

**ОЛЬКОВА А.С.**

*Вятский государственный гуманитарный университет*

*Россия, 610002, г. Киров, ул. Красноармейская, д. 26, e-mail: morgan-abend@mail.ru*

## **ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДНО-ТЕХНОГЕННЫХ СИСТЕМ БИОСФЕРЫ МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ: ОСОБЕННОСТИ ПРОБЛЕМЫ, ПУТИ РЕШЕНИЯ**

Определение интегральной токсичности сред методами биотестирования в настоящее время является неотъемлемой частью оценки состояния природных и природно-техногенных комплексов биосферы. Сочетание данных химического анализа и исследование ответных реакций живых организмов позволяет наиболее глубоко и детально охарактеризовать исследуемый компонент окружающей среды: установить причинно-следственные связи между антропогенным воздействием и наблюдаемыми откликами, определить устойчивость экосистемы, прогнозировать дальнейшее развитие и состояние района исследования.

Высокое значение применения биологиче-

### **Материалы и методы**

Объектами наших многолетних исследований являются компоненты природно-техногенных территорий Кировской области (Россия, подзона средней тайги). Образцы отбираются в зоне влияния объекта хранения и уничтожения химического оружия (ОХУХО) «Марядыковский», в районе химических предприятий г. Кирово-Чепецка и Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов, а также на территориях урбоэкосистем. Интегральная токсичность проб почв, природных вод (поверхностных и подземных), донных отложений определялась

### **Результаты и их обсуждение**

Обозначим несколько проблем, возникающих при исследовании состояния природно-техногенных систем методами биотестирования.

Естественная «матрица» водной среды влияет на определяемую интегральную токсичность. «Матрицей» природной воды мы называем здесь весь комплекс веществ, включенных в поверхностные или подземные воды естественным образом и активно формирующих химические, физико-химические и токсикологические свойства вод. Аспекты проблемы:

1) при оценке интегральной токсичности вод нередко «матрица» природной воды, которая принимает загрязнение, маскирует вредные вещества, например, за счет комплексообразования;

2) «матрица» как среда для культивирова-

ских методов подтверждается установленными эффектами синергизма и антагонизма многих веществ [1]. В этом случае проведение биотестов показывает реальное воздействие исследуемой среды на биоту исследуемой части биосферы.

При несомненных достоинствах и важности биологических методов экологических работ в процессе интерпретации результатов биотестирования исследователи сталкиваются с рядом трудностей.

Цель данной работы – обобщить, основываясь на многолетнем опыте, особенности и проблемы биотестирования компонентов окружающей среды по аттестованным методикам и предложить некоторые пути их решения.

по методикам биотестирования, допущенным для целей государственного экологического контроля и мониторинга и внесенным в федеральный реестр методик Российской Федерации (ФР.1.39.2007.03221, 2007; ФР.1.39.2007.03222, 2007; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04, 2007; ФР.1.31.2005.01882, 2010; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04, 2010). Использовались тест-организмы разных трофических групп: *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, *Paramecium caudatum*, *Escherichia coli*.

ния тест-организмов, обладая региональными и локальными особенностями, влияет на общее состояние биообъектов, их чувствительность и устойчивость к различным соединениям;

3) кроме того, при реализации многих методик биотестирования культивационная вода используется для приготовления серий разбавлений тестируемой среды, влияя на итоговый результат.

Проблема отчасти решается приёмами стандартизации тест-объектов, то есть поддержанием чувствительности к модельному токсиканту в установленном диапазоне, что предполагается всеми аттестованными методиками. Также необходимо подбирать так называемый фон. Им могут быть данные, полученные до начала воздействия источника загрязнения. Если

это невозможно, то устанавливается фоновый участок за пределами зоны влияния.

Следующая проблема свойственна для методик, в которых в качестве тест-функции выступает гибель организма. Наиболее известными нормативными документами, ориентирующимися на этот показатель, можно назвать методики с использованием низших ракообразных [2]. Дело в том, что до проявления крайней степени токсического эффекта, то есть гибели, можно наблюдать и использовать для оценки качества тестируемой среды массу показателей. Такие эффекты как изменение двигательной, пищевой активности, скорости размножения и другие реакции хорошо идентифицируются, особенно в экспериментах по установлению хронического токсического действия. Однако, существующие методики этого не предусматривают, вероятно, в силу усложнения процедуры обработки результатов. Например, классический биотест с использованием *Daphnia magna* в части определе-

ния хронических воздействий предполагает подсчёт количества абортных яиц, но при обработке результатов эти данные не используются.

Для учёта такого значимого показателя как количество абортных яиц предлагаем усовершенствование методики путём введения коэффициентов. Они снижают итоговые показатели плодовитости в соответствии с долей абортных яиц от общего числа молоди, полученной в тестируемом варианте. Если количество абортных яиц не превысило 5 % от числа молоди за период эксперимента, то показатель плодовитости уменьшим в 1,1 раз; абортных яиц от 5 до 10 % - в 1,2 раза; более 10 % - в 1,5 раза.

При исследовании водоёмов г. Кирова определялась хроническая токсичность образцов воды. Резкого снижения плодовитости не наблюдалось, но в ряде проб отмечено появление абортных яиц, что считается крайне негативным явлением. Приводим краткий пример использования предложенных коэффициентов.

