

В. П. Ч Е К А Л О В

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО  
СОРБЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ И ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ  
ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ**

Используя метиленовый синий (МС) в качестве конечного акцептора водорода, оценили уровень дегидрогеназной активности и адсорбции красителя грунтами одной из бухт Черного моря в юго-западной части Крымского п-ова. Различали физико-химическую адсорбцию грунтами и сорбцию органическим веществом. Преобладание восстановительных условий в донных отложениях и низкая температура воды определили слабую ферментативную активность. Предлагается выражать результат в виде количества водорода, который был потреблен при восстановлении терминального акцептора за единицу времени, что даст возможность унификации данных, независимо от природы акцептора.

Бактериальный компонент донных отложений, участвуя в трансформации органического вещества, является средомодифицирующим фактором, часто определяющим функционирование бентосного сообщества по окислительному или же восстановительному типу. С другой стороны, любые изменения во внешней среде, в том числе поступление токсических веществ, могут вызвать как стимуляцию, так и снижение ферментативной активности, вплоть до полного ее подавления. Предложенный [9] метод определения дегидрогеназной активности микроорганизмов в грунтах в настоящее время имеет целый ряд модификаций [7, 8, 11, 13]. В их основе лежит использование в качестве конечного акцептора электронов определенных окислительно-восстановительных индикаторов, которые, выступая конкурентами кислорода, в условиях анаэробноизменяют окраску. В дальнейшем ее интенсивность измеряют фотометрически. Для количественного учета обычно применяются различные производные солей тетразолия (ТТХ). Будучи бесцветными, при восстановлении они дают ярко окрашенные соединения – формазаны. Последние накапливаются во внутриклеточном пространстве, и их извлечение с использованием органических растворителей достаточно трудоемкая процедура. Кроме того, соли тетразолия практически нерастворимы в воде. Для констатации качественных изменений дегидрогеназной активности зачастую используют метиленовый синий, который при восстановлении, наоборот, обесцвечивается [5]. Несмотря на простоту этих методов, в количественных исследованиях его избегают по ряду причин, одна из которых, возможно, заключается в сложности обнаружения восстановленного продукта. Кроме того, присутствующие в среде редуцирующие вещества, реагируя с метиленовым синим, затрудняют учет биохимического восстановления красителя микрофлорой [11]. Тем не менее, с этими же трудностями, возможно, в меньшем объеме, сталкиваются и при использовании солей тетразолия [10, 12]. Нивелирование подобных артефактов может быть достигнуто в результате подбора необходимых контрольных определений, которые, в свою очередь, отражают сорбционную способность грунтов.

Целью настоящей работы являлось разработать количественный метод определения дегидрогеназной активности с помощью метиленового синего. Было предложено оценивать её по убыли интенсивности окраски исходного разведения реактива, которую измеряли на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 650 нм.

**Материал и методы.** В качестве инкубаторов использовались шприцы объемом 20 см<sup>3</sup>. Это позволяло, во-первых, поддерживать микроаэрофильные условия, что необходимо для восстановления красителя, а во-вторых, контролировать процесс в динамике, проводя измерения через фиксированные промежутки времени.

Предварительные исследования показали необходимость измерения в трех повторностях следующих трех параметров:

© В. П. Чекалов, 2006

1. Уровень физико-химической адсорбции грунтом метиленового синего. Для этого в шприцы вносили по 0,5 г исследуемой пробы (Гр) и по 10 см<sup>3</sup> рабочего разведения красителя (МС) в этиловом спирте, который готовили накануне разведением в 10 раз базового раствора (200 мкг/мл) 96% спиртом. Таким образом, исходная концентрация красителя составляла 20 мкг/мл. Раствор фильтровали, после чего измеряли оптическую плотность. Ее изменение в ходе эксперимента пропорционально изменению концентрации красителя. Разность между исходной концентрацией и остаточной, рассчитанной через определенный интервал времени, принимали за количество адсорбированного грунтом метиленового синего ( $M_{1 \text{ утил}}$ ).

