

УДК: 574:64

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕСТОВ НА БАКТЕРИЯХ *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*,
ИНФУЗОРИЯХ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* И МУХАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДЛЯ
ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ
Е.В.Усенко**

Харьковский автомобильно-дорожный университет (Харьков, Украина)

Проведена апробация на различных категориях вод биотестов на бактериях, инфузориях и мухах для использования в эколого-токсикологической оценке водной среды. Было установлено, что для получения информации о высокотоксичном источнике загрязнения водных объектов можно применять биотест на фотобактериях с использованием биолюминометра, для получения более полной информации об уровне экологического загрязнения необходимо использовать биотесты на бактериях и инфузориях; для оценки токсичности питьевых вод необходимо включать биотесты на инфузориях и мухах, которые позволяют установить ее потенциальную опасность для здоровья человека.

Ключевые слова: *биотестирование, токсичность, генотоксичность.*

Введение

Большинство водных объектов подвергаются разнообразному антропогенному влиянию, вследствие чего возникает кризисная экологическая ситуация, которая часто является одной из причин ухудшения здоровья людей и социального напряжения в отдельных регионах. В связи с этим возникает чрезвычайно большая потребность в информации о токсичности воды и источников загрязнения водных объектов.

Оценить непосредственное влияние токсикантов на живые организмы позволяет биотестирование. Биотестирование дает возможность на количественном основании за счет получения конкретных цифровых данных характеризовать уровень токсичности среды для организмов. Результаты биотестирования представляют интерес не только в экологическом, но и в гигиеническом плане. С одной стороны, в гигиенических исследованиях биотестирование используется как экспресс-метод оценки токсичности водной среды. С другой стороны, гидробионты принимают активное участие в процессах природного самоочищения водоемов от загрязнения, а токсичное влияние на них химических веществ может привести к снижению самоочищающей способности водоема и к ухудшению его санитарного режима, что важно с санитарно-гигиенической точки зрения.

Проведение биотестирования регламентируется руководящим документом «Методическое руководство по биотестированию воды» (РД 118-02-90), однако этот документ распространяется только на определение токсичности воды для гидробионтов и не позволяет оценить ее безопасность для человека.

В связи с этим в задачу исследований входило создание системы эколого-токсикологической оценки водных объектов, которая позволяет охватить разные категории вод – поверхностные и подземные, источники их токсического загрязнения (сточные воды), питьевые воды, а также учесть вред токсичных поллютантов как для гидробионтов, так и для человека.

Материалы и методы исследований

Для проведения биотестирования пробы сточных вод отбирались после очистки в местах их сброса в реки. Пробы поверхностных вод отбирали в контрольных створах рек, которые расположены на 500 м выше и ниже сточных вод. Пробы подземных вод отбирались в промышленном районе из водоносного горизонта, с глубины 30 м. Для разработки токсикологической оценки источников питьевого водоснабжения биотестировали пробы питьевых вод, которые отбирали из артезианских скважин и резервуаров.

При биотестировании проб сточных вод устанавливали наличие или отсутствие острого токсического действия на тест-объекты. В токсикологическом анализе качества поверхностных и подземных вод определяли хроническую токсичность. При оценке питьевых вод, кроме общей токсичности, проверяли возможность мутагенного влияния на организм для определения потенциальной опасности этих вод для здоровья человека.

При биотестировании сточных, поверхностных и подземных вод использовали биотесты на фотобактериях *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford (КНД 211.1.4.060-97), инфузориях

Tetrahymena pyriformis (Ehrenberg) Schewiakoff (КНД 211.1.4.059-97), при анализе питьевых вод биотесты на мухах *Drosophila melanogaster* Meig. (НД, 1999).

Критерием токсичности в методике биотестирования на фотобактериях является снижение уровня люминесценции на 50% за 30 минут по сравнению с контролем, на инфузориях – вероятное снижение количества клеток в культуре за 24 часа (в остром эксперименте) и 96 часов (в хроническом), на дрозофилах – вероятное отклонение от контроля частоты возникновения доминантных летальных мутаций.

Результаты исследований

Метод биотестирования на бактериях *Photobacterium phosphoreum* отличается экспрессностью (измерение уровня люминесценции осуществляется в течение 30 минут), которая обеспечивается использованием специального прибора – биолюцинометра 8802 (БКТБ "Наука", Красноярск), а также использованием лиофилизированной культуры бактерий (институт биофизики РАН), что исключает этап культивирования тест-объекта, благодаря чему снижаются трудозатраты на выполнение токсикологического анализа воды (Microtox ..., 1992).

Метод биотестирования на фотобактериях предложен для оценки токсичности донных отложений водных объектов (Balley, 1992). В 9 независимых лабораториях отмечена чувствительность и преимущество по экспрессности в сравнении с тестами на культурах ткани и на животных при определении токсичности 709 сухих биомедицинских препаратов (Bulich et al., 1990), а также установлена корреляционная зависимость между величинами токсичности, полученными при биотестировании воды и донных отложений на фотобактериях, и генотоксичности на дрозофилах (Геворкян и др., 1994).

Для установления области применения метода биотестирования на бактериях *Ph. phosphoreum* для определения токсичности воды была проведена апробация на сточных, поверхностных, подземных и питьевых водах.

В пробах воды на фотобактериях определяли наличие или отсутствие токсического действия во время биотестирования. В токсичных пробах воды устанавливали уровень токсичности. Для этого определяли минимальную кратность разбавления ($K_p \min$) пробы тестируемой воды, при которой токсическое действие не выявлялось. Чем больше значение $K_p \min$, тем выше уровень токсичности. Результаты апробации приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Результаты апробации методики биотестирования на *Ph. phosphoreum* на разных категориях вод

Вода	Количество проб		Процент токсичных проб	$K_p \min$ (наибольшие значения)
	протестированных	токсичных		
сточная	81	32	40	36
поверхностная	95	11	12	5
подземная	9	1	11	2
питьевая	66	22	22	10

Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют о преимущественном выявлении с помощью этого метода токсичности в пробах сточных и питьевых вод по сравнению с пробами поверхностных и подземных вод. Можно допустить, что степень очистки сточных вод была недостаточной, на что указывает и минимальная кратность разбавления, при которой не выявлена токсичность, – 36 раз. Также следует отметить высокий уровень токсичности питьевых вод, минимальная кратность разбавления которых достигала 10 раз. Частота выявления токсичности в речных и подземных водах была практически одинаковой, соответственно 12 и 11%, при этом отдельные пробы поверхностных вод имели достаточно высокий уровень токсичности: минимальная кратность разбавления, при которой не выявлялось токсическое действие, достигала 5.

Результаты апробации свидетельствуют о возможности использования метода биотестирования на бактериях *Ph. phosphoreum* для токсикологического анализа вод с высоким уровнем токсичности: сточных, загрязненных питьевых, поверхностных и подземных.

Преимущество метода биотестирования на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* связано с особенностями тест-объекта: инфузории широко распространены в водоемах и принимают активное участие в круговороте веществ как консументы, проявляют высокую чувствительность к широкому

кругу токсикантов, имеют относительно короткий цикл развития, объединяют признаки отдельной клетки и целого организма; сходство с животными по кислотно-щелочному типу пищеварения, аналогичных ферментных систем, хорошо развитых митохондрий и характеризуются универсальным кодом нуклеиновых кислот, сходным с кодом высших животных (Игнатъев и др., 1980).

Проведенные эксперименты (Куценко, 1988) 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 (Барков и др., 1989) получены достоверные сопоставимые данные по токсичности вод в различных разбавлениях для теплокровных и некоторых видов гидробионтов, в том числе инфузорий. Биотест на тетрахименах нами был использован для определения генотоксичности водной среды по изменению удельной радиоактивности нуклеиновых кислот (Усенко и др., 1994). Приведенные данные свидетельствуют о широких возможностях биотеста на тетрахименах для оценки токсичности различных объектов, в том числе водной среды и источников ее загрязнения.

С целью установления сферы применения метода биотестирования на инфузориях *T. 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. Результаты апробации представлены в табл. 2.

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

Таблица 2.