Таблица 1. Использование понижающих коэффициентов наличия абортных яиц для корректировки результатов хронических экспериментов (тест-объект *Daphnia magna*)

Вариант	Плодовитость на 1 самку	Количество абортных яиц (их доля от общего числа молоди)	Показатель плодовитости с учётом коэффициента	Заключение о токсичности образца*
Контроль	17,0	0	-	-
Проба 1	9,1	0	9,1	Оказывает хроническое токсическое действие
Проба 2	16,2	9 (1,85 %)	14,7	Оказывает хроническое токсическое действие
Проба 3	17,7	33 (6,2%)	14,75	Оказывает хроническое токсическое действие

\*Примечание: заключение о токсичности сделано по показателю плодовитости с учетом понижающего коэффициента

Открытым вопросом реализации и разработки новых методик биотестирования является интерпретация явлений стимуляции тест-функций живых организмов. Под стимуляцией мы понимаем здесь увеличение количественных характеристик состояния организма или их совокупности в процессе эксперимента по установлению токсичности по сравнению с контрольным вариантом. Большинство методик такие эффекты не учитывают. Например, в ФР.1.31.2005.01881 (тест-объект инфузории) согласно пункту 9.4: «отрицательные значения свидетельствуют об отсутствии токсичности и могут быть оценены как нулевые» [3]. Фактиче-

ски при проведении эксперимента наблюдается стимуляция хемотаксиса и общей двигательной активности инфузорий по сравнению с контролем. Инфузории за 30 минут тест-реакции поднимаются в верхнюю часть кюветы, что характерно для нетоксичных проб, и начинали там очень активно двигаться, завышая измеряемые показатели. Такая реакция может быть начальной стадией токсического эффекта. При увеличении экспозиции после стимуляции двигательной активности особи начинают погибать. Однако, гибель после стимуляции не является обязательным развитием ситуации. Если причиной стимуляции явилось повышенное содержание

питательных веществ, то наступления крайней степени токсического эффекта мы не увидим.

Исследователями показано, что влияние многих загрязняющих веществ проявляется до определенного порога в стимуляции как тест-функций, так и продуктивности целых экосистем, и только при повышении дозы начинается угнетение [4]. Для инфузорий наличие стадии стимуляции в динамике токсического эффекта показано авторами при воздействии малого содержания многих загрязняющих веществ (солей металлов, фенолов, пестицидов) [5].

Нами делаются попытки интерпретации явлений стимуляции тест-функций как при работе с естественными средами, так и при проведении модельных экспериментов.

Исследовалась проблема загрязнения почв фторидами, техногенными источниками которого могут являться производства алюминия, заводы, производящие фторполимеры и объекты уничтожения фторсодержащих отравляющих

веществ [6]. Эксперимент проводился с использованием тест-системы «Эколюм» и инфузорий [3, 7, 8]. Дозы фторида натрия, действие которых изучалось в эксперименте с почвами, были предварительно протестированы в водных растворах. Концентрации водных растворов соответствовали вариантам опыта на почвах. При этом исходили из допущения, что вся добавка в почву перейдет в раствор в процессе приготовления водной вытяжки. В результате этого тестируемые растворы содержали 0,17, 0,25, 0,42, 0,5, 0,58 ПДК фторид-иона. Все модельные растворы оказались высокотоксичными как для бактерий тест-системы «Эколюм», так и для инфузорий, то есть наблюдалось резкое угнетение тест-функций.

При внесении аналогичных доз фторида натрия в почву наблюдали стимуляцию тест-функций. Однако, степень стимуляции снижалась в ответ на увеличение дозы токсиканта (табл. 2).

Таблица 2. Снижение эффекта стимуляции тест-функций при увеличении дозы фторид-иона

Вариант модельного опыта	Стимуляция биолюминесценции бактерий тест-системы «Эколюм» по сравнению с контролем, %	Стимуляции хемотаксической реакции инфузорий по сравнению с контролем, %
Контроль	100	100
100 ПДК	176	213
150 ПДК	94	166
200 ПДК	90	109
250 ПДК	79	94
300 ПДК	64	31
350 ПДК	53	угнетение

В данном примере проявляется также и эффект «матрицы»: комплекс веществ, насыщающих водную вытяжку из почвы маскирует воздействие введенного вещества вплоть до значительных превышений норматива.

При определении токсичности природных вод, как поверхностных, так и подземных, также нередко встречаются стимуляция тест-объектов на фоне относительно невысокого загрязнения

поллютантами, а также сложного комплексного загрязнения. Приводим несколько примеров (табл. 3).

Сопоставляя данные биотестирования и химического анализа, можно утверждать, что представленные пробы нельзя назвать безопасными. При всей неоднозначности вынесения заключения о токсичности пробы по показателю стимуляции потребность в таком критерии есть.

### Выводы

Таким образом, интерпретация результатов биотестирования, по возможности, должна осуществляться с учетом естественной «матрицы», эффектов стимуляции, а также реакций организмов, проявляющихся до гибели особей. По

нашему мнению, требуется совершенствование методической базы, создание банка данных, отражающих зависимость «доза-эффект», эффекты сочетанного действия загрязняющих веществ, а также комплексного действия факторов.

Таблица 3. Эффект стимуляции хемотаксиса инфузорий в сопоставлении с данными химического анализа при исследовании природной поