



Биотест-системы для задач экологического контроля

Методические рекомендации
по практическому использованию
стандартизованных тест-культур

Москва
2014



Биотест-системы для задач экологического контроля: Методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур (В.А. Терехова, Воронина Л.П., Гершкович Д.В., Ипатова В.И., Исакова Е.Ф., Котелевцев С.В., Попутникова Т.О., Рахлеева А.А., Самойлова Т.А., Филенко О.Ф.). – М.: **Доброе слово**, 2014 г. 48 с.

Сборник содержит сведения о наиболее востребованных методах биотестирования, применяемых при оценке экотоксичности почв, вод, мелиорантов, отходов производства. Составлен по темам практических занятий программы повышения квалификации «Технологии биотестирования в экологическом контроле природных сред и техногенных объектов».

Пособие рекомендовано Учебно-методической комиссией факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по направлению 021900 «Почвоведение» и 022000 «Экология и природопользование».

© ЛЭТАП, 2014
© Т.О. Попутникова, верстка, 2014

Содержание

	стр.
Предисловие	4
Биотестирование как метод экологического контроля природных сред и техногенных объектов	5
Гидробионты: низшие ракообразные	11
<i>Daphnia magna</i>	11
<i>Ceriodaphnia affinis</i>	16
<i>Artemia salina</i>	20
Гидробионты: водоросли	26
Гидробионты: простейшие	33
Высшие растения: фитотестирование	38
Бактериальные биотесты	39
Люминесцентный тест	39
Тест Эймса и система метаболической активации	42
Млекопитающие: культура клеток <i>in vitro</i>	45
Приложения	47
Термины и определения	47
Рекомендуемая литература	48

Предисловие

В настоящее время в прикладной экологии все большее внимание уделяется биотическим методам контроля природных сред и объектов окружающей среды, результатам лабораторного биотестирования.

Программа курса «Технологии биотестирования в экологическом контроле природных сред и техногенных объектов» предусматривает, прежде всего, знакомство с методами биотестирования и тест-культурами, используемыми для экологического анализа объектов окружающей среды (почв, грунтов, донных отложений, поверхностных природных и сточных вод, химических отходов и др.). Особое внимание уделяется наиболее востребованным методам биотестирования, применяемым в производственном и государственном контроле экотоксичности почв, вод, грунтов, для определения класса опасности отходов. В курсе рассматриваются способы отбора проб, подготовки проб к биотестированию, условия содержания тест-культур, способы оценки чувствительности тест-организмов к токсикантам.

В программе курса можно найти информацию о приборной базе, необходимой для оснащения современной лаборатории биотестирования, об условиях работы согласно требованиям, предъявляемым к испытательным лабораториям, аккредитованным на право проведения экологического контроля методами биотестирования. Теоретический раздел курса, представленный лекциями и презентациями преподавателей МГУ им. М.В. Ломоносова, дополнен электронными ресурсами со справочным материалом, которые становятся доступными обучающимся на сайте Центра развития электронных образовательных ресурсов МГУ (Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова) - <http://distant.msu.ru>

Лабораторный раздел курса включает серию практикумов, посвященных знакомству с методами биотестирования и тест-культурами (водорослей, простейших, ракообразных, бактерий и др.).

Предлагаемый курс проводится 1 раз в год на базе сертифицированной лаборатории экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП, аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.513050) по адресу: Москва, Ленинские горы, МГУ им. Ломоносова, Биолого-почвенный корпус.

Будем признательны за комментарии и замечания, направленные на совершенствование этого вспомогательного для данной программы практического пособия (наш адрес letap.msu@gmail.com). Web-сайт лаборатории: www.letap.ru.

Биотестирование как метод экологического контроля природных сред и техногенных объектов

В настоящее время в сфере природоохранной деятельности наблюдается активное формирование принципов и методов экологического нормирования. Стало очевидным, что следует проводить комплексную оценку природных сред с учетом реакции живых организмов, а не ставить во главу угла результаты химических анализов, которые дают представление лишь о маркерах нарушений и ничего не могут сказать о перспективах развития экосистемы, ее биотических составляющих.

Под **биотестированием** обычно понимают процедуру установления экотоксичности проб по изменению признаков, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-организмов. Благодаря простоте, оперативности и доступности биотестирование получило широкое признание во всем мире и его все чаще используют наряду с методами аналитической химии в различного рода исследованиях и анализах.

Под термином **токсичность** понимают способность веществ вызывать нарушения физиологических функций живых организмов, что приводит к интоксикациям и гибели сначала отдельных клеток, а потом и особей в целом (всего организма, если это многоклеточное существо).

Экотоксикология определяется как раздел токсикологии, изучающий эффекты воздействия токсичных веществ на экосистемы и их круговорот в биосфере.

Понятие **экоотоксичность** (экологическая токсичность) можно определить как способность веществ вызывать неблагоприятные эффекты в отношении функционирования биологических компонентов экосистем. Показателем токсического действия служит степень изменения определенных параметров живых систем, которая фиксируется различными методами: биохимическими, биофизическими, оптическими, визуальными и другими.

Биотестирование в определении класса опасности отходов для окружающей природной среды

В практической экологии востребованность биотестирования наглядно просматривается в требованиях, предъявляемых к процедуре определения класса опасности отходов. Документ под названием «Критерии отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды», утвержденные Приказом МПР России в 2001 г (№ 511) явился важным норматив-

ным актом, регламентирующим применение биологических тест-систем для оценки экотоксичности отходов.

Надо сказать, что за 10 лет существования Приказа № 511 у пользователей методиками биотестирования накопилось немало «претензий» к регламентированной процедуре установления класса опасности отходов. Тем не менее, регламентация практического использования биологических методов оценки отражает современные тенденции в прикладной экологии, которые связаны с развитием биотической концепции нормирования вредных воздействий на природные комплексы.

Выявление класса опасности отходов для окружающей природной среды основывается не только на количественных расчетах по химическому составу содержащихся компонентов, но и на экспериментальной биологической проверке образцов. Экспериментальное определение класса опасности отходов по сути своей заключается в лабораторном исследовании экологической токсичности анализируемых образцов с использованием биологических объектов.

Согласно нормативным требованиям, оценка токсичности отходов проводится:

- а) при необходимости подтвердить отсутствие токсичности при установлении расчетным методом V класс опасности пробы;
- б) если невозможно определить качественный и количественный состав отходов и определить класс опасности расчетным методом;
- в) по желанию заинтересованной стороны или при необходимости уточнить полученный расчетным методом класс опасности отходов.

Процедура биотестирования отходов предполагает анализ водной вытяжки на острую токсичность, т.е. относительной кратковременный эксперимент (от нескольких минут до 4 сут.) не менее чем в 2 тест-системах, основанных на использовании видов из разных биологических таксонов (ракообразные и простейшие, водоросли и бактерии и т.п.). Класс опасности устанавливается по разведению водной вытяжки, при которой не выявлено вредного воздействия на биологические объекты. Отнесение отходов к V классу опасности основано на действии водной вытяжки отхода без ее разведения, для определения других классов опасности оценивается воздействие раствора с соответствующей кратностью разведения.

Соответствие кратности разведения водной вытяжки из опасного отхода определенному классу опасности.

Класс опасности отхода	Кратность разведения водной вытяжки из опасного отхода, при которой вредное воздействие отсутствует
I	>10000
II	от 10000 до 1001
III	от 1000 до 101
IV	< 100
V	1

Экспериментальный метод анализа токсичности отходов при выяснении класса опасности для окружающей природной среды осуществляется в специализированных и аккредитованных для этих целей лабораториях.

Одной из первых лабораторий, аккредитованных на право осуществления экологического контроля токсичности отходов, а также почв, воды методами биотестирования, является лаборатория экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП) факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (www.letap.ru, letap.msu@gmail.com, тел./факс: (495) 939-28-63, тел. (495) 720-68-60). В области аккредитации нашей лаборатории наибольшее количество биологических показателей, по сравнению с другими аналогами в РФ.

Известны несколько десятков методик биотестирования, но не все они включены в Федеральный фонд по обеспечению единства измерений с рекомендациями для практического экологического контроля окружающей среды.

Приведем список некоторых стандартизованных методик биотестирования с указанием кодов регистрации и разработчиков, рекомендованных в настоящее время для целей экотоксикологического контроля, в разработке которых принимали участие сотрудники МГУ:

- ФР.1.39.2006.02506. ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06) Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Организации-разработчики: МГУ имени М.В. Ломоносова (ЛЭТАП). Авторы: А.А. Рахлеева, В.А. Терехова.
- ФР.1.31.2012.11560 Методика измерений биологической активности гуминовых веществ методом фитотестирования. Организации-разработчики: МГУ имени М.В. Ломоносова (ЛЭТАП), ИПЭЭ РАН, ООО "ЭкоБио Тест", АНО "Экотерра". Авторы: В.А. Терехова, О.С. Якименко, Л.П. Воронина, К.А. Кыдралиева.

ФР 1.39.2006.02505. ПНД Ф Т 14.1:2.14-06 (ПНД Ф Т 16.1:3.11-06) Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L.

Организации-разработчики: МГУ имени М.В. Ломоносова (ЛЭТАП и лаб. водной токсикологии), ЭАЦ "Экотерра".

Авторы: В.А. Терехова, Е.Ф.Исакова, Т.А. Самойлова, И.З. Ибатуллина.

ФР.1.39.2007.04104. ПНД Ф Т 16.3.12-07. Методика определения токсичности золошлаковых отходов методом биотестирования на основе выживаемости парameций и цериодафний.

Организации-разработчики: МГУ имени М.В. Ломоносова (ЛЭТАП), ОАО «Всероссийский теплотехнический институт».

Авторы: В.А. Терехова, Э.П. Дик, А.А. Рахлеева, А.Н. Соболева, В.М. Вавилова.

ФР.1.31.2009.06301; ПНД Ф 14.1:2:4:15-09 (16.1:2:2.3:3.13-09) Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов вод и отходов по изменению подвижности половых клеток млекопитающих *in vitro*.

Организации-разработчики: МГУ имени М.В. Ломоносова (ЛЭТАП), ЗАО БМК-ИНВЕСТ, АНО ЭКОТЕРРА, ИПЭЭ РАН.

Авторы: А.П. Еськов, М.А. Тимофеев, Р.И. Каюмов, В.А. Терехова.

ФР.1.37.2010.08619 (ПНД Ф Т 16.1.17-10) Методика выполнения измерений интенсивности потребления тест-субстратов микробными сообществами почв и почвоподобных объектов фотометрическим методом

Организации-разработчики: МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО Экологический центр «Эко-Терра».

Авторы: Горленко М.В. П.А. Кожевин.

ФР.1.39.2014.18039 Методика измерений токсичности почв по реакциям энхитреид.

Организации-разработчики: ИПЭЭ РАН, ООО «ЭкоБио Тест», МГУ имени М.В. Ломоносова (ЛЭТАП).

Авторы: И.А. Горшкова, К.Б. Гонгальский, В.А. Терехова.

Довольно популярными остаются следующие методики, разработанные специалистами- и других организаций:

ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний (ООО «Акварос»).

ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний (ООО «Акварос»).

ФР.1.39.2007.03223. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей (ООО «Акварос»).

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.7-04). Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). (Красноярский государственный университет).

ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.9-06). Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus. (Красноярский государственный университет).

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04). Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» на приборе «Биотокс-10» (ООО НЦ «Экологическая перспектива»).