2. Сорбция реактива, как грунтом, так и его органической составляющей. Исследуемым материалом служил прогретый (до 80 – 90<sup>0</sup>С) на водяной бане грунт, к 0,5 г которого добавляли 10 см<sup>3</sup> стерильного рабочего разведения метиленового синего в такой же пропорции, как описано выше, но на подготовленной (прокипяченной и отфильтрованной) морской воде (МВ). Здесь разность между исходной концентрацией и остаточной будет являться показателем утилизированного без участия биоты красителя ( $M_{2 \text{ утил}}$ ). Если вычесть из него значение метиленового синего, поглощенного грунтом, то мы получим количество реактива, адсорбированного химическим компонентом ( $M_{2 \text{ сорб}}$ ).

Что касается подбора факторов подавления микрофлоры в обоих приведенных выше случаях, то, наряду с пастеризацией грунтов, были опробованы различные по соотношению водно-спиртовые составы. Однако наиболее стабильные результаты отмечались с чистым 96% этиловым спиртом. Спирт, как известно, помимо подавления микрофлоры, вызывает денатурацию белковых молекул, что приводит к инактивации ферментных комплексов. Кроме того, обладая экстрактивными свойствами, он предотвращает сорбцию метиленового синего органикой, содержащейся в исследуемой пробе. Нагревание же грунта на водяной бане не препятствует адсорбированию красителя органикой.

3. Суммарная утилизация метиленового синего. В инкубационные емкости вносили по 0,5 г пробы и по 10 см<sup>3</sup> стерильного рабочего разведения метиленового синего, приготовленного на морской воде. Рассчитанный уровень потребления метиленового синего в этом случае включал в себя, наряду с абиотическим, также и биохимическое восстановление реактива, преимущественно бактериальным сообществом ( $M_{3 \text{ утил}}$ ). Оценить количественно масштаб последнего можно по разности величин суммарной утилизации метиленового синего и красителя, адсорбированного комплексом “грунт-органика” ( $M_{3 \text{ восст}}$ ).

Для сравнительного контроля в один шприц к 0,5г грунта добавляли 10см<sup>3</sup> морской воды, подготовленной так, как описано в п. 2.

С целью выявления максимальной потенциальной ферментативной активности, была предпринята также попытка стимуляции окислительных процессов внесением глюкозы в инкубационную среду (4 мг/мл), но подобного эффекта не было отмечено, а зачастую наблюдалось даже ее подавление. Вероятно, органическое вещество не является лимитирующим фактором в грунтах. Эффект ингибирования дегидрогеназной активности отмечал также в экспериментах с сукцинатом натрия [14].

Каждую инкубационную емкость встряхивали, вытесняли воздух, закрывали пробками и помещали в термостат при 25<sup>0</sup>С. С момента внесения раствора метиленового синего начинали отсчет времени. Измерение оптической плотности проводили каждый час в течение 6 ч, контрольный замер – через 24 ч. Внесение и извлечение исследуемых растворов в кюветы из инкубаторов осуществляли иглами, насадочные конуса которых для предотвращения попадания взвеси плотно заполняли стерильной ватой.

В качестве материала для апробации метода в середине мая 2006 г. были отобраны пробы в бухте Круглая на станции 4ц, представляющей собой типичную сульфурету с темными, сильно восстановленными (Eh= -390 мВ) крупнопесчанистыми грунтами, и на станции 4ф, взятой как фоновая, за пределами пятна, но также с достаточно

низким значением окислительно-восстановительного потенциала ( $E_h = -160$  мВ). Температура придонной воды составляла  $12^{\circ}\text{C}$ .

