

УДК 574.64:593.17

Е. В. УСЕНКО

## БИОМОНИТОРИНГ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ С ПОМОЩЬЮ ИНFUЗОРИЙ TETRAHYMENA PYRIFORMIS КАК ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Прогрессирующее ухудшение экологической ситуации водных объектов обусловило необходимость включения в систему мониторинга окружающей природной среды эффективных методов интегральной оценки вредного воздействия загрязняющих веществ на биологические объекты. Биотестирование позволяет оценить влияние токсикантов на живые организмы и дает возможность на количественном основании за счет получения конкретных цифровых данных характеризовать уровень токсичности водной среды для гидробионтов. Для этой цели применяются биотесты с использованием организмов, относящихся к различным систематическим группам и трофическим уровням: бактерии, водоросли, инфузории, ракообразные, высшие растения, рыбы и др. При этом широкое использование биотестов в практике предусматривает стандартизацию процедуры биотестирования и ряда параметров, влияющих на результаты токсикологических анализов загрязнений.

Среди перспективных методов биотестирования следует выделить биотест на инфузориях тетрахименах, который получил широкое распространение в последние годы. Преимущество данного метода перед другими связано в первую очередь с особенностями тест-объекта, а именно:

- инфузории являются представителями биоценозов водных экосистем; широко распространены в водоемах и принимают активное участие в круговороте веществ, входя в состав организмов - консументов;
- они проявляют достаточную чувствительность к широкому кругу токсикантов различной химической природы;
- инфузории имеют относительно короткий цикл развития (около шести часов при оптимальных условиях), что позволяет проследить даже в краткосрочном эксперименте (24 ч) влияние токсиканта на нескольких поколениях тест-объекта;
- инфузории тетрахимены объединяют признаки отдельной клетки и целого организма, так что биотестирование происходит одновременно на клеточном и организменном уровнях;
- они характеризуются рядом особенностей, которые сближают их с высшими животными: кислотно-щелочной тип пищеварения, наличие ряда аналогичных ферментных систем, хорошо развитых митохондрий, которые обеспечивают энергетический обмен; имеются система транспорта электронов, универсальный код нуклеиновых кислот, сходный с кодом высших животных [1,2].

Проведенные эксперименты [3] по определению токсичности 67 химических соединений для теплокровных животных и тетрахимен выявили корреляционную зависимость в токсическом действии ксенобиотиков на испытанные тест-объекты. Достаточно четкая корреляция между величинами токсичности, установленными для тетрахимен и теплокровных, наблюдались в отношении веществ, принадлежащих к группам неэлектролитов и цитотоксикантов, в меньшей степени – к группе общеядовитых веществ.

В другой серии экспериментов [4] получены достоверные сопоставимые данные по токсичности сточных вод в различных разбавлениях для теплокровных и некоторых видов гидробионтов, в том числе инфузوري.

Таким образом, биотест на тетрахименах позволяет не только прогнозировать опасность загрязнений для состояния водных экосистем, но и проводить раннюю экспрессную (по сравнению с анализами на теплокровных) диагностику потенциального риска загряз-

нений водной среды для здоровья человека, так как тетрахимен применяют для биологической оценки качества пищевых продуктов и сельскохозяйственных кормов [5].

Биотест на тетрахименах нами был использован для определения генотоксичности водной среды по изменению удельной радиоактивности нуклеиновых кислот [6].

Приведенные данные свидетельствуют о широких возможностях биотеста на тетрахименах для токсической оценки различных объектов, в том числе водной среды и источников ее загрязнения, в связи с этим стандартизация метода на *Tetrahymena pyriformis* является необходимой задачей.

**Целью работы** являлась разработка модифицированного метода биотестирования на инфузориях тетрахименах для определения качества воды по токсикологическому показателю. Модификация метода связана с требованиями его использования на практике в мониторинге и контроле водной среды и источников ее загрязнения: достаточная унификация, возможность получения однозначно интерпретируемых воспроизводимых результатов.

Для осуществления указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- подобрать оптимальные условия культивирования тест-объекта и биотестирования;
- установить метрологические характеристики метода;
- провести апробацию биотеста на сточных и природных водах.

Одним из требований, которым должен соответствовать тест-объект, является возможность получения достаточного количества клеток в инокулянте для проведения экспериментов. К основным факторам, влияющим на рост и размножение инфузорий в культуре, относятся температура. В связи с этим нами были проведены эксперименты по выбору температурного режима для культивирования тест-объекта.

Для выбора оптимальной температуры культивирования тест-объекта сравнивали интенсивность размножения инфузорий при двух температурных режимах: 20-22°C и 26-28°C. Количество клеток в трехсуточной культуре, выращенной при температуре 26-28°C, было вдвое большим, чем в культуре, выращенной при более низком температурном режиме (20-22°C) (табл. 1).

Таблица 1

Температура, °C	Количество клеток инфузорий × 10 <sup>4</sup>
20-22	8,3 ± 0,3
26-28	16,2 ± 0,5

На основании результатов экспериментов нами рекомендуется использовать для культивирования тетрахимен с целью получения инокулянта с достаточной плотностью клеток температуру выращивания 26-28°C.

На результаты биотестирования в значительной степени влияет ряд факторов как биотических, так и абиотических. Существенным биотическим фактором является возраст тест-объекта, используемого для биотестирования.

С целью выбора возраста культуры тетрахимен, при котором они проявляют наибольшую чувствительность к действию токсикантов, испытывали два возраста культуры: через 3 и 7 суток после посева на питательную среду. Трехсуточная культура находится в конце экспоненциальной фазы роста, а семисуточная – в конце стационарной. В качестве токсиканта использовали раствор  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  с концентрацией 0,1 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ . Биотестирование продолжалось 24 часа.

Результаты экспериментов показали следующее. При внесении трехсуточной культуры количество клеток снизилось на 60%, а при внесении семисуточной – на 21%. Таким образом по показателю чувствительности тест-объекта для биотестирования рекомендуется трехсуточная культура.

Экспериментальным путем подбиралось также время проведения биотестирования. По литературным данным [7,8] рекомендуется для краткосрочного биотестирования 24 и

48 часов. В проведенных экспериментах с модельным токсикантом  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (концентрации от 0,1 до 2,5 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ ) была выявлена одинаковая зависимость интенсивности размножения клеток от концентрации токсиканта при 24 и 48-ми часовой продолжительности эксперимента, поэтому для краткосрочного биотестирования был выбран промежуток времени 24 часа (рис. 2).

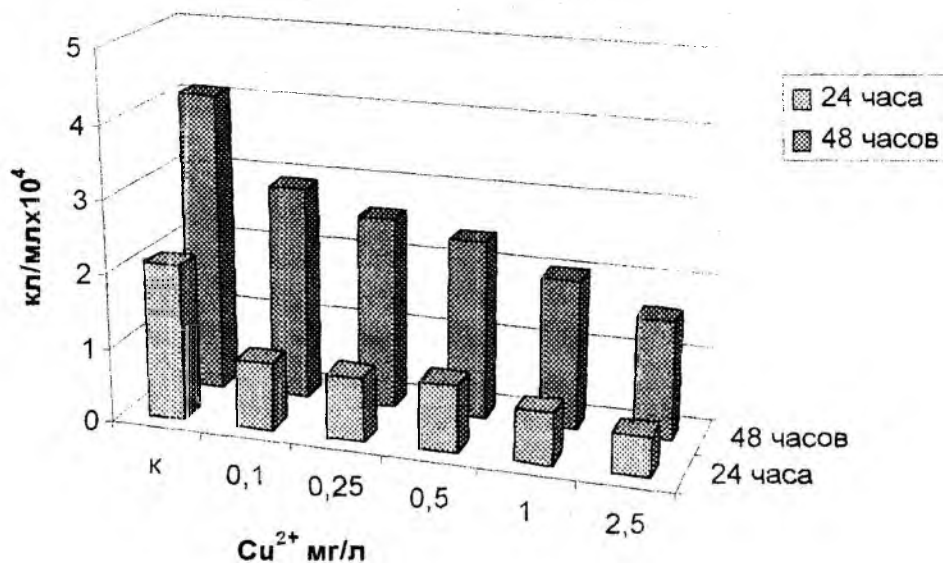


Рис. 1

Зависимость интенсивности размножения *Tetrahymena pyriformis* от различных концентраций меди через 24 часа и 48 часов после внесения токсиканта.

Метрологические характеристики устанавливали согласно “Керівному нормативному документу” (КНД) 211.1.051 [9]. Проверку пригодности тест-объекта для биотестирования определяли на эталонное вещество двуххромовокислый калий ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), так как оно не имеет в составе молекулы кристаллической воды, хорошо растворяется и водные растворы стабильны. Определяли среднюю эффективную концентрацию  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  –ЭК50, которая вызывает уменьшение количества на 50% и более по сравнению с контролем.

Для проверки пригодности тест-объекта для биотестирования непосредственно перед его проведением определяют ЭК50  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  за 24 часа. Если значение ЭК50 находится в установленном диапазоне реагирования, тест-объект можно использовать для биотестирования. ЭК50 определяли в 16 независимых экспериментах. Были выявлены следующие значения ЭК50  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (табл. 2).

Установка метрологических характеристик метода необходима для обеспечения единых определений токсичности по данному методу. Главной метрологической характеристикой метода биотестирования является воспроизводимость результатов биотестирования. Воспроизводимость результатов – характеристика качества биотестирования, которая отражает близость результатов тестирования, полученных по разной методике, на одном эталонном веществе, но в разных условиях (например, в разное время).

Таблица 2

№ п/п	ЭК50 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
1	0,1
2	0,3
3	0,2
4	0,4
5	0,1
6	0,3
7	0,4
8	0,2
9	0,4
10	0,3
11	0,2
12	0,1
13	0,1
14	0,4
15	0,2
16	0,3

При статистической обработке экспериментальных данных наряду с другими показателями вычисляли дисперсию – величину, отражающую степень варьирования признака, что в данном случае и характеризует воспроизводимость результатов определения токсичности растворов эталонного вещества ( $K_2Cr_2O_7$ ). В наших экспериментах дисперсия в среднем составила 30 %, что соответствует концентрации  $K_2Cr_2O_7$  – 0,81 мг/л. Низкая величина концентрации бихромата кальция, при которой вероятно достоверное превышение контроля по интенсивности размножения инфузорий, свидетельствует о воспроизводимости результатов определения токсичности растворов эталонного вещества ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Таким образом в результате проведенных экспериментов установлена воспроизводимость метода, обеспечивающего единство определений токсичности, и диапазон реагирования тест-объекта на эталонное вещество ( $K_2Cr_2O_7$ ), который используется для проверки пригодности культуры инфузорий к биотестированию, что также обуславливает получение достоверных результатов.

С целью установления сферы применения разработанного метода биотестирования на *Tetrahymena pyriformis* для определения токсичности воды, а также для отработки методики в условиях биотестирования различных вод была проведена его апробация на сточных, природных (поверхностных и подземных) водах и источниках питьевого водоснабжения.

При биотестировании сточных вод проводили краткосрочные эксперименты (24 часа), при биотестировании речных, подземных и питьевых вод – длительные (96 часов). О наличии токсического действия судили по достоверному снижению прироста клеток в опыте по сравнению с контролем. Для определения уровня токсичности анализируемых вод готовили серию их разбавлений и определяли наименьшее разбавление (по кратности), при котором не проявлялось токсическое действие. Результаты апробации представлены в таблице 3.

Таблица 3

Вода	Количество проб		Процент токсичных проб	Максимальное разбавление (раз)
	Протестированных	Токсичных		
Сточная	39	9	23,0	2-4
Речная	104	81	77,8	2-16
Подземная	9	7	77,7	2-8
Питьевая	270	122	45	2-4

Приведенные в таблице 3 данные свидетельствуют о преимущественном обнаружении токсичности биотестом на инфузориях токсичности в пробах речных и подземных вод по сравнению с пробами сточных вод. Можно предположить, что степень очистки сточных вод была достаточно высокой, на что указывает и минимальное разбавление, при котором не обнаруживалась токсичность: 2-4 раз. Возможно, в связи с этим при краткосрочном биотестировании (24 часа) проб сточных вод было выявлено только 23 % токсичных.

Частота обнаружения токсичности в пробах речных и подземных вод была практически одинаковой – 77,7 и 77,8 %, при этом отдельные пробы речных и подземных вод обладали высоким уровнем токсичности: минимальное разбавление, при котором не проявлялось токсическое действие, достигало, соответственно, 16 и 8 раз.

При биотестировании проб питьевых вод выявлено 43 % токсичных проб с достаточно высоким уровнем токсичности от 2 до 4. Результаты биотестирования проб питьевых вод свидетельствуют о потенциальной опасности исследуемых вод для здоровья человека.

Итоги апробации показали возможность применения метода биотестирования на *Tetrahymena rufiformis* для определения токсичности поверхностных и подземных вод, а также источников питьевого водоснабжения. Краткосрочное биотестирование может быть использовано для выявления высокотоксичных сточных вод, в случае же невысокого уровня их токсичности следует продлевать время биотестирования до 96 часов.

**Список литературы:** 1. *Игнатьев А.Д., Исаев М.К., Долгов В.А. и др.* Модификация метода биологической оценки пищевых продуктов с помощью ресничной инфузории тетрахимена пириформис // Вопросы питания. 1980. №1. С. 70-71. 2. *Пожаров А.В., Шелемотов С.А.* Использование экспресс-биотестирования для оценки антропологической ситуации // Дефектоскопия. 1992, № 4. С. 70-71. 3. *Куценко С.А.* Культура инфузорий тетрахимена грушевидная как тест-объект токсикологических исследований // Проблемы санитарной охраны водоемов. Сб. тез. докл. конф. Пермь, 1988. С. 94-95. 4. *Барков Л.В., Этлин С.Н., Лахонина Г.М.* Дифференциальная токсичность водных сред // Актуальные проблемы гигиенического регламентирования химических факторов в объектах окружающей среды. Сб. тез. докл. конф. Пермь, 1989. С.21-22. 5. *Методические рекомендации для использования экспресс-метода биологической оценки продуктоле и кормов.* М.: ВАСХНИЛ, 1990. 42 с. 6. *А.с. Способ определения генотоксичности водорастворимых веществ* / Усенко Е.В., Божков А.И., Калиман П.А. // БИ. 1994, № 30. С.190. 7. *Унифицированные методы исследования качества вод.* Ч. III. Методы биологического анализа вод. М., 1983. С. 142-146. 8. *Моравцева В.* Простейшие как тест-объект и индикаторные организмы для оценки качества вод // Гидробиологический журнал. 1988, 24, № 5. С. 29-33. 9. 12. *КНД 211.1.051 – 96.* Київ, 1997. 33 с.

*Поступила в редколлегию 20.09.2003.*