ПНД Ф Т 16.2:2.2-98. Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий (АОЗТ «Спектр-М»).

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98. Методика определения токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий (АОЗТ «Спектр-М»).

Совместными усилиями кафедр биологического факультета и факультета почвоведения МГУ в ЛЭТАП создана и поддерживается коллекция стандартизованных культур тест-организмов разных трофических уровней и таксономической принадлежности.

Для целей биотестирования природных сред и техногенных объектов (почв, вод, отходов, наноматериалов, гуминовых препаратов и др.) в ЛЭТАП используются:

- простейшие: инфузории *Paramecium caudatum*;
- низшие ракообразные: дафнии *Daphnia magna*, цериодафнии *Ceriodaphnia affinis*, солоноватоводные артемии *Artemia salina*;
- микроводоросли: пресноводные – *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* и морские – *Phaeodactylum tricorutum*;
- бактерии: биолюминесцентная тест-система «Эколюм»; тест-система Эко-Лог;

- тест Эймса (генотоксичность, *Salmonella typhimurium*),
- млекопитающие: культура половых клеток быка *in vitro* (цитотоксичность), сперматозоиды);
- высшие растения: семена однодольных и двудольных.

Ведется работа по созданию и внедрению аналогов европейских вариантов хранения и распространения тест-культур (токс-китов). Токскиты – новое поколение биотестов, впервые широко внедренные в лаборатории биологических исследований загрязнения вод университета г. Гент (Бельгия) под руководством проф. Г. Персоон. Токскиты, предназначены для оценки токсичности проб сред и содержат тест-организмы в анабиотическом (спящем) состоянии (эфиппиумы дафний (resting eggs), покоящиеся яйца коловраток, яйца артемии, культуры водорослей), которые реализуются вместе со всеми материалами, необходимыми для культивирования.

Далее рассмотрим требования к содержанию наиболее востребованных тест-культур и условия проведения биотестирования.

ГИДРОБИОНТЫ: низшие ракообразные

Планктонные виды ветвистоусых рачков используются в лабораторном биотестировании с начала XX века. Они легко культивируются и имеют непродолжительный цикл развития, что делает их весьма привлекательными для биотестов. Наиболее часто используют отдельные виды дафний и цериодафний.

Самым распространенным видом, используемым для токсикологических исследований в РФ и других странах мира, является *Daphnia magna*. Наряду с этим широко используют вид *Ceriodaphnia affinis*, цикл развития которого в два раза короче, чем у дафний. Эксперименты с более мелкой цериодафнией компактны – требуются меньшие объемы растворов и посуды. Однако на более крупных дафниях удобнее вести наблюдения

Рачок *Daphnia magna* служит не только "датчиком", позволяющим непосредственно выявлять присутствие токсических агентов в водной среде, но и калибровочным эталоном для других методов и биосистем, рекомендуемых для целей биотестирования токсичности жидких сред.

Процедура испытаний с применением дафний не требует использования специального дорогостоящего оборудования, может производиться в обычном лабораторном помещении и в полевых условиях. Продолжительность испытаний - от нескольких часов до 21 суток (при необходимости получения заключений по влиянию на процессы размножения и для выявления отдаленных последствий). Методика с использованием дафний вошла в состав ряда методических указаний и рекомендаций по установлению ПДК, токсичности сточных и природных вод.

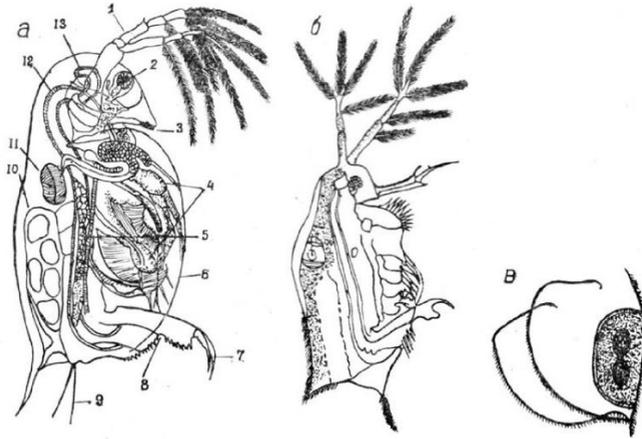
Рачки вида *Daphnia magna* Straus (класс *Crustacea*, отряд *Cladocera*) обитают в стоячих и слабопроточных водоемах, особенно часто - во временных лужах, и распространены повсеместно на территории России.

Характеристика *Daphnia magna*

Рачки вида *Daphnia magna* Straus (класс *Crustacea*, отряд *Cladocera*) обитают в стоячих и слабопроточных водоемах, особенно часто – во временных лужах, и распространены повсеместно на территории России.

Рост дафний в течение всей жизни неравномерный, с возрастом замедляется и связан с периодическими линьками; первые три – ювенильные – следуют через 20, 24, 36 ч, четвертая – созревание яиц в яичнике – и пятая – откладывание яиц в выводковую камеру – следуют с интервалом 2-3 сут. Начиная с шестой, каждая линька сопровождается откладыванием яиц. При хо-

рошем питания размеры молодых дафний после каждой линьки удваиваются. После наступления половой зрелости рост замедляется. Выметанная молодь имеет 0,7-0,9 мм в длину, к моменту половозрелости самки достигают 2,2-2,4 мм, самцы 2,0-2,1 мм. Максимальная длина тела самок может достигать 6,0 мм при сыром весе 7-10 мг.



Строение *Daphnia magna* Straus: а – самка; 1 – антенна, 2 – сложный глаз, 3 – антеннула, 4 – грудные ножки, 5 – яичник, 6 – створки панциря, 7 – каудальные когти, 8 – постабдомен, 9 – хвостовые щетинки, 10 – выводковая камера, 11 – сердце, 12 – кишечник, 13 – печеночные выросты; б – самец; в – внешний вид эфиппиума.

С момента рождения до наступления половозрелости дафний проходит 7-9 суток при температуре 20°С. Эмбиональное развитие из яиц длится 48 часов. В течение жизни дафния дает ряд пометов, которые при благоприятных условиях следуют один за другим через 2-е суток.

Большую часть года дафнии размножаются партеногенетически, производя потомство, состоящее преимущественно из самок. При наступлении неблагоприятных условий (изменении температуры, продолжительности светового дня, недостатке пищи, сильном повышении численности и т.д.) в популяции рачков появляются самцы и самки с гамогенетическими яйцами. После оплодотворения диплоидные “зимние яйца” (1-2) откладываются в эфиппиум (производное раковины). Эфиппиумы сбрасываются на дно водоема или прикрепляются к различным субстратам. Период партеногенетического размножения вместе с заключающим его двуполым размножением известен под названием цикла.

Источником питания дафний в природных водоемах являются бактерии, одноклеточные водоросли, детрит, растворенные органические вещества. Интенсивность потребления корма зависит от его характера, концентрации в среде, температуры, возраста рачков и т. д. Скопление пищи в желобе свидетельствует о неблагополучии в питании дафний, как и в случае, когда «сито» забито взвесью. Чрезмерно высокое содержание кормовых частиц снижает активность питания дафний, и они могут погибнуть вследствие засорения пищевого аппарата.

Daphnia magna является типичным бетамезосапробом, перенося осолонение до 6‰. Оптимальное содержание кислорода для дафнии составляет 7-8 мг/л, однако рачок способен переносить снижение концентрации O_2 до 2 мг/л, что связано с их способностью синтезировать гемоглобин. Повышение содержания гемоглобина в крови дафний отмечено при понижении концентрации растворенного кислорода. В этом случае рачки приобретают красноватый цвет вместо розовато-желтого при благоприятных условиях.

Оптимальные значения активной реакции среды pH составляют 7,0 – 8,0, однако временные изменения pH в пределах 5,8 – 9,0 не подавляют существенно жизнедеятельность дафнии.

При культивировании и проведении токсикологических опытов необходимо поддерживать непрерывное партеногенетическое размножение рачков, учитывая особенности биологического цикла развития.

Условия лабораторного содержания *Daphnia magna*

Работу с дафниями необходимо проводить в помещении, где не используются химические летучие вещества. Температуру поддерживают в пределах $20 \pm 2^\circ C$. Продолжительность светового дня – 10-12 часов.

Для культивирования дафний используют отстоянную водопроводную воду или воду из незагрязняемых водоемов. Природную воду необходимо процеживать через сито (№ 68-26-72) во избежание попадания простейших и коловраток, которые могут паразитировать на рачках. Водопроводной водой можно пользоваться после предварительного удаления из нее остаточного хлора путем длительного продувания воздуха с помощью микрокомпрессора (около 14 дней) и дальнейшей биологизацией в аквариуме с очищенным песком, небольшим количеством макрофитов и аквариумных рыбок (4 – 5 рыбок на 100 л воды).

Основные гидрохимические показатели воды, используемой для культивирования дафний, должны находиться в следующих пределах:

содержание кислорода 7-8 мг O_2 /л;

pH – 7,0-8,2 ;

окисляемость по Кубелю 4,2 – 5,8 мг O_2 /л;

общая жесткость: 3,0 – 6,5 мгэкв/л (20 ± 5 мгCaCO₃);
соотношение Ca/Mg 4:1.

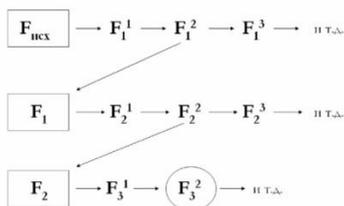
Кормление дафний проводится 1 раз в день. Водоросли для корма культивируют в стеклянных кюветах, матрасах или плоскодонных колбах при круглосуточном освещении лампами дневного света 3000-5000 лк и постоянном продувании культуры воздухом с помощью микрокомпрессоров. Через 7-10 сут, когда окраска культуры водорослей становится интенсивно зеленой, их отделяют от питательной среды путем центрифугирования или отстаивания в холодильнике в течение 2-3 сут. Светло-зеленый верхний слой сливают в отдельную колбу и используют для посева в дальнейшем (хранить не более 1 месяца). Осадок используют для кормления. Отдельные порции можно растворять в дистиллированной воде и хранить в холодильнике не более 14 сут. Водоросли вносят в культуру дафний из расчета 1 мл суспензии (600-1000 млн. кл/мл) на 1 л воды.

Также 1-2 раза в неделю дафний кормят хлебопекарными дрожжами. Для приготовления дрожжевого корма 1 г свежих или 0,3 г воздушно-сухих дрожжей заливают 100 мл дистиллированной воды. После набухания дрожжи тщательно перемешивают. Образовавшуюся суспензию отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в сосуды с дафниями в количестве 3 мл на 1 л воды.

Для культивирования рачков удобны небольшие стеклянные кристаллизаторы объемом 1-3 л, плотность посадки 20 – 25 особей на 1 л. Появившуюся молодь в необходимом количестве отсаживают в следующие сосуды от поколения к поколению. Когда вновь народившиеся рачки начинают размножаться, материнские особи удаляют. Каждое поколение маркируют и ставят дату рождения. Одновременно в лаборатории содержат культуры двух поколений дафний.