Результаты апробации методики биотестирования на инфузориях *T. pyriformis* на разных категориях вод

Вода	Количество проб		Процент токсичных проб	Максимальное разбавление
	протестированных	токсичных		
сточная	39	9	23	2-4
поверхностная	104	81	77,8	2-16
подземная	9	7	77,7	2-8
питьевая	270	122	45	2-4

Частота обнаружения токсичности в пробах поверхностных и подземных вод была практически одинаковой – 77,7 и 77,8%, при этом отдельные пробы поверхностных 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 высоким уровнем токсичности от 2 до 4. Результаты биотестирования проб питьевых вод свидетельствуют о потенциальной опасности исследуемых вод для здоровья человека.

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

Определение генотоксичности объектов окружающей среды с помощью методики биотестирования на мухах *Drosophila melanogaster* имеет по сравнению с другими тест-организмами (бактерии, растения, культура тканей) ряд преимуществ, которые обусловлены тем, что у дрозофилы можно выявить все типы мутаций. Она имеет малое число хромосом, короткий жизненный цикл, большую плодовитость; метаболическая активация веществ, поступающих в организм, такая, как у человека. Данные, полученные при помощи этого тест-организма, могут быть экстраполированы на

высокоорганизованных животных, включая млекопитающих, и использованы как прогноз риска загрязнения среды для здоровья человека (Бочков, Чеботарев, 1989).

С целью установления области использования метода биотестирования на *D. melanogaster* для определения генотоксичности объектов окружающей среды была проведена апробация на сточных, поверхностных и питьевых водах. В пробах воды определяли наличие или отсутствие генотоксического действия на *D. melanogaster* во время биотестирования. Результаты апробации приведены в табл. 3.

Таблица 3.

Результаты апробации методики биотестирования на *D. melanogaster*

Вода	Количество проб		% генотоксичных проб
	протестированных	генотоксичных	
сточная	2	2	100
поверхностная	5	5	100
питьевая	120	68	56

Приведенные в табл. 3 данные свидетельствуют о преимущественном выявлении с помощью апробированного метода генотоксичности проб сточной и поверхностной воды, из которых все испытанные пробы выявили генотоксичность. Высокий процент генотоксичных проб (68%) был обнаружен при апробации на питьевых водах.

Итоги апробации свидетельствуют о возможности применения биотестирования на *D. melanogaster* для генотоксического анализа вод с высоким уровнем токсичности: сточных, поверхностных, загрязненных питьевых вод.

Обсуждение результатов исследований

Под системой эколого-токсикологической оценки подразумевается получение интегральной качественной и количественной характеристики свойств воды по критерию ее опасности для жизнедеятельности водной флоры и фауны и отсутствию негативного влияния на теплокровных и человека.

Количество биотестов в наборе определяется требованиями, которые ставятся к эколого-токсикологической оценке вод. Если необходимо получить оперативную информацию о высокотоксичном источнике загрязнения водных объектов и в случае оценки залповых и аварийных сбросов сточных вод, можно применять биотест на фотобактериях с использованием специального прибора (биолюцинометра).

При эколого-токсикологической оценке природных вод (поверхностных и подземных) для получения более полной информации об уровне экологического загрязнения водных объектов и его опасности для гидробионтов необходимо использовать биотесты на бактериях и инфузориях.

Эколого-токсикологическая оценка водных источников была бы неполной, если бы она не учитывала риск токсичного загрязнения водной среды для здоровья человека. Чтобы как можно раньше оценить опасность поллютантов, попадающих в природные воды, которые используются населением, рекомендуется использовать биотесты, которые позволяют оперативно установить потенциальную угрозу загрязнения нормальному функционированию биоты и ее способность к самоочищению воды и сохранению санитарного режима на уровне установленных нормативных требований (Красовский и др., 1992).

Результаты наших исследований по апробации биотестов на питьевых водах показали, что включение для оценки токсичности воды биотеста на инфузориях *T. pyriformis*, который используется для определения биологической ценности продуктов питания и кормов (Методические рекомендации ..., 1992), и биотеста на мухах *D. melanogaster* позволяет установить потенциальную опасность питьевой воды для здоровья человека.

Выводы

Токсикологическая оценка водной среды с помощью биотестирования на бактериях *Ph. phosphoreum*, инфузориях *T. pyriformis* и мухах *D. melanogaster* обеспечивает раннюю диагностику качества воды. Полученная таким образом оперативная информация позволяет провести последующую проверку неблагоприятной ситуации принятыми в медицинской токсикологии методами с использованием теплокровных животных и своевременно принять меры по устранению назревающей угрозы здоровью населения и создания напряженной экологической обстановки.