**Результаты и обсуждение.** Изменение дегидрогеназной активности, и это закономерно, зависит от условий окружающей среды. Отмечена достоверная положительная связь между уровнем дегидрогеназной активности и температурой морской воды [1, 9, 13]. Кроме того, чем выше  $E_h$ , тем более продуктивна дегидрогеназная система, т.е. выше интенсивность окислительных процессов. В анаэробных условиях маловероятно функционирование активированных электрон-транспортных систем (ЭТС), замыкающихся на кислород. Выступая конечным акцептором электронов, метиленовый синий восстанавливается в лейкоформу с присоединением водорода от  $\text{NADH}_2$ . Движение двух электронов по дыхательной цепи бактерий способно создавать обогащенное энергией состояние двух или трех компонентов этой цепи, которые при возвращении в нормальное состояние генерируют синтез соответствующего количества АТФ [2, 3]. Таким образом, на каждую весовую единицу восстановленного реактива приходится двух - трехкратное количество вновь образованной АТФ. Это может быть использовано для дальнейших расчетов энергетических потоков в экосистемах бентали. Рядом авторов отмечена корреляционная зависимость между уровнем активности ЭТС и биохимическим потреблением кислорода [6, 15].

Большинство сведений по дегидрогеназной активности получены с использованием различных производных солей тетразолия, молекулярная масса которых колеблется от 334,81 у ТТХ до 907,64 у тетранитротетразолия синего [4]. Восстановленные продукты этих солей (формазаы) также специфичны. Поэтому сравнивать данные по восстановленному реактиву в единицу времени в случае применения разных веществ затруднительно. Возможно, целесообразно представлять результаты в виде количества водорода, пошедшего на восстановление. Любое вещество, выступающее конечным акцептором в цепи переноса электронов, присоединяет два протона водорода, а количество восстановленных реагентов зависит от их молекулярных масс. Так, если при определении дегидрогеназной активности с помощью ТТХ образовалось 3 мкг соответствующего формазаы, а в другом случае было выявлено 6 мкг восстановленного производного ДСТХ (М.м. = 518,95), то количество водорода, пошедшего на восстановление, составит 0,18 и 0,23 мкг соответственно. Эти величины сопоставимы, тогда как по формазаы им они различаются вдвое.

Бухта Круглая расположена на юго-западе Крымского п-ова в районе г. Севастополя. Гидрохимический режим исследуемой бухты является производной нескольких факторов: сезонного колебания температур, антропогенного влияния и гидрологических особенностей района. Высокая рекреационная нагрузка в летний период обуславливает поступление избыточного количества биогенных веществ и, как следствие, эвтрофикацию акватории. Поэтому, несмотря на достаточно высокую насыщенность водной толщи кислородом, в грунтах часто образуются зоны с резко выраженными восстановительными свойствами.

Максимальное количество метиленового синего (табл. 1, табл. 2) было восстановлено в течение первого часа инкубации: 12 мкг (или 0,06 мкг водорода) на грамм влажного грунта (ст. 4ф) и 6 мкг/г (0,03 мкг  $\text{H}^+$ /г) на ст. 4ц, что составляет 17 и 3 % от суммарной утилизации красителя соответственно. Это можно считать первичной скоростью процесса. В течение последующих 3 ч скорость редукции на ст. 4ф снизилась в среднем до 6 мкг  $\text{MC}/\text{г}\cdot\text{час}$  (0,03 мкг  $\text{H}^+$ /г $\cdot\text{час}$ ). За 4 ч, таким образом, было восстановлено 30 мкг  $\text{MC}/\text{г}$  (0,16 мкг  $\text{H}^+$ /г), а его доля возросла до 20 %. В пробе из центра сульфуреты этот показатель не изменился, хотя позже он все-таки увеличился вдвое, достигнув величины 12 мкг/г (0,06 мкг  $\text{H}^+$ /г). Это указывает на практически полное подавление окислительных процессов, что неудивительно, учитывая чрезвычайно низкий окислительно-восстановительный потенциал на этой станции.