Рачки, отловленные в водоеме или полученные из лаборатории других организаций, необходимо адаптировать к условиям новой лаборатории. Для этого необходимо получить культуру дафний 3-го поколения. Схема получения необходимого поколения приведена на рисунке:

Получение синхронной культуры дафний



Процедура биотестирования на *Daphnia magna*

Необходимые материалы для постановки эксперимента

- Сосуды 1 л для разведения культуры рачков
- Стаканы 150 мл, для постановки опыта, по 3 шт на каждую пробу или её разведение
- Пипетки пластиковые или стеклянные для отлова молоди
- Сито или мельничный газ для отделения молоди от взрослых самок

Требования к тест-культуре

Для токсикологических испытаний используют дафний, начиная с третьего поколения, полученного в лаборатории. Перед проведением эксперимента оценивают устойчивость рачков к бихромату калия, и по величинам LK_{50} за 24 ч определяют соответствие культуры стандарту. Эта концентрация для дафний в возрасте 18 ± 6 ч должна находиться в пределах $0,9 - 2,0$ мг/л.

Оценка острой токсичности

Основная цель острых экспериментов на дафниях – установить токсичность исследуемых проб воды, водных вытяжек из почв и т.д. по выживаемости тест-организмов. Продолжительность опыта – 96 ч.

В экспериментальные стеклянные стаканы заливают исследуемые растворы в количестве по 100 мл и помещают по 10 односуточных дафний. Рачков за 2 часа до опыта кормят. Опыт идет без кормления. Повторность опытов в предварительном варианте составляет 2-3, а в окончательном – не менее трех.

Основной показатель, исследуемый в остром опыте – выживаемость рачков. В качестве дополнительных показателей в остром опыте можно учитывать поведенческие реакции у дафний, как приведено в таблице.

Наступление гибели рачков отмечают либо по наступлению клинической смерти, либо по состоянию иммобилизации (неподвижности), так как эта стадия не обратима.

При необходимости дополнительных исследований проводят оценку хронической токсичности, где экспозиция определяется временем появления четырех пометов у контрольных дафний, что составляет обычно около 20 сут. Общее количество народившейся жизнеспособной молоди от одной самки отражает величину реальной (фактической) плодовитости дафний.

Учет и анализ результатов

По результатам острых опытов определяют концентрацию вещества, вызывающую гибель 50% подопытных животных за 96 ч экспозиции (LK_{50}). Наиболее простым и часто применяемым для определения LK_{50} является графический метод. В системе координат по оси ординат откладывают величину выживаемости (гибели) дафний в процентах за заданный срок опытов, а по оси абсцисс – логарифм концентрации. Точка пересечения горизонтальной прямой, соответствующей 50% выживаемости рачков, с экспериментальной линией определит искомую концентрацию LK_{50} .

Более точное определение LK_{50} может проводиться с использованием пробит-анализа.

Результаты опытов дают возможность оценить также наличие острой токсичности по концентрациям (разведениям проб), вызывающим достоверное снижение выживаемости рачков по сравнению с контрольными и определить максимальную концентрацию, при которой острая токсичность не проявляется (достоверность отклонений определяется обычными методами вариационной статистики).

Достоверность получаемых результатов в остром опыте можно считать надежной, если удовлетворены следующие условия:

- гибель контрольных дафний не превышает 10%;
- LK_{50} бихромата калия за 24 ч для дафний в возрасте 18 ± 6 ч находятся в диапазоне 0,9 – 2,0 мг/л;
- содержание растворенного кислорода, определенное в конце опыта, составляет не ниже 2,0 мг O_2 /л.

Эта величина, в конечном итоге, определяет сохранность вида и играет решающую роль при оценке токсичности.

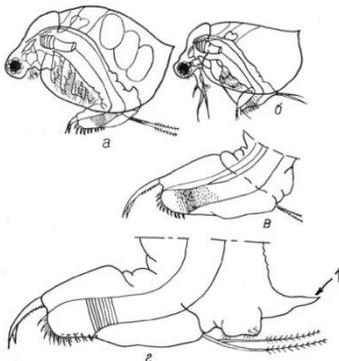
На основании результатов биотестирования по выживаемости рачков делают вывод об уровне острой токсичности исследуемых проб. Определение концентраций (разведений), не обладающих хроническим токсическим действием, базируется на оценке двух показателей: выживаемости и плодовитости дафний.

Характеристика *Ceriodaphnia affinis*

Этот вид распространен по всему земному шару, на территории России – повсеместно, кроме южных районов Азиатского региона. *C. affinis* населяет преимущественно небольшие, неглубокие озера, пруды, реки с замедленным течением. Встречается реже чем другие виды цериодафний, в основном в ли-

торальном планктоне – на открытых местах или между зарослями тростника и погруженными растениями, над заиленным дном. Обнаружена в каменистых лужах побережий полярных морей.

Внешний вид и основные органы *Ceriodaphnia affinis*



Строение *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg:

а – самка,

б – самец,

в – постабдомен самца,

г – постабдомен самки (1 – конусо-видный абдоминальный вырост).

Сроки созревания и эмбриогенез у цериодафний протекают в два раза быстрее, чем у дафний. При температуре 22-24° С цериодафнии становятся половозрелыми на 4-5 сутки, первый помет – соответственно на 5-6 сутки, очередной вымет молоди происходит через 1-1,5 суток. Таким образом, появление 3 пометов у рачков возможно за 7-10 суток. Численность молоди в пометах возрастает от 2-6 особей в первых двух пометах до 10-20 особей начиная с третьего помета.

Средняя продолжительность жизни *C. affinis* При температуре 22° С составляет 25±2 суток. С увеличением температуры средняя продолжительность жизни рачков снижается.

Этот вид цериодафний моно- или дицикличен. Максимум полового периода приходится на август – сентябрь. Эфиппиум с одним покоящимся яйцом. В лабораторных условиях самцы появляются при недостаточном освещении, снижении температуры, концентрации растворенного кислорода и голодании.

Условия лабораторного содержания *Ceriodaphnia affinis*

Исходный материал для лабораторной культуры цериодафний можно получить в учреждениях-разработчиках методики или в водоеме.

Культуру цериодафний выращивают в климатостате, люминостате, боксе или помещении, в котором отсутствуют токсические пары или газы. Оптимальные условия для содержания цериодафний: температура 23±1° С, освещенность 400-600 лк. Продолжительность светового дня – 10-12 часов.

Для культивирования цериодафний используют дехлорированную, отстоянную, биологизированную водопроводную воду, которая должна удовлетворять следующим требованиям: рН 7,0-8,2, общая жесткость 1,3-2,0 мг экв/л, содержание растворенного кислорода – не менее 5,0 мг/л.

Рекомендуется содержать культуру цериодафний в кристаллизаторах объемом 0,5-1 л, которые заполняют водой наполовину.

Каждые 15-20 сут культуру цериодафний обновляют. Для этого отбирают 20-30 особей молоди и помещают в сосуды для культивирования, заполненные водой из расчета 20-30 мл на одну особь. Через 5 суток, когда молодь начинает размножаться, родительскую культуру выбрасывают.

Культивирование цериодафний идет благоприятно, если в течение 10 суток после рождения гибель рачков не превышает 20%, а численность молоди в первых трех пометах в пересчете на самку – не менее 15 особей. Отклонения от этих параметров свидетельствуют о нарушении условий культивирования – качества воды и/или корма.

Ежедневно цериодафний кормят суспензией зеленых водорослей, раз в неделю – суспензией хлебопекарных дрожжей (см. раздел «Условия лабораторного содержания» *Daphnia magna*).

Для биотестирования используют молодых особей в возрасте 4-24 ч после рождения. Разница в возрасте мальков цериодафний одной выборки не должна превышать 8 ч.

За два часа до начала опыта молодь кормят.

Чтобы получить одновозрастных цериодафний, из основной культуры отлавливают 10-20 половозрелых самок в возрасте 7-10 суток и помещают по одной в стеклянные сосуды для культивирования и кормят ежедневно. Полученную от них молодь используют в опыте. Или за неделю до эксперимента новорожденную молодь рассаживают в стаканы (как в предыдущем варианте) до получения 3-го или 4-го помета, который используют в опыте.

Выметанную самками одновозрастную молодь изымают из сосудов, часть используют для биотестирования, а оставшуюся удаляют.

Процедура биотестирования на *Ceriodaphnia affinis*

Биотестирование проводят в климатостате, люминостате, боксе или помещении, в котором обеспечиваются оптимальная освещенность (400-600 лк) и температура ($23 \pm 1^\circ \text{C}$). Результаты биотестирования считают правильными, если гибель цериодафний в контроле за весь период наблюдений не превышает 10% и концентрация растворенного кислорода в тестируемой воде к концу биотестирования составляет не менее 4,0 мг/л.

Необходимые материалы для постановки эксперимента

- Сосуды 0,5-1 л для разведения культуры рачков
- Стаканы 50 мл (или бакпечатки) для постановки опыта, по 5 шт на каждую пробу или её разведение
- Пипетки пластиковые или стеклянные для отлова молодежи
- Сито или мельничный газ для отделения молодежи от взрослых самок
- Лупа или увеличительное стекло

Требования к тест-культуре

Для токсикологических испытаний используют цериодафний, начиная с третьего поколения, полученного в лаборатории. Перед проведением эксперимента оценивают устойчивость рачков к бихромату калия, и по величинам LK_{50} за 24 ч определяют соответствие культуры стандарту. Эта концентрация для цериодафний должна находиться в пределах 1-2,2 мг/л.

Для определения LK_{50} за 24 ч готовят серию концентраций бихромата калия: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/л. В стаканы с 15 мл раствора помещают по 1 цериодафнии (повторность 10-кратная) и через сутки подсчитывают число выживших рачков. По результатам опыта определяют LK_{50} за 24 ч (см. раздел «Учет и анализ результатов»).

Оценка острой токсичности

Основная цель острых экспериментов на цериодафниях – установить токсичность исследуемых проб воды, водных вытяжек из почв и т.д. по выживаемости тест-объекта. Кроме того, устанавливается разбавление, начиная с которого следует проводить хронические эксперименты.

Продолжительность острого опыта 48 ч.

При биотестировании используют по 10 сосудов для контрольной, тестируемой воды и ее разбавлений. В каждый сосуд соответственно наливают по 15 мл контрольной, тестируемой воды или ее разбавлений и помещают по одной молодой цериодафнии.

Вначале помещают цериодафний в контрольную, а затем в тестируемую воду. При тестировании серии разбавлений посадку ведут от большего разбавления к меньшему.

Учет выживших цериодафний проводят через 1, 6, 24 и 48 ч от начала биотестирования. Особей считают выжившими, если они свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позднее 15 с после его легкого покачивания. Если в любой учитываемый период времени в сточной воде гибнет 50 и более процентов выборки особей, биотестирование прекращают. В течение 48 ч цериодафний не кормят.

Основной показатель, исследуемый в остром опыте – выживаемость рачков. Исследования хронической токсичности по реакции цериодафний проводят для глубокого, более детального исследования токсичности проб. Продолжительность опытов определяется временем появления четырех пометов у контрольных рачков, что составляет около 10 суток.

Учет и анализ результатов

По результатам острых опытов определяют концентрацию вещества (разведение пробы), вызывающую гибель 50% подопытных животных за 48 ч экспозиции (LK_{50}).

Графически может быть определено также для каждой концентрации вещества медианное время выживания (LK_{50}).

Результаты опытов дают возможность оценить также наличие острой токсичности по концентрациям (разведениям проб), вызывающим достоверное снижение выживаемости рачков по сравнению с контрольными и определить максимальную концентрацию, при которой острая токсичность не проявляется (достоверность отклонений определяется обычными методами вариационной статистики).