Список литературы

- 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. – Пермь, 1989. – С. 21–22.
- Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. – М: Медицина, 1989. – С. 163–167.
- Геворкян Н.М., Дробицкая И.Е., Глотова Т.П. и др. Комплексная оценка загрязнений окружающей среды и уровня генетических повреждений у жителей г. Атбасар (Казахстан) // Гигиена и санитария. – 1994. – №8. – С. 37–40.
- Игнатъев 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.
- Красовский Г.Н., Авалиани С.Л., Жолдакова З.И., Косяков Г.Н. Система критериев комплексной оценки опасности химических веществ, загрязняющих окружающую среду // Гигиена и санитария. – 1992. – № 9–10. – С. 23–60.
- КНД 211.1.4.060-97. Методика визначення токсичності води на бактеріях *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford. – Київ, 1997. – 15с.
- КНД 211.1.4.059-97. Методика визначення токсичності води на інфузоріях *Tetrhymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff. – Київ, 1997. – 15с.
- 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.
- Методические рекомендации для использования экспресс-метода биологической оценки продуктов и кормов. – М.: ВАСХНИЛ, 1990. – 42с.
- НД. Методика визначення генотоксичності об'єктів довкілля за частотою виникнення домінантних летальних мутацій у мух *Drosophila melanogaster* Mg. – Київ, 1999. – 13с.
- РД 118-02-90. Методическое руководство по биотестированию воды. – М., 1991. – 48с.
- Усенко Е.В., Божков А.И., Калиман П.А. А. с. Способ определения генотоксичности водорастворимых веществ // БИ. – 1994. – №30. – С.190.
- Balley G. Measuring toxicity in soils and sediments // Water and waste Treat. (Gr. Brit.). – 1992. – Vol.35, №10. – P.48.
- Bulich A.A., Tung K.K., Scheibner G. The luminescent bacteria toxicity test: its potential as an in vitro alternative // G. Bioluminescence and chemiluminescence. - 1990. – Vol.5, 2 – P. 71–77.
- Microtox Manual. Micbics corporation. – 1992. – 1–5. – 476р.

**ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕСТІВ НА БАКТЕРІЯХ *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*,
ІНФУЗОРИЯХ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* І МУХАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ДЛЯ
ЕКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГІЧНОЇ ОЦІНКИ ВОДНИХ ОБ'ЄКТІВ
О.В.Усенко**

Проведена апробація на різних категоріях вод біотестів на бактеріях, інфузоріях і мухах для еколого-токсикологічної оцінки водного середовища. Було встановлено, що для отримання інформації про високотоксичність джерела забруднення водних об'єктів можна застосовувати біотест на фотобактеріях з використанням біолюмінометра, для отримання більш повної інформації про рівень екологічного забруднення необхідно використовувати біотести на бактеріях та інфузоріях; для оцінки токсичності питних вод необхідно включити біотести на інфузоріях і мухах, які дозволяють установити її потенційну небезпеку для здоров'я людини.

Ключеві слова: біотестування, токсичність, генотоксичність.

**USE OF BIOTESTS ON THE BACTERIA OF *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*, INFUSORIA
OF *TETRAHYMENA PYRIFORMIS* AND FLIES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* FOR
ECOLOGY-TOXICOLOGICAL ESTIMATION OF WATER OBJECTS
E.V.Usenko**

Approbation of biotests on bacteria, infusoria and flies on different categories of waters for the use in ecology-toxicological estimation of water environment was conducted. It was set, that for the receipt of

information about the high-toxic source of contamination of water objects it is possible to apply a biotest on photobacteria with using of bioluminometer, for the receipt of more complete information about the level of ecological contamination it is necessary to use biotests on bacteria and infusoria; for estimation of toxicity of drinking-water it is necessary to include biotests on infusoria and flies which allow to set its potential hazard on the man's health.

Key words: *biotesting, toxic, genotoxic.*

Представлено В.А.Малєєвим
Рекомендовано до друку Л.І.Воробйовою