**Таблица 1. Адсорбционные свойства и дегидрогеназная активность донных отложений бухты Круглая (ст. 4ф), мкг МС/г**

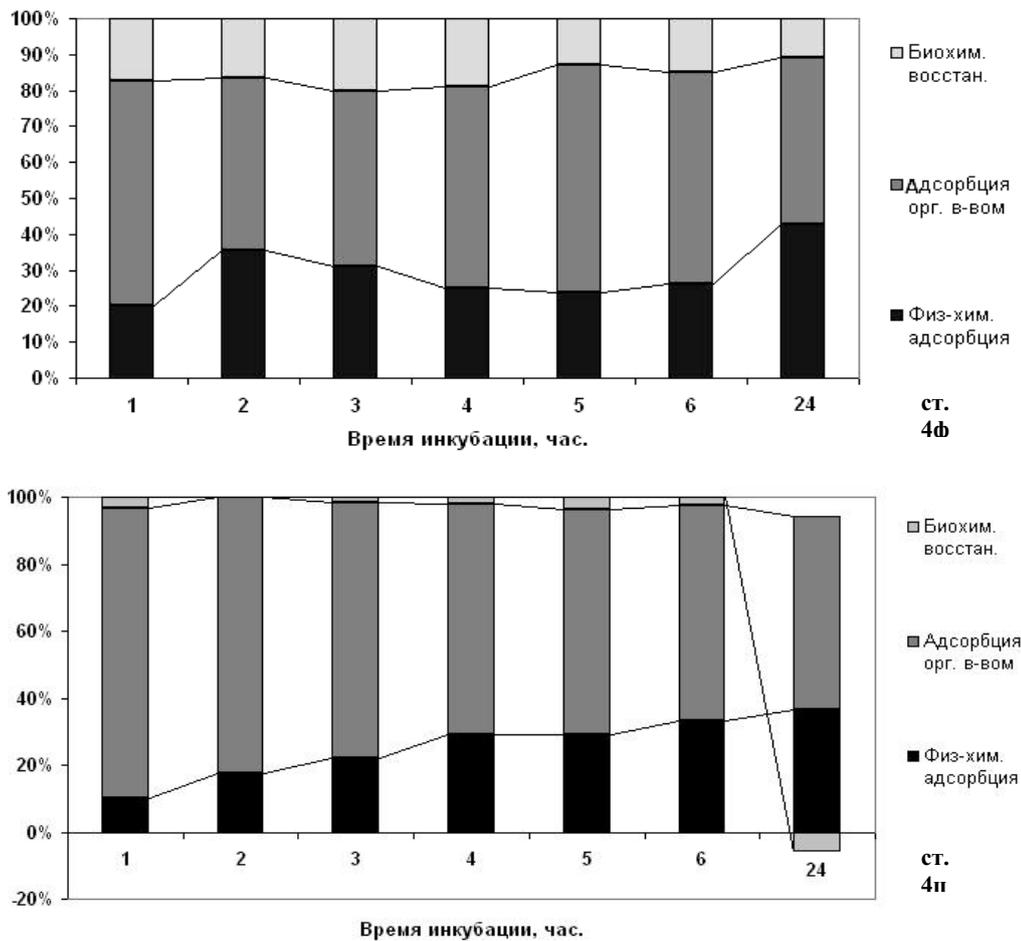
**Table 1. Adsorption properties and dehydrogenase activity of seabed sediments in the bay Kruglaja (station 4f), mkg MB/g**

Состав компонентов	Параметры	Формула расчета на 1г. грунта	Время инкубации							
			Исходн. значен.	1ч.	2ч.	3ч.	4ч.	5ч.	6ч.	24ч.
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH+МС + Гр(0,5г.)	M <sub>1 ост</sub>		400	386	366	360	360	356	344	280
	M <sub>1 утил</sub>	400 - M <sub>1ост</sub>		14	34	40	40	44	56	120
МВ+МС + Гр(0,5г.) водяная баня	M <sub>2 ост</sub>		400	342	320	298	270	240	218	150
	M <sub>2 утил</sub>	400 - M <sub>2ост</sub>		58	80	102	130	160	182	250
	M <sub>2 сорб</sub>	M <sub>2утил</sub> - M <sub>1утил</sub>		44	46	62	90	116	126	130
МВ+МС + Гр(0,5г.)	M <sub>3 ост</sub>		400	330	304	272	240	216	186	120
	M <sub>3 утил</sub>	400 - M <sub>3ост</sub>		70	96	128	160	184	214	280
	M <sub>3 сорб</sub>	M <sub>3утил</sub> - M <sub>1утил</sub>		56	62	88	120	140	158	160
	M <sub>3 восст</sub>	M <sub>3утил</sub> - M <sub>2утил</sub>		12	16	26	30	24	32	30

**Таблица 2. Адсорбционные свойства и дегидрогеназная активность донных отложений бухты Круглая (ст. 4ц), мкг МС/г**

**Table 2. Adsorption properties and dehydrogenase activity of seabed sediments in the bay Kruglaja (station 4c), mkg MB/g**

Состав компонентов	Параметры	Формула расчета на 1г. грунта	Время инкубации							
			Исходн. значен.	1ч	2ч	3ч	4ч	5ч	6ч	24ч
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH+МС + Гр(0,5г.)	M <sub>1 ост</sub>		400	380	360	340	314	306	286	262
	M <sub>1 утил</sub>	400 - M <sub>1ост</sub>		20	40	60	86	94	114	138
МВ+МС + Гр(0,5г.) во- дяная баня	M <sub>2 ост</sub>		400	212	170	134	110	90	66	42
	M <sub>2 утил</sub>	400 - M <sub>2ост</sub>		188	230	266	290	310	334	358
	M <sub>2 сорб</sub>	M <sub>2утил</sub> - M <sub>1утил</sub>		168	190	206	204	216	220	220
МВ+МС + Гр(0,5г.)	M <sub>3 ост</sub>		400	206	170	130	104	78	58	64
	M <sub>3 утил</sub>	400 - M <sub>3ост</sub>		194	230	270	296	322	342	336
	M <sub>3 сорб</sub>	M <sub>3утил</sub> - M <sub>1утил</sub>		174	190	210	210	228	228	198
	M <sub>3 восст</sub>	M <sub>3утил</sub> - M <sub>2утил</sub>		6	0	4	6	12	8	-22



**Рисунок 1. Соотношение долей восстановленного и адсорбированного красителя**  
**Figure 1. A ratio of shares of reduced and adsorbed dye**

В нашем случае говорить о количестве потребленного водорода можно только в отношении красителя, восстановленного бактериальным сообществом, так как изменение интенсивности окраски вследствие сорбционных процессов не сопряжено с переносом протонов.

Через час после начала инкубации доля метиленового синего, адсорбированного органической составляющей, на фоновой станции достигла 63 %, а на ст. 4ц – 87 % (рис. 1). В ходе эксперимента она имела тенденцию к снижению, но если в пробе из сульфуреты это происходило за счет возрастания темпов физико-химической адсорбции, то в фоновой пробе более заметную роль играла жизнедеятельность бактериобентоса. По абсолютным величинам эти станции различались почти в 4 раза после первого часа инкубации, тогда как к концу эксперимента – менее чем в 2 раза. При этом уровни физико-химической адсорбции грунтами вначале были сходны, но через 4 ч количество поглощенной метиленовой сини в пробе из центра сульфуреты вдвое превысило фоновое значение.

Учитывая стабилизированный характер сорбционных процессов, обращает внимание неожиданное восстановление интенсивности окрашивания через сутки в пробе

со ст. 4ц. Возможно, ранее редуцированный краситель в дальнейшем оказался удобным донором водорода для какой-то группы организмов в условиях анаэробнозиса. Это, однако, требует дополнительных исследований.

**Выводы.** 1. Предложенный метод позволяет производить многократный учет результатов в течение длительного периода времени по трем параметрам: физико-химическая адсорбция грунтом, сорбция его органической составляющей и собственно биохимическое восстановление метиленового синего биологическим сообществом. Количество утилизированного в каждом случае красителя зависит от ряда факторов и может рассматриваться как интегральная характеристика этого компонента. 2. Влияние условий окружающей среды, и в первую очередь Eh, особенно сказывается на биохимическом восстановлении. Физико-химическая адсорбция грунтами, при сходстве гранулометрического состава, также дает близкие результаты. Наибольшей вариабельностью отличается сорбция органическим веществом. 3. Предложенный унифицированный способ интерпретации данных, полученных с использованием различных акцепторов водорода по потреблению последнего, позволяет, наряду с возможностью сравнения результатов, переходить к смежным экстраполяциям количества потребленного кислорода и синтеза АТФ.