Достоверность получаемых результатов в остром опыте можно считать надежной, если удовлетворены следующие условия:

- гибель контрольных цериодафний не превышает 10%;
- LK_{50} бихромата калия за 24 ч для цериодафний в возрасте находятся в диапазоне 1 – 2,2 мг/л;
- содержание растворенного кислорода, определенное в конце опыта, составляет не ниже 4,0 мг O_2 /л.

При углубленных исследованиях определяют хроническую токсичность, где основными показателями токсического действия являются выживаемость, плодовитость и качество потомства.

Характеристика *Artemia salina*

Нередко при биотестировании приходится иметь дело с пробами водных вытяжек из образцов высокоминерализованных почв, отходов или морских вод, загрязненных токсикантами. Другими словами, приходится выявлять степень токсичности на фоне повышенной минерализации растворов, в которых пресноводные организмы гибнут именно из-за наличия высокого количества солей. Для этой цели разрабатываются тест-системы, включающие морские организмы или виды, адаптированные к обитанию в условиях повышенной минерализации. Таким тест-организмам может быть давно известный и широко применяемый экотоксикологами вид ракообразных из рода артемий.

Специально для анализа экотоксичности высокоминерализованных почв и отходов, сбрасываемых, например, в моря и океаны, актуализирована в настоящее время «Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L.» ФР 1.39.2006.02505.

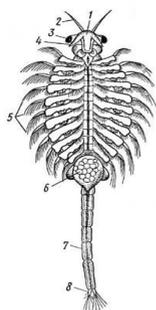
Методика, разработанная сотрудниками ЛЭТАП и лаборатории водной токсикологии МГУ, рекомендована для определения острой токсичности высокоминерализованных водных вытяжек из почв и отходов, поверхностных и сточных вод, по реакции солоноватоводных рачков *Artemia salina* L. с уровнем солености от 6‰ и выше.

Характеристика артемий

Жаброногий рачок *Artemia salina* – широко распространенный эвригалинный вид. Тело артемий удлинненное, не имеет раковины, состоит из многочисленных, ясно различимых сегментов, хорошо подразделяется на отделы: голову, тункус, несущий листовидные ножки (11 пар), и тельсон (или абдомен).

Голова с двумя стебельчатыми сложными глазами и одним непарным науплиальным глазом. 2-я антенна у самцов большая и крючкообразная, превращена в хватательный орган. Абдомен закачивается фуркой, состоящей из 2 фуркальных пластинок, покрытых щетинками. (Липин, 1950, Определитель пресноводных беспозвоночных..., 1995). Размеры тела: 0,5 – 1,5 см (от науплия до взрослой особи).

У этих рачков выражен половой диморфизм, самцы и самки отличаются окраской и строением и размером антенн, которые у самцов значительно больше.



- 1 – науплиальный глаз
- 2 – антеннула
- 3 – фасетированный глаз
- 4 – антенна
- 5 – грудные ножки
- 6 – яйцевой мешок
- 7 – абдомен (брюшко)
- 8 – фурка (вилочка)

Получение исходного материала, выращивание культуры, содержание, кормление

Исходным материалом для биотестирования на артемиях служат науплии в возрасте до 24 часов, полученные в лаборатории из покоящихся яиц. Науплии

артемий легко получают в очень широком диапазоне солености из яиц (цист), которые могут храниться продолжительное время в холодильнике. Сухие яйца артемий приобретают в зоомагазинах, в специализированных на рыбоводстве или аквариумистике фирмах, а также в других лабораториях, занимающихся биотестированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности, с диапазоном чувствительности к стандартному токсиканту в определенном диапазоне, а измеряемые с помощью этой культуры тест-параметры соответствуют метрологическим характеристикам. При покупке артемий в зоомагазине необходимо учитывать, что для биотестирования нужны не декапсулированный цисты. Также не стоит хранить цисты более 2-3 лет, поскольку при этом снижается выклев.

Сухие яйца артемий заливают отстоянной водопроводной водой (1-3 г яиц на 500 см³ воды). Через 30 минут сливают слой воды над осевшими яйцами, при этом удаляют всплывшие нежизнеспособные яйца и пустые оболочки яиц. Очистку повторяют несколько раз. Затем яйца несколько раз промывают морской водой. Промытые яйца помещают в термолюминостат для выклева. При температуре (23±2)°С науплии появляются через 24-36 часов. Для синхронизации культуры первых науплиев отбрасывают. В опыте используют рачков, полученных в течение следующего часа и выдержанных в течение 2 часов (таким образом возраст рачков к началу опыта – 2,5±0,5 часа).

В первые дни жизни науплии находятся на эндогенном питании, поэтому, при выявлении острой токсичности при 48 ч экспозиции кормить мальков не надо.

Приготовление морской воды. Для выклева артемий можно использовать раствор поваренной (нейодированной) соли (NaCl), или морскую соль (можно приобрести в аптеке). Готовят исходный раствор соленостью 30‰ так: соль растворяют в дистиллированной воде, затем отстаивают и аэрируют не менее недели. Не позднее чем за сутки до начала опыта исходный раствор разбавляют дистиллированной водой до необходимой солености, отстаивают и аэрируют.

Существует целый ряд *способов повышения выклева* артемии. Самый простой из них – промораживание. Даже одни сутки в морозильной камере холодильника незадолго до инкубации способны повысить процент выклева рачков. Активация биологических процессов холодом у беспозвоночных призвана имитировать зимний период покоя. Наилучшие результаты дает промораживание яиц артемии при температуре минус 20-25°С в насыщенном растворе соли в течение 1-2 месяцев в морозильной камере. Перед началом инкубации яйца вынимают из морозильника и оставляют на 3-4 дня при комнатной температуре.

Другой способ – обработка перекисью водорода. Яйца замачивают в 3%-ном растворе перекиси в течение 15-30 минут, затем промывают и помещают в инкубатор. Можно часть яиц высушить и хранить несколько дней для порционной закладки. При отсутствии морозильной камеры этот способ является наилучшим.

Культивирование артемий

В возрасте 3 – 4 суток (метанауплис III) науплиусы переходят на активное питание и совершают первую линьку. В зависимости от температурных условий артемии достигают половозрелости через 3-4 недели после выклева из яиц.

Артемии являются фильтраторами. Взрослым особям пищей служат мелкие планктонные организмы (одноклеточные водоросли, бактерии) и частицы детрита. В качестве корма рекомендованы культуры одноклеточных водорослей *Phaeodactylum uviella* (эксувиелла) и *Nephrochloris salina* (Временные методические рекомендации..., 1999). Также удобно использовать одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella* sp. Культивировать морские водоросли можно на средах Гольдберга, F/2.

Артемию кормят 2-3 раза в неделю. Суспензию водорослей добавляют до появления светло-зеленой окраски воды (соответствует примерно 100 тыс. кл/мл). В дополнение к водорослевому корму можно использовать сухие пекарские дрожжи. Для приготовления суспензии 0,3 г дрожжей растворяют в 100 мл морской воды и отстаивают некоторое время до оседания мутного осадка. Суспензия дрожжей хранится в холодильнике не более 3 дней. Артемию кормят из расчета 1 мл суспензии на 500 мл воды.

Взрослые рачки способны откладывать зимние яйца – цисты. Для этого достаточно просто оставить аквариум с артемиями до полного высыхания воды. Это действие имитирует естественное высыхание водоемов, и повышение солености воды стимулирует рачков к откладыванию цист.

Необходимые материалы для постановки эксперимента

- Стаканы 150 мл для разведения культуры
- Бакпечатки или стаканы 50 мл постановки опыта, по 5 шт на каждую пробу или её разведение
- Пипетки пластиковые или стеклянные для отлова молоди
- Лупа или увеличительное стекло

Процедура биотестирования на *Artemia salina*

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводят в пяти параллельных сериях. В качестве контроля исполь-

зуют пять параллельных серий с культивационной водой. В качестве культивационной воды используют отстоянную водопроводную воду с добавлением NaCl (или морской соли), соответствующей солености, т.е. идентичной солености тестируемой пробы. Биотестирование проводят с соблюдением требований к температуре – $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, и качеству культивационной воды.

Для биотестирования используют бакпечатки или другие широкогорлые сосуды, в которые наливают по 10-15 см³ испытуемой жидкости или культивационной воды (контроль). В каждую из 5 бакпечаток помещают по 4 особи артемии, таким образом, в целом, в каждом эксперименте и контроле используют по 20 особей.

Сосуды с рачками оставляют на 48 часов при температуре $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$. По истечении этого времени производят подсчет выживших и погибших особей. Выжившими считают артемии, которые свободно перемещаются в толще воды. Обездвиженных особей относят к погибшим. Результаты наблюдений записывают в рабочий журнал.

Если гибель артемий в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитывают и его повторяют. После того, как результаты эксперимента учтены, все артемии выбрасывают, посуду промывают водой (температура не выше 40°C), споласкивают дистиллированной водой.

Требования к чувствительности тест-культуры

Для каждой новой партии цист артемий, а также ежеквартально, определяют диапазон чувствительности тест-культуры к стандартному токсиканту – бихромату калия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Определяют концентрацию токсиканта, при которой за 48 часов гибнет 50% подопытных организмов: летальную концентрацию $\text{ЛК}_{50}(48)$. Диапазон концентрации $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, при действии которого в течение 48 часов должны погибнуть 50% артемий, составляет $(2,0 - 7,0)$ мг/дм³.

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования организмов на другие токсиканты и тем более их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, и нарушения, допускаемые в процессе культивирования организмов и условиях проведения опытов.

Обработка и оформление результатов

При определении острой токсичности исследуемых проб, а также их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель 50% особей за 48 часовую экспозицию – ЛКР_{50} ;

- безвредное разбавление пробы, вызывающее гибель не более 10% особей за 48 часовую экспозицию БКР₁₀.

Для оценки острой токсичности пробы рассчитывают процент погибших особей (A,%) по формуле $A = (X_i/X_t) \times 100$, где X_i – количество исходных особей; X_t – количество погибших особей в тестируемой воде через 48 часов.

За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов пяти параллельных определений.

ГИДРОБИОНТЫ: водоросли

Водоросли, как и высшие водные растения, представляют в водных экосистемах группу организмов-продуцентов. Им принадлежит ведущая роль в синтезе органического вещества, а также в формировании качества природных вод, что обусловило их широкое применение для оценки токсичности веществ различных классов (тяжелых металлов, хлора, фосфоро- и хлороорганических соединений, поверхностно-активных веществ и др.). Все эти факторы обусловили включение водорослей в число обязательных объектов исследований по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ в воде, а также при определении класса опасности сточных вод.

Метод биотестирования с применением культуры водорослей основан на определении изменения их характеристик (прироста численности параметров, флуоресценции и др.) в опытной пробе (при воздействии токсикантов) относительно контроля.

Характеристика видов водорослей для биотестирования

Для биотестирования не соленых проб наиболее часто используются следующие виды.

Scenedesmus quadricauda. Данный вид относится к ценобиальным организмам. Ценобии 2-, 4-, реже 8, 16-клеточные, в виде плоских пластинок. Клетки удлинено-овальные, с закругленными концами. Краевые клетки имеют два отогнутых наружу рога. Оболочка гладкая. Хроматофор периферический с одним боковым пиреноидом, ядро центральное. Оболочка гладкая. Размножение при помощи автоспор. Иногда (особенно в условиях культуры) вместо ценобиов образуются отдельные клетки. Вид широко распространен в разнообразных биотопах, главным образом – в планктоне пресных водоемов.

Chlorella vulgaris. Хлорелла относится к одноклеточным водорослям. Клетки шаровидные с тонкой оболочкой, без слизи. Хроматофор чашевидный, с пиреноидом. Размножение автоспорами, образующимися по 4-8, реже по 16 внутри материнской клетки и освобождающимися через разрыв ее оболочки. Широко распространенный в планктоне пресных водоемов вид.

Selenastrum capricornutum. Одноклеточная коккоидная зеленая водоросль. В настоящее время видовое название изменено на *Pseudokirchneriella subcapitata* (Hindak, 1990).

Для биотестирования засоленных сред, как правило, используют культуру морской одноклеточной диатомовой водоросли – ***Phaeodactylum tricornutum***.

Культивирование водорослей

Для биотестирования используют нормально развивающуюся культуру водорослей (~30-50 тыс.кл/мл), частично синхронизированную чередованием «дня» и «ночи», содержащую не менее 90% живых клеток и находящуюся в фазе логарифмического роста. Для этого предварительно (за 3-5 сут до опыта) водоросли пересевают в новую питательную среду.

Водоросли выращивают на питательных средах со специально подобранным для разных систематических групп минеральным составом, используя реактивы с маркировкой не ниже хч (обычно ср. Успенского №1). Среды для культивирования пресноводных видов стерилизуют в автоклаве или слабым кипячением в течение 20-30 мин.

Состав питательной среды Успенского №1

Реактивы	Содержание в среде для культивирования, г/л
KNO_3	0,025
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,025
KH_2PO_4	0,025
K_2CO_3	0,0345
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,1
A: H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,222
B: MoO_3	17,64
NH_4VO_3	22,96

Среды для биотестирования на морских водорослях готовят на природной или искусственной морской воде нужной солености (обычно 20‰, что соответствует средней солености морской воды в шельфовой зоне), стерилизуют трехкратной пастеризации на водяной бане при 70 °С, рН после стерилизации 7,0–7,3.

Водоросли культивируют в стеклянных конических колбах емкостью 100-250 мл (с полезным объемом 50-100 мл, соответственно). В эти колбы вносят среды с культурами клеток и помещают в люминостат при освещенности 3,5 тыс. люкс со сменой дня и ночи (12:12 часов).

Оптимальный режим предусматривает культивирование при температуре 20 ± 2 °С в люминостате или климатостате. Для обогащения культуры углекис-

лым газом (необходимым для нормального протекания процесса фотосинтеза) и уменьшения оседания клеток водорослей и их прилипания к стенкам сосуда содержимое колб перемешивают два раза в сутки (или на качалке). Поскольку при повышении температуры до 25 °С градусов токсичность веществ повышается, а при понижении до 12–15 °С, наоборот, уменьшается, то одной из рекомендаций при проведении токсикологического эксперимента на водорослях является создание термостатируемых условий (по возможности).

Проверка пригодности культуры водорослей к биотестированию

Периодически (один раз в два месяца) необходимо проверять чувствительность культуры водорослей к эталонному токсиканту бихромату калия — $K_2Cr_2O_7$. Бихромат калия в концентрациях 1,3–2,5 мг/л за 48 ч должен вызвать 50%-ное снижение численности клеток микроводорослей. Если результаты опытов не укладываются в указанный интервал, следует проверить правильность приготовления исследуемых растворов, температуру и состояние культуры водорослей.

Необходимые материалы для постановки эксперимента

- Колбы 50 или 100 мл, по три шт на каждую пробу или её разведение
- Дозаторы пипеточные или пипетки
- Камера Горяева и покровные стёкла
- Микроскоп оптический с увеличением $\times 200$ (для ручного подсчёта клеток)
- Флюориметр Фотон-10 (для определения интенсивности фотосинтеза)

Процедура биотестирования

В большую колбу объемом 1,5-2 л с предварительно приготовленной средой Успенского №1 стерильно вносят плотную суспензию водорослей до получения численности 50-100 тыс. кл/мл (светло зеленое окрашивание). Объем среды для культивирования водорослей определяется количеством опытных и контрольных колб. Например, для постановки опыта с пятью концентрациями токсиканта в трехкратной повторности для каждой концентрации и контроля потребуется 1,8 л культуры водорослей, если объем пробы 100 мл.

Культуру водорослей стерильно разливают по опытным колбам (по 50 или 100 мл, в зависимости от объема колбы) и добавляют объем раствора токсиканта, необходимый для создания той или иной его концентрации в пробе. Колбы помещают в люминостат или в хорошо освещенное место, защищенное от прямых солнечных лучей. Через 72 ч биотестирование заканчивают. В каждой колбе учитывают численность клеток для определения наличия острого токсического действия сточной воды.

При необходимости в отсутствии острого токсического действия исследуют наличие хронической токсичности, для чего биотестирование продолжают до 10-14 сут.

Учет и анализ результатов биотестирования

Токсичность веществ для водорослей можно фиксировать по целому ряду показателей – побурение, посветление, лизис культуры клеток, изменение pH среды в культуре; определение соотношения живых и мертвых клеток водорослей методом люминесцентной микроскопии и пр. Для более полной оценки токсического действия веществ, кроме вышеперечисленных, дополнительно можно использовать такие показатели как определение биомасса водорослей (расчетным способом по объему клеток); определение содержания фотосинтетических пигментов – хлорофиллов, каротиноидов (с помощью экстрагирования ацетоном в ацетоне); определение интенсивности фотосинтеза (с помощью флуориметра); скорость деления клеток водорослей (расчет генераций) и многие другие физиологические и биохимические показатели.

Для целей практического экоконтроля аттестованными методиками предписывается определение изменения прироста численности клеточной популяции водорослей или флуоресцентных показателей в опыте относительно контроля.

Общее число клеток считают в камере Горяева (для культур пресноводных микроводорослей) или Нажотта (для культур морских микроводорослей). Стандартный объем данных камер 0,0001 мл (камера Горяева) и 0,1 или 0,3 мл (камера Нажотта). При невысокой исходной плотности культур (5-10 тыс. кл/мл) для просчета численности клеток целесообразно использовать счетные камеры большего объема (камеры Нажотта). Камеру и покровное стекло хорошо отмывают и обезжиривают, покровным стеклом накрывают камеру и притирают его до образования радужных колец интерференции. Тем самым создается фиксированный объем просчитываемой пробы. Из каждой колбы пипеткой или стеклянной палочкой аккуратно наносят по одной капле тщательно перемешанной суспензии водорослей на верхний и нижний края покровного стекла. При этом заполняется верхняя и нижняя счетные области камеры. Очень важно, чтобы при заполнении камеры не образовывались пузырьки воздуха, поскольку в этом случае объем пробы будет меньше вместимости камеры и точно определить число клеток водорослей в 1 мл просчитываемой пробы уже не удастся. Избыток жидкости вытесняется по канавкам камеры и осторожно удаляется фильтровальной бумагой.

При работе с камерой Горяева удобно просчитать количество клеток в 25 больших квадратах, а затем провести пересчет на 1 мл (= 1 см³) по следующей

формуле: $X = m \cdot 10^4$, где X – общее количество клеток в 1 см^3 ; m – количество (сумма) клеток в 25 больших квадратах. Количество клеток выражают в тысячах и миллионах на 1 мл.

Учет численности клеток также можно проводить в камере Фукса-Розенталя объемом 3,2 мл. Техника заполнения камеры Фукса-Розенталя такая же, как и при работе с камерой Горяева, поскольку и при использовании этой камеры нам важно создать постоянный объем просчитываемой пробы.

При высокой численности клеток просчитывают по диагонали 16 квадратов, при малой – ведут просчет по всему полю камеры. Количество клеток также выражают в миллионах в 1 мл (или в миллиардах в 1 л). Расчет числа клеток проводят по формуле:

$$M = \frac{m \cdot 10^3}{n \cdot V},$$

где M – количество клеток в 1 мл; m – количество просчитанных клеток (сумма); n – количество просчитанных маленьких квадратов камеры; V – объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата.

Определение интенсивности фотосинтеза клеток водорослей

Помимо методов прямого подсчета клеток водорослей в камере Горяева возможно измерение фотосинтетической активности клеток с использованием отечественных и импортных приборов (флюориметр Фотон-10 или различных РАМ).

Данный метод основан на том, что при внесении загрязняющих веществ происходит резкое изменение флюоресценции хлорофилла в клетках. Регистрируемая величина – квантовый выход флюоресценции является количественной мерой токсичности пробы по отношению к контролю.

На основе данного метода в РФ разработана и аттестована для целей государственного экологического контроля экспресс-методика биотестирования токсичности вод и отходов с использованием флюориметра Фотон-10 (ПНД Ф 14.1:2.4.16-09 16.1:2.3.3.14-09). В качестве тест-культуры используется культура водоросли хлорелла. Длительность анализа с учетом одночасовой экспозиции клеток водоросли в тестируемой пробе не превышает 1,5 часов.

В Европе и США используется методика исследования токсичности проб с использованием приборов серии РАМ согласно требованиям OECD. Исследуется фотосинтетическая активность тест-культуры после 4 часовой экспозиции.

Для характеристики функционального состояния фотосинтетического аппарата водорослей часто используют метод регистрации *замедленной люминесценции* (флуоресценции) хлорофилла *in vivo* $I_{\text{макс}} \cdot II_{\text{макс}}$, где $II_{\text{стац}}$ – стационар

нарный уровень свечения, когда фотосинтез максимален («световое» состояние).

Метод замедленной люминесценции позволяет также судить о росте или, наоборот, снижении устойчивости клеток водорослей к токсическому воздействию. Для этого при нагревании со скоростью 5° в минуту от 20 до 60°C регистрируется так называемая температурная зависимость флуоресценции. На полученной кривой отмечают температуру положения максимума замедленной люминесценции. Рост термоустойчивости означает повышение общей устойчивости клеток к повреждающим, в том числе токсическим, воздействиям.

Эффективную концентрацию (ЭК_{50}) можно определять пробит анализом или графическим способом. Для этого на графике, отражающем связь эффекта с концентрацией, определяют точку, соответствующую значению пробита 5 (50%-ный эффект), и опускают из нее перпендикуляр на ось концентраций. Место пересечения этого перпендикуляра с осью X и есть искомая величина логарифма концентрации ЭК_{50} .

Некоторые особенности реагирования микроводорослей на токсическое воздействие

В физиологической литературе отмечается, что пропорциональность (или линейность) ответа водорослей на действие повреждающего фактора наблюдается редко. Обычно же реакция носит сложный характер и выражается в фазности реагирования. При этом характер реагирования живой системы представляют двух-, либо трехфазной кривой.

Среди водных растительных организмов широко распространена адаптация к токсикантам (пестицидам и тяжелым металлам). Поэтому необходимо крайне осторожно подходить к оценке токсичности тех или иных веществ для водорослей, особенно принимая во внимание тот факт, что у быстро размножающихся планктонных организмов возникающие функциональные изменения могут легко закрепляться в ряду поколений, приобретая необратимый характер и способствуя тем самым возникновению токсикорезистентных популяций.

Часто при проведении биотестирования сточных и природных вод наблюдается эффект стимуляции, т.е. превышение численности клеток водорослей в опыте по сравнению с контролем. Интерпретация таких данных представляет собой некоторые трудности, поскольку наблюдаемый эффект может быть связан как с присутствием в воде питательных веществ, так и с некоторыми особенностями действия токсиканта.

