // Экология и промышленность России. 2016. Т. 29, № 8. С. 2–6.
7. Зарубина А.П., Толпышева Т.Ю., Сорокина Е.В. Экотоксикологическая оценка состояния городской среды на примере Мегалополиса Москвы // Социально-экологические технологии. 2018. № 2. С. 34–51. DOI: 10.31862/2500-2963-2018-2-34-51.
8. Малышева Н.В. Об экологической патоморфологии лишайников в окрестностях Санкт-Петербурга // Новости систематики низших растений. 1995. Т. 30. С. 78–85.
9. Нильсон Э.М., Мартин Л.Н. Эпифитные лишайники в условиях кислого и щелочного загрязнения // Взаимодействие лесных экосистем и атмосферных загрязнителей. Таллин, 1982. Ч. 2. С. 88–100.
10. Толпышева Т.Ю., Ребрикова Н.Л. Лишайники, наскальные рисунки и загрязнение воздуха // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1997. № 4. С. 42–44.
11. Danilov V.S., Zarubina A.P., Eroshnicov G.E., Solov'eva L.N., Kartashev F.V., Zavi'gelsky G.B. The bioluminescent sensor systems with lux-operons from various species of luminescent bacteria // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2002. N 3. P. 20–24.
12. Friedl T., Büdel B. Photobionts // Lichen Biology / Ed. Th. H. Nash III. Cambridge: Univ. Press, 2010. P. 9–41.
13. Helms G., Friede T., Rambold G., Mayrhofer H. Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing // Lichenologist. 2001. V. 33. P. 76–86.
14. Van Herk C.M. Bark pH and susceptibility to toxic air pollutants as independent causes of changes in epiphytic lichen composition in space and time // Lichenologist. 2001. Vol. 33. № 5. P. 419–441.
15. Palmqvist K., Dahlman L., Jonsson A., Nash III T.H. The carbon economy of lichen // Lichen biology. Cambridge: Univ. Pres, 2010. P. 184–217.
16. Sparrius L.B. Ammonia as a key factor for the composition of epiphytic lichen communities // Lichens in Focus (The 5th Symposium IAL). Tartu, 2004. P. 60.
17. Zarubina A.P., Gapochka M.G., Novoselova L.A., Gapochka L.D. Effect of Low Intensity Electromagnetic Radiation on the Toxicity of Domestic Wastewater Tested with the “Ecolum” Test System // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2013. V. 68, № 1. P. 49–52.

REFERENCES

1. Biazrov, L.G., “Dynamics of the species diversity of epiphytic lichenized fungi in the Southern District of Moscow”, *Principles of ecology* 1, 33–50 (2013) (in Russian).
2. Biazrov, L.G., *Lichens in ecological monitoring* (Moscow: Nauchnyi mir, 2002) (in Russian).
3. Biazrov, L.G., *Epiphytic lichens of the Moscow city: recent changes in the species diversity* (Moscow: KMK Scientific Press, 2009) (in Russian).
4. Zarubina, A.P., Mazhul, M.M., Novoselova, L.A., Gapochka, M.G., “Bacterial luminescent biotest”, *Sensor* 3, 14–21 (2005) (in Russian).
5. Zarubina, A.P., Sorokina, E.V., “First among equals. One of the most fast and accessible bioassay methods is the bacterial luminescent test”, *ECY. Biological sciences* 17 (8), 161–163 (2015) (in Russian).
6. Zarubina, A.P., Tolpysheva, T.Yu., Plehanov, S.E., “Air pollution assessment by biotesting methods”, *29* (8), 2–6 (2016) (in Russian).
7. Zarubina, A.P., Tolpysheva, T.Yu., Sorokina, E.V., “Ecotoxicological assessment of the urban environment status on the example of Moscow”, *Social-ecological technologies* 2, 34–51 (2018) (in Russian). DOI: 10.31862/2500-2963-2018-2-34-51.

8. Malysheva, N.V., "On the ecological pathomorphology of lichens in the Saint-Petersburg region", *News of taxonomy of lower plants* **30**, 78–85 (1995) (in Russian).
9. Nilson, E.M., Martin, L.N., "Epiphytic lichens in the conditions of acidic and alkaline pollution", *Interaction between forest ecosystems and atmospheric pollutants* **2**, 88–100 (1982) (in Russian).
10. Tolpysheva, T.Yu., Rebrikova, N.L., "Lichens, rock paintings, and air pollution", *Vestnik MGU, Ser. Biology* **4**, 42–44 (1997) (in Russian).
11. Danilov, V.S., Zarubina, A.P., Eroshnicov, G.E., Solov'eva, L.N., Kartashev, F.V., Zavit'skiy, G.B., "The bioluminescent sensor systems with lux-operons from various species of luminescent bacteria", *Moscow University Biological Sciences Bulletin* **3**, 20–24 (2002).
12. Friedl, T., Büdel, B., "Photobionts", *Lichen Biology*, 9–41 (2010).
13. Helms, G., Friede, T., Rambold, G., Mayrhofer, H., "Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing", *Lichenologist* **33**, 76–86 (2001).
14. Van Herk, C.M., "Bark pH and susceptibility to toxic air pollutants as independent causes of changes in epiphytic lichen composition in space and time", *Lichenologist* **33** (5), 419–441 (2001).
15. Palmqvist, K., Dahlman, L., Jonsson, A., Nash III, T.H., "The carbon economy of lichen", *Lichen biology*, 184–217 (2010).
16. Sparrius, L.B., "Ammonia as a key factor for the composition of epiphytic lichen communities", *Lichens in Focus* (The 5th Symposium IAL, Tartu) (2004).
17. Zarubina, A.P., Gapochka, M.G., Novoselova, L.A., Gapochka, L.D., "Effect of Low Intensity Electromagnetic Radiation on the Toxicity of Domestic Wastewater Tested with the "Ecolum" Test System", *Moscow University Biological Sciences Bulletin* **68** (1), 49–52 (2013).