1. Бобкова А. Н. Роль микроорганизмов перифитона и взвеси в самоочищении Севастопольской бухты / АН УССР. Ин-т биологии южн. морей им. А. О. Ковалевского. - Севастополь, 1985. - 6 с. - Деп в ВИНТИ, №2556 - 85.
2. Готшалк Г. Метаболизм бактерий. - М.: Мир, 1982. - 310 с.
3. Мецлер Д. Биохимия: в 3 т. / Мир. - М., 1980. - Т. 2: Химические реакции в живой клетке. - 606 с.
4. Фрайштат Д. М. Реактивы и препараты для микроскопии. Справочник. - М.: Химия, 1980. - 480 с.
5. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах: Методич. указания. - М: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1995. - 20 с.
6. Blenkinsopp S. A., Lock M. A. The measurement of electron transport system activity in river biofilms // Wat. Res. - 1990. - P. 441 - 445.
7. Casida L. E. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations // Appl. Environ. Microbiol. - 1977. - №34. - P. 630 - 636.
8. Friedel J. K., Molter K., Fischer W. R. Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazoliumchloride and iononitrotetrazolium chloride // Biol. Ferttil. Soils. - 1994. - №18. - P. 291 - 296.
9. Lenhard G. The dehydrogenase activity in soil as measure of the activity of soil microorganisms // Z. Pflanzenernaehr Dueng. Bodenkd. - 1956. - №73. - P. 1 - 11.
10. Mahmoud N. S., Ghaly A. E. Influence of temperature and pH on the nonenzymatic reduction of triphenyltetrazolium chloride // Biotechnol. Prog. - 2004. - №20. - P. 346 - 353.
11. Mosher J. J. et al. A simplified dehydrogenase enzyme assay in contaminated sediment using 2-(p-iodophenyl)-3(p-nitrophenyl)-5 phenyl tetrazolium chloride // Journal of Microbiological Methods. - 2003. - 53, №3. - P. 411 - 415.
12. Nweke C. O., Okolo J. C. et al. Response of planktonic bacteria of New Calabar river to zinc stress // African Journal of Biotechnology. - 2006. - 5, №8. - P. 653 - 658.
13. Ran Xu, Jeffrey P. Obbard. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments // Journal of Environmental Quality. - 2003. - №32. - P. 1234 - 1243.
14. Szabo E. The use of the tetrazolium reduction test for the detection of the terminal electron transport system (ETS) activity in decomposing reed (*Phragmites australis* / Cav./ Trin. Ex stend.) rhizome // Ann. Limnol. - Int. J. Lim. - 39, №1. - P. 63 - 70.
15. Trevors J. T. The measurement of electron transport system activity in freshwater sediment // Wat. Res. - 1984. - №18. - P. 581 - 584.

Институт биологии южных морей НАН Украины,  
г. Севастополь

Поступила 26. 06. 2006

V. P. CHEKALOV

**DETERMINATION OF SORPTIONAL CAPACITY AND DEHYDROGENASE ACTIVITY  
OF THE MARINE SEDIMENTS  
USING METHYLENE BLUE**

**Summary**

Using methylene blue as an ultimate acceptor of hydrogen the levels dehydrogenase activity and adsorption of marine sediments were estimated in one of bays of southwestern part of the Black Sea. Two types of adsorption distinguished: physicochemical and organic substance sorption. Eh-reduced conditions of sediments and low temperature of the water has predetermined weak enzyme activity. It is offered to express result as quantity of hydrogen, which was consumed during the reduction of an ultimate acceptor in a unit of time that will enable unification of the data, irrespective of a nature of an acceptor.