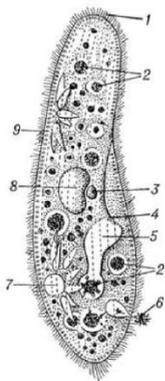
Анализ подобных результатов проводят в зависимости от методики биотестирования. Так, при краткосрочном биотестировании и определении класса опасности сточной воды или почвенных вытяжек допустимой считается стимуляция численности до 30% от контроля. В длительном хроническом эксперименте с целью определения недействующих концентраций токсикантов эффект стимуляции не учитывается только в том случае, если численность клеток водорослей в анализируемой пробе статистически недостоверно отличается от таковой в контроле.

ГИДРОБИОНТЫ: простейшие

Простейшие инфузории – одноклеточные организмы размером 120-300 мкм. Тело сигарообразной или веретенообразной формы, покрытое плотной оболочкой (пелликулой). Передний конец закруглен, задний заострен.

Характеристика *Paramecium caudatum*

Paramecium caudatum – массовый вид, обитающий в пресной воде с высоким содержанием органических веществ. В сточной воде является часто основным видом, полиальфа-мезосапробом. Простейшие, в том числе ресничные инфузории, играют весьма значительную роль в функционировании экосистем и жизни человека. В водоемах они питаются бактериями и гниющими органическими остатками, очищая воду (санитарная роль), сами же являются пищей для многих животных.



Строение *Paramecium caudatum*:

- 1 – реснички;
- 2 – пищеварительные вакуоли;
- 3 – микронуклеус;
- 4 – ротовое отверстие;
- 5 – глотка;
- 6 – содержимое анальной вакуоли;
- 7 – резервуар сократительной вакуоли;
- 8 – макронуклеус;
- 9 – трихоцисты.

Острое токсическое действие исследуемой пробы определяют по смертности (летальности) инфузорий за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности пробы служит гибель 50% и более парамеций за 24 ч, при условии, что в контроле гибель особей не превышает 10%.

При определении острой токсичности устанавливают:

- среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель 50% тест-организмов за 24 ч экспозицию ЛК или ЛКР;
- безвредную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель не более 10% тест-организмов за 24 ч (БК или БКР).

Культивирование инфузорий

Тест-культура представляет собой суспензию одноклеточных инфузорий-туфельек *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Культуру парамеций выращивают в термостате при температуре $+22\pm 2^{\circ}\text{C}$. В качестве культиваторов используют чашки Петри (диаметр 9 см). Пересевают культуру инфузорий один раз в 10 дней. Для этого в чистые чашки Петри наливают на половину чашки культивационной воды и добавляют по 1 мл суспензии дрожжей. Для приготовления дрожжевой суспензии 1 г свежих или 0,5 г сухих хлебопекарных дрожжей заливают 50 см³ культивационной воды. После набухания суспензию тщательно перемешивают. Допускается хранить дрожжевую суспензию в холодильнике 1–2 суток. Перед кормлением дрожжевую суспензию тщательно перемешивают, отстаивают в течение одной минуты и надсадочную жидкость используют для кормления. Таким образом, содержимое чашек Петри становится питательной средой для выращивания парамеций. В свежую питательную среду переносят часть суспензии с инфузориями (около одной трети содержимого) из старой чашки Петри и помещают в термостат. Чашки следует держать закрытыми крышками только на 2/3.

Если культура инфузорий *Paramecium caudatum* заражается другими простейшими или мелкими многоклеточными, то пересев клеток из старой культуры на свежую питательную среду производят следующим образом. На предметный столик бинокля помещают планшет с лунками на 1 мл. Устанавливают такое увеличение, чтобы вся лунка планшета была в поле зрения. Одну из лунок заполняют старой культурой. Четыре лунки (если культура заражена другими простейшими, то шесть лунок) заполняют на 1/3 объема культивационной водой. Капиллярной пипеткой отбирают небольшое количество старой культуры и переносят в первую лунку. Пипетку тщательно промывают и, наблюдая в бинокляр, переносят клетки из первой лунки во вторую, затем из второй в третью и так далее каждый раз тщательно промывая капиллярную пипетку. Таким образом, клетки парамеций отмывают от остатков старой среды и избавляют от других простейших в случае зараженной исходной культуры. Из последней лунки чистой капиллярной пипеткой инфузорий переносят в чашки Петри с подготовленной свежей питательной средой, помещая в каждую чашку Петри по одной – две особи. Чашки с посевами ставят в термостат при температуре $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Через 7-10 дней культура должна приобрести необходимую плотность (10-15 особей в 0,1 мл культивационной среды).

Подготовка культивационной воды

Для получения культивационной воды водопроводную воду отстаивают в течение 3-7 суток (до полного дехлорирования) в бутылки из бесцветного стекла или непрозрачного пластика. При отсутствии питьевой воды удовлетвори-

тельного качества допускают использование поверхностной пресной воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм. Можно использовать питьевую очищенную артезианскую воду Аква – Минерале (группы компаний «Пепси-Кола» и др.), распространяемую через торговую сеть. В культивационной воде должны отсутствовать органические загрязняющие вещества, хлор, токсические вещества и антагонистические для парамеций организмы (простейшие, многоклеточные). рН воды должен быть в пределах (7,0 – 8,0), температура – (+22 ± 2)°С.

Необходимые материалы для постановки эксперимента

- Прозрачный планшет с лунками минимального объёма 1 мл
- Бинокулярный (стерео-) микроскоп с увеличением ×40
- Дозаторы пипеточные или пипетки 0,6 мл
- Пипетки капиллярные

Процедура биотестирования

Для определения токсичности проводят биотестирование исходной исследуемой воды или водной вытяжки и нескольких ее разбавлений.

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводят в трех-пяти параллельных сериях. В качестве контроля используют параллельные серии с культивационной водой.

Для биотестирования используют планшет с лунками. Расположив чашку Петри с культурой инфузорий на предметном столике стереомикроскопа, глядя в микроскоп, отлавливают несколько особей капиллярной пипеткой и переносят в лунки планшета. Помещают по 10 – 12 особей в каждую лунку. В сумме выборка инфузорий для каждого варианта должна насчитывать не менее 30 особей.

При помещении тест-организмов количество культуральной жидкости в лунке не должно превышать 0,02 см³. После помещения инфузорий в планшет в контрольные лунки наливают по 0,6 см³ культивационной воды, в опытные – по 0,6 см³ тестируемой пробы. Отмечают время начала биотестирования и подсчитывают под микроскопом количество особей в каждой лунке. В процессе экспозиции ни в контрольных, ни в опытных лунках кормление тест-организмов не осуществляется.

Планшет с заполненными лунками помещают в термостат и выдерживают в течение 24 ч при температуре +22±2°С. По истечении этого времени производят подсчет выживших и погибших особей под микроскопом. Выжившими считаются инфузории, которые свободно перемещаются в толще воды. Обездви-

женных особей относят к погибшим. Результаты наблюдений заносят в рабочий журнал.

Если процент гибели парameций в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитывают, и его повторяют снова.

После того, как результаты эксперимента учтены, микроаквариумы промывают водой, протирают ватным тампоном, смоченным в спирте, промывают дистиллированной водой.

Обработка результатов

При определении острой токсичности исследуемых проб, а также их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель 50% особей за 24 часовую экспозицию – ЛКР₅₀₋₂₄;
- безвредную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель не более 10% за 24 часовую экспозицию БКР₁₀₋₂₄.

Для оценки острой токсичности пробы рассчитывается процент погибших парameций (A,%) $A = X_t / X_i * 100\%$, где X_i – среднее арифметическое количество исходных особей; X_t – среднее арифметическое количество погибших особей в тестируемой воде через 24 часа.

Контроль погрешности методики токсикологического анализа

Контроль качества оценки токсичности водного образца проводят один раз в квартал по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному («эталонному») токсиканту – бихромату калия ($K_2Cr_2O_7$). Диапазон концентрации $K_2Cr_2O_7$, при действии которого в течение 24 часов должны погибнуть 50% парameций, составляет (0,55 – 0,89) г/дм³.

При проведении контрольного тестирования определяют концентрацию модельного токсиканта, при которой за 24 часа гибнет 50% подопытных организмов. Для этого на основании стандарт титра методом последовательных разбавлений готовят серии растворов $K_2Cr_2O_7$ в культивационной воде с концентрациями 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 г/дм³.

Если концентрация $K_2Cr_2O_7$, вызвавшая острую токсичность, находится в интервале (0,55 – 0,89) г/дм³, то чувствительность культуры парameций соответствует необходимым требованиям, культуру используют в биотестировании. Если концентрация модельного токсиканта, вызвавшая острую токсичность, не находится в данном интервале, то проверяют точность приготовления исследуемых растворов, условия проведения опыта. Если ошибки при проведении испытаний исключены, то необходимо взять новую партию тест-организмов.

ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ: фитотестирование

Фитотестирование широко применяется для определения токсичности природных сред, в первую очередь почв. Фитотоксичность обычно регистрируют по изменениям в формировании корневой системы, морфологических характеристик надземной части растения, биомассе (общей и отдельных органов растения).

Отечественные наработки в области фитотестирования учитывают следующие международные стандартные методики:

- Определение загрязнения по задержке роста корня (Международный стандарт ИСО 11269-1)
- Определение загрязнения по развитию и росту растений (Международный стандарт ИСО 11269-2)

Для определения токсичности проб предпочтительны мелкие семена с небольшим запасом питательных веществ. Так, семена редиса характеризуются высокой энергией прорастания, повышенной отзывчивостью на токсические вещества (особенно органической природы), оптимальными сроками экспозиции, поэтому они часто используются в биотестировании почв.

Пробоподготовка. Репрезентативные образцы почвы, отобранные как правило, не менее чем из 15 мест опытного участка, анализируются в свежем виде. Водная вытяжка из почвенного образца готовится в соотношении почва : вода — 1:4, при устойчивом появлении окраски и повышенной мутности допускается приготовление вытяжки в соотношении 1:10 (с учетом гигроскопической влажности), 2 ч встряхивают, затем 30 мин отстаивают, затем фильтруют через фильтр «белая лента».

Посуда, материалы, реактивы, аппаратура, необходимые для постановки эксперимента

- Стеклянные колбы ($V=250$ мл)
- Стеклянные стаканчики ($V=75$ мл)
- Воронки
- Чашки Петри
- Мерные пипетки
- Семена редиса
- Фильтровальная бумага или бумажные фильтры
- Вода (дистиллированная)
- Вода водопроводная (после 10-15 мин кипения)
- Пластиковый или стеклянный шпатель
- Мельница для размола образцов
- Весы (погрешность не более 0,1 г)
- Встряхиватель
- Гомогенизатор, терка или другие приспособления для размельчения сырых растительных образцов.
- Центрифуга
- Биотермостат

Проведение эксперимента

Чашки Петри (3 для контроля и по 3 для каждого из разведений) с вложенными в них кружочками фильтровальной бумаги стерилизуются и охлаждаются. На внешней стороне крышек ставится маркировка с информацией об образце.

В каждую чашку помещается по 25 сухих здоровых семян

В опытные чашки вносят по 5мл экстракта или его разведений; контрольные семена обрабатывают 5 мл дистиллята. Все образцы помещаются в термостат на 7 суток (t 20-23 °С).

По истечении срока экспозиции измеряют длину корней проростков, в контрольных и опытных пробах, причем объектом измерения у каждого семени является корень максимальной длины.

Результаты измерения оформляются в виде таблицы.

Анализ результатов

На 7-й день измеряют длину корней проростков, в контрольных и опытных пробах.

Рассчитывают эффект торможения по формуле:

$$E_m = \frac{L_{\kappa} - L_{оп}}{L_{\kappa}} \cdot 100\%$$

Где E_T – эффект торможения (%); $L_{оп}$ – средняя длина корней в опыте (мм) по 3-м повторностям; L_{κ} – средняя длина корней в контроле (мм) по 3-м повторностям.

Класс опасности отхода рассчитывается путем нахождения разведения, при котором происходит подавление роста длины корней на 50% и далее устанавливается по табличным значениям

Критерии опасности проб (отходов) по фитотоксическому действию

Классы	1	2	3	4
Категории опасности	Чрезвычайно опасные	Высоко опасные	Умеренно опасные	Мало опасные
Величина ER_{50}	> 102	> 10-102	> 1-10	≤ 1

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОТЕСТЫ

Биотестирование по интенсивности свечения культуры люминесцирующих бактерий. Люминесцентный бактериальный тест

Люминесцентный бактериальный тест (ЛБТ) основан на использовании в качестве тест-культуры сильно светящихся бактерий. Такие бактерии широко распространены в природе, например, род *Vibrio* (*V.harveyi*, *V.fisheri*), род *Photobacterium* (*P.phosphoreum*, *P.leiognathi*) и др. К настоящему времени методами генной инженерии получены штаммы бактерий, содержащие плазмиды, несущие гены люминесцентной системы .

Измеряемым параметром является биолюминесценция в видимой области спектра. Это быстрый интегральный, чувствительный и объективный тест на загрязнение окружающей среды и токсичность образцов. Это корреляция отклика на токсичность вещества с их действием на высшие организмы, это недорогая и безвредная технология.

Отклик люминесцентных бактерий на токсические вещества полностью коррелирует с таковым у других биологических организмов и величина 50%-ного тушения свечения ЕС50 полностью коррелирует с величиной LD50 для высших растений и человека , а также с другими биосенсорами.

В России производятся тест-системы на основе морских и пресноводных генноинженерных светящихся бактерий. В МГУ (Москва) разработаны модифицированные генно-инженерные системы, получившие фирменный знак «Эколюм». Биолюминесцентный бактериальный тест – это комплект реагентов с биолюминесцентной активностью в комплексе с люминометрами специального назначения. Введение в реакционную смесь пробы с токсическим соединением вызывает снижение интенсивности свечения.

Степень токсичности образца (Т) вычисляется по формуле $T=(i_0-i)/i_0$ где i_0 и i соответственно интенсивность свечения контрольной и опытной проб. Основными параметрами тест-системы являются величины ЕС₅₀ – концентрация известного вещества или объем пробы, вызывающие 50% тушение свечение бактерий по сравнению с контролем; ЕС₂₀ – концентрация известного вещества или объем пробы, вызывающие 20% тушение свечение бактерий по сравнению с контролем. В ряде случаев используются величину ЕС10, определяющую порог чувствительности тест-системы. Специальная светорегистрирующая аппаратура позволяет измерить интенсивность свечения реагента до и после введения неизвестного токсиканта в образце небольшого объема (0,2-0,5 мл). Экспресс-анализ занимает 5 минут, мониторинг возможен в полевых условиях.

Принципиальная схема функционирования биOLUMИнесцентного бактериального теста представлена ниже.

Токсичен ли образец?	
ДА	НЕТ
Наблюдается гашение свечения	Нет гашения свечения
В измеряемом образце есть токсическое соединение или смесь соединений, в случае необходимости можно продолжать анализ другими методами для установления природы реагентов.	В измеряемом образце концентрация токсического соединения очень мала или его нет, нет необходимости в проведении дополнительных анализов.

Основными областями применения люминесцентного бактериального теста являются:

Постоянный мониторинг питьевой воды, водоемов, почв, воздуха, материалов и изделий на токсический эффект.

Экспрессный контроль отходов и сбросов промышленных предприятий.

Контроль технологических процессов в режиме реального времени.

Определение уровня токсичности новой продукции.

Медицина и фармацевтика, контроль токсических эффектов материалов и лекарственных веществ.

Пищевая индустрия, гарантия безопасности продуктов питания.

Принцип определения интегральной токсичности и процедура проведения анализа

Интенсивность свечения бактерий зависит от внешних факторов и не является строго постоянной величиной. Поэтому метод измерения токсичности является относительным - постоянное сравнение образца с контролем и не зависит от исходной абсолютной величины свечения биосенсора. Измерение контроля всегда предшествует измерению опыта. Рекомендуется работать с биосенсором в диапазоне температур от 15 до 25°C. Интенсивность свечения бактерий регистрируется устройством «Биотокс». Устройство «Биотокс» автоматически вычисляет индекс токсичности по формуле $T=(i_0-i)/i_0$ где i_0 и i соответственно интенсивность свечения контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции.

Методики измерений интегральной токсичности воды, почв, воздушной среды, материалов и изделий с помощью биосенсора «Эколюм» имеют свидетельство о метрологической аттестации и зарегистрированы в Департаменте госсанэпиднадзора РФ и Госкомэкологии (сертификат Госкомитета РФ по стандартизации и метрологии № 224.01.17.072/2005).

Согласно методикам утверждены следующие критерии токсичности:

допустимая степень токсичности образца	– индекс токсичности T меньше 20; объем пробы или концентрация вещества в пробе, меньше величины EC_{20}
образец токсичен	– индекс T равен или больше 20 и меньше 50; объем пробы (или концентрация вещества в пробе), меньше величины EC_{50} и больше или равен EC_{20}
острая токсичность образца	– индекс токсичности T равен или более 50; объем пробы (или концентрация вещества в пробе), равен или больше величины EC_{50}

Принцип измерения токсичности образца состоит в следующем. Перед проведением анализа на токсичность приводят биореагент в рабочее состояние, т.е. проводят регидратацию лиофилизированных бактерий. Для этого вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 мл охлажденной дистиллированной воды, рН 7.0-7.4 – получают «маточную суспензию» бактерий. Через 30 минут ее разводят водой до получения рабочей суспензии. Наливают в две чистые кюветы от люминометра по 0.1 мл рабочей суспензии бактерий. К контрольной кювете добавляют 0.9 мл дистиллированной воды (рН 7.0-7.4), к опытной добавляют равный объем измеряемого образца и замечают время. Общий объем растворов равен 1 мл. Эффективность действия токсического вещества обычно растет во времени, особенно в первые минуты. Поэтому следует следить, чтобы время экспозиции образца с биосенсором было строго фиксированным. На приборе «Биотокс» интенсивность свечения контроля (i_0), затем сразу интенсивность свечения опытного образца (i) и определить величину индекса токсичности T по формуле $T=(i_0-i)/i_0$. Для получения более достоверных данных рекомендуется в контроле и опыте использовать по несколько повторностей. В экспрессном варианте для получения предварительных данных достаточно 5 минутной экспозиции токсиканта с биосенсором.

Вычисление величин EC_{50} , EC_{20} .

Эта операция предназначена для быстрого выяснения вопроса, при каких объемах (в модельных опытах – концентрациях) исходного слабо токсического образца достигается установленный предел токсичности (EC_{20} и/или EC_{50}) или при каких разведениях сильно токсический образец станет безопасным.

EC_{50} есть эффективный объем образца, вызывающий тушение свечение биосенсора на 50% по сравнению с контролем. В этом случае образец сильно токсичен. EC_{20} есть эффективный объем образца, который приводит к 20%-ному тушению свечения биосенсора по сравнению с контролем. В этом случае

образец токсичен. Все значения величин менее EC_{20} свидетельствуют о том, что образец безвреден для человека.

Вычисление величин ЕС проводят с использованием достаточно известной в токсикологии гамма-функции. Гамма-функция (Γ) представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой $T=(i_0-i)/i_0$.

Функция Γ очень удобна для точного определения величин EC_{20} и EC_{50} путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец сильно токсичен. График Γ в логарифмических координатах против объемов пробы V (или концентрации отдельного вещества) есть теоретически прямая линия молекулярности реакции токсического вещества с одной или несколькими мишенями, связывающими эти поллютанты в тест-объекте. При $lg\Gamma$ равном 1 происходит 50%-ное тушение биолюминесценции и это есть величина EC_{50} . При $lg\Gamma$ равном -0.6 происходит тушение свечения на 20% от контроля (величина EC_{20}).

Люминометр «Биотокс-10» позволяет автоматически представлять величины Γ для каждой пробы, а также величины EC_{20} и EC_{50} .

Тест Эймса и система метаболической активации

В 60-е годы XX века американский исследователь Б. Эймс разработал тест-систему для выявления мутагенного эффекта, основанную на реакции специально сконструированных штаммов-мутантов. Все штаммы происходят от лабораторного штамма *Salmonella typhimurium* LT2, у которого были выделены ауксотрофные по гистидину мутанты his G-46 (мутация замены оснований в his G-гене гистидинового оперона), his C-3076 и his D-3052 (мутации типа сдвига рамки считывания в генах C и D, соответственно). Мутация his G-46 ревертирует под действием мутагенов, вызывающих замены оснований, две другие — под действием агентов, индуцирующих сдвиг рамки считывания. Для повышения чувствительности штаммов в них была введена протяженная делеционная мутация gal bio urvB, захватывающая биотиновый оперон, часть галактозного оперона и ген urvB. Последняя мутация вызывает нарушение системы эксцизионной репарации и, в силу своей делеционной природы, является очень стабильной. Следующим этапом повышения чувствительности штаммов было введение в них мутации rfa, приводящей к утрате наружного липосахарида и к увеличению проницаемости клеточной стенки. Таким образом, были созданы штаммы: TA 1535 hisG-46 gal bio urvB rfa, TA 1537 his C-3076 gal bio urvB rfa, TA 1538 hisD-3052 gal bio urvB rfa, получившие широкое распространение в исследованиях по генетической токсикологии. Однако эти штаммы оказались нечувствительными или малочувствительными к ряду известных мутагенных соединений (метилметансульфат, 4-нитрохинолин-1-оксид, бензилхлорид,

бенз/а/пирен, различные нитрофураны и др.). Этот недостаток удалось устранить путем введения в штаммы ТА 1535 и ТА 1538 особой плазмиды рКМ 101, являющейся R-фактором и одновременно передающей штаммам устойчивость к ампицилину. Таким образом, были сконструированы высокочувствительные штаммы

ТА 100 hisG-46 gal bio urvB rfa, рКМ 101 amp R,
ТА 98 hisD-3052 gal bio urvB rfa, рКМ 101 amp R.

Вещества, вызывающие мутации типа замены оснований, вызывают реверсии к прототрофности по гистидину у штаммов ТА 1535 и ТА 100, а мутагены, вызывающие сдвиг рамки считывания — у штаммов ТА 1537, ТА 1538 и ТА 98.

На основе штаммов сальмонеллы были созданы полуколичественные и количественные тесты для оценки мутагенной активности. Их детальное описание дано в методическом руководстве Фонштейна и сотр. Как уже было отмечено выше, количественные тесты целесообразно использовать в целях определения частоты мутаций, а также в тех случаях, когда исследуемые вещества являются токсичными и вызывают гибель большей части клеток тест-объекта. Поэтому наиболее широкое распространение получил ставший классическим полуколичественный тест Эймса с метаболической активацией *in vitro* или, как его иногда еще называют тест Эймса сальмонелла/микросомы.

Схема теста Эймса сальмонелла/микросомы

Принципиальная схема теста проста. В пробирку с расплавленным 0,6% агаром вносятся определенные количества клеток тестерного штамма, испытываемого вещества, фракции S9 и кофакторов. В варианты без метаболической активации вместо фракции S9 вносят равный объем 0,15 М KCl. Полученная смесь выливается в качестве верхнего слоя на поверхность твердой среды, обеспечивающей селективный рост ревертантов His⁺. Через 2-3 дня проводится учет колоний ревертантов на чашках.

Оценка результатов производится, исходя из следующих критериев. Если количество колоний на опытных чашках превышает число колоний на контрольных чашках без мутагена не более чем в 1,7 раза, делается заключение, что мутагенная активность не выявлена. Если наблюдается превышение в 1,7-10 раз, делается вывод о слабой, в 10-100 раз — о средней, более чем в 100 раз — о сильной мутагенной активности препарата.

Для оценки теста Эймса сальмонелла/микросомы существенное значение имеет вопрос о совпадении канцерогенной и мутагенной активности проверяемых соединений, т.е. о чувствительности теста по отношению к канцерогенам. В лаборатории Б. Эймса было показано, что 90% из 175 известных канцерогенов, выявленных в опытах на животных, проявили мутагенную активность в тесте на сальмонелле. Аналогичным образом, около 90% веществ, не проявляющих канцерогенной активности у животных, не вызывали обратных

мутаций у сальмонеллы, хотя некоторая часть таких неканцерогенов была активна в тесте Эймса (так называемые «фальшивопозитивные результаты»), что можно рассматривать как свидетельство его более высокой чувствительности по сравнению с тестами на животных. Следует отметить, что именно с использованием теста Эймса было проведено наиболее тщательное и систематическое сопоставление мутагенной и канцерогенной активности большого числа химических соединений. Все это позволяет сделать вывод о высокой чувствительности теста Эймса по отношению к канцерогенам.

Однако тест Эймса не способен выявлять активность таких известных канцерогенов, как уретан, 1,2-диметилгидразин, дизельдрин и некоторых других (так называемые «фальшиво-негативные результаты»), а также не пригоден для изучения канцерогенных металлов, что требует привлечения для этих целей других тест-систем.

Большая часть мутагенов находится во внешней среде в виде промутагенов. Для того чтобы под влиянием этих веществ возникла мутация, необходима их метаболическая активация.

Обычно работу монооксигеназной системы учитывают лишь при регистрации мутагенов непрямого действия, что не совсем правильно. Прямые мутагены не нуждаются в метаболической активации, но, попадая в организм, также подвергаются воздействию монооксигеназной системы. Но, если в случае не прямых мутагенов эта система выполняет роль активирующей, то в случае прямых мутагенов она детоксицирует, то есть снижает выход мутаций.

В настоящее время тест Эймса является наиболее широко распространенным и общепризнанным. С 1997 года он включен в систему разработки рыбохозяйственных ПДК.

МЛЕКОПИТАЮЩИЕ: культура клеток *in vitro*

Методика основана на регистрации изменений зависимости двигательной активности сперматозоидов от времени под воздействием химических агентов, содержащихся в экстракте из испытуемых проб. Тест-функцией (изменяемый параметр) является подвижность суспензии половых клеток m , которая пропорциональна концентрации сперматозоидов c_m и среднему модулю скорости движения клеток v : $m=c_m v$.

Подвижность сперматозоидов $m=m(t)$ для контрольного и опытного образцов регистрируется анализатором видеоизображений.

Анализатор токсичности вычисляет индекс токсического действия I_t , как отношение средневзвешенного времени подвижности сперматозоидов в испытуемой и контрольной пробе.

Критерием отсутствия токсичности в испытуемой пробе служит величина индекса токсичности более 80% и менее 120%.

Замороженную сперму быка в виде гранул весом (0,1-0,15) г можно получить на станциях искусственного осеменения сельскохозяйственных животных и племях хозяйствах. Допускается использовать сперму, забранную по потомству. Сперма должна соответствовать ГОСТ 26030-83.

Сперму хранят в токсикологической лаборатории в сосудах Дьюара типа СДС различной емкости, заполненных жидким азотом. В жидком азоте тест-культуру можно хранить неограниченно долго.

Процедура биотестирования

В качестве контрольной пробы готовится глюкозо-цитратный буфер (глюкоза – 0,4 г; цитрат натрия трехзамещенный – 0,1 г; вода дистиллированная – 10 см³). Этот же буферный раствор используют в качестве среды для оттаивания замороженной спермы.

Испытуемая проба готовится следующим образом: вода или водная вытяжка из пробы переводится в изотоническое состояние (относительное постоянство осмотического давления в среде и клетках), для этого на 10 см³ вытяжки добавляют 0,4 г глюкозы и 0,1 г цитрата натрия.

Контрольный и испытуемый растворы по 0,4 см³ помещают в пробирки в штатив блока пробоподготовки (БПП), поддерживающий температуру (40 ± 1,5)°С.

Далее производится оттаивание тест-культуры – подготовка маточной суспензии сперматозоидов. Для этого пробирку с глюкозо-цитратным буфером (объем оттаивания указан в паспорте на культуру) устанавливают в блок про-

болодготовки и прогревают не менее 5 мин; гранулу спермы помещают в пробирку, прогревают 5-7 мин перемешивая каждые 15-20 с.

Готовят растворы для заполнения капилляров: в пробирки с контрольным и испытуемым растворами вносят по $0,1 \text{ см}^3$ маточной суспензии сперматозоидов, перед каждым отбором суспензии маточную культуру аккуратно перемешивают кончиком пипетки или встряхивая пробирку для равномерного распределения клеток в растворе.

В БПП перед каждой пробиркой с рабочим раствором устанавливают чистую сухую пробирку с 5 капиллярами, протертыми сухой марлей. В каждую пробирку с капиллярами по стенке дозатором приливают, предварительно перемешав, по $0,2 \text{ см}^3$ соответствующего рабочего раствора.

Мокрые поверхности каждого капилляра вытирают сухой марлей и устанавливают в каретку прибора. Первые 5 позиций каретки предназначены для капилляров с контролем, остальные 20 – для испытуемых проб (по 5 капилляров на каждый из 4-х исследуемых образцов). Заполненная каретка накрывается крышкой и помещается в анализатор изображений. Необходимо убедиться, что все капилляры лежат в одной плоскости, без перекосов.

Выполнение измерений

«Руководство пользователя анализатора изображений» подробно описывает работу на приборе:

- включить прибор; запустить программу «Токсичность»;
- установить параметры испытания в диалоговом окне (количество капилляров в опытном образце (4 или 5), количество опытных образцов (от 1 до 5) и время экспозиции в секундах (20 с);
- в соответствующих полях ввести название исследуемых проб, объем оттаивания и кличку быка;
- включить накопление экспериментальных данных.

Для каждого капилляра с рабочими растворами автоматически измеряется подвижность суспензии сперматозоидов. Величины подвижности отображаются в таблице на мониторе.

Когда для всех капилляров показатель подвижности суспензии сперматозоидов снизится на 95% (и более) от начального значения, эксперимент считается законченным и процесс накопления данных прекращают.

При соблюдении требований к подготовке и проведению испытаний продолжительность эксперимента составляет 2,5 – 3 часа.

Термины и определения

Биодиагностика [от гр. bios – жизнь и diagnosticos – способный распознавать] – процесс постановки диагноза, выявление причин или факторов изменения состояния среды, по специфичным реакциям отдельных организмов, популяций или экосистем. Включает биоиндикацию и биотестирование.

Биоиндикация – метод оценки абиотических и биотических факторов местообитания при помощи биологических систем.

Биотестирование – лабораторный метод оценки качества объектов окружающей среды по определенным поддающимся учету характеристикам живых организмов в стандартных условиях.

Максимально недействующая концентрация – NOEC (no observed effect concentration)

Медианная летальная концентрация – LC₅₀

Минимально переносимая или пороговая концентрация (threshold concentration) – LC₀

Минимальный порог чувствительности, при котором отмечаются специфические реакции или смертность тест-организмов – LC₀

Полулетальная (полуэффektivная) концентрация, вызывающая гибель 50% тест-организмов за установленное время 24, 48 или 96 ч – LC₅₀.

Тест-культура – лабораторная популяция особей, как правило, одного вида живых организмов (тест-организмов), искусственно поддерживаемая (культивируемая) на питательной среде в стандартных условиях и используемая при оценке токсичности при биотестировании.

Тест-объект – образцы природных или техногенных сред и объектов, которые исследуются методом биотестирования.

Тест-реакция – ответная реакция тест-организмов (или их элементов) на воздействие исследуемого объекта (тест-объекта), выбранная для анализа в определенной тест-системе.

Тест-система – пространственно ограниченная среда, которая включает чувствительные организмы (тест-организмы) или их элементы и образцы исследуемых объектов (тест-объекты).

Тест-функция – для культур одноклеточных водорослей – гибель клеток, изменение (прирост или убыль) численности клеток в культуре, средняя скорость роста культуры, функциональные (фотосинтетические) характеристики клеток, содержание пигментов.

Токсикометрия – совокупность приемов оценки токсичности вещества или сточной воды

Токсикорезистентность – сопротивляемость организмов к воздействию токсичных веществ или компонентов сточных вод

Рекомендуемая литература

Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование (О. П. Мелехова и др.;.. Москва : Академия, 2007. - 288 с.

Вавилова В., Терехова В. Условия отбора и подготовки проб для некоторых методов биотестирования вод, почв и отходов/ Учебно-методическое пособие. — Макс Пресс МГУ Москва, 2009, с.40.

Лисовицкая О.В., Терехова В.А Фитотестирование: основные подходы, проблемы лабораторного метода и современные решения .Доклады по экологическому почвоведению, 2010. выпуск 13, N 1, с. 1-18.

Методические рекомендации по установлению предельно - допустимых концентраций загрязняющих веществ для воды рыбохозяйственных водоемов.-ВНИРО.М.,1986.

Методическое руководство по биотестированию воды. РД 118-02-90.- М.- 1991.-48 с.

Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. РЭФИА, НИИ-Природа, М., 2002.

Строганов Н.С. Методика определения токсичности водной среды //Методика биологических исследований по водной токсикологии. - М.: Наука, 1971, с.14-60.

Терехова В. Биотестирование почв: подходы и проблемы // Почвоведение. 2011. № 2,с. 190-198.

Фомин Г.С., Фомин А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам/ Справочник. - М: 2001.

Циприян В.И., Коршун М.М., Дацюк Д.Е. Экотоксикологическая оценка качества почвы // Гигиена и сан. - 1993. - № 1, с. 25-28.

Якименко О.С., Терехова В.А. Гуминовые препараты и оценка их биологической активности для целей сертификации// Почвоведение, 2011, с. 1334-1343.

Филенко О., Михеева И. Основы водной токсикологии. — Колос Москва, 2007, с. 144

Интернет-ресурсы:

Лаборатория экотоксикологического анализа почв

119992, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова,
факультет почвоведения

web: <http://letap.ru/>

e-mail: letap.msu@gmail.com

тел./факс: (495) 939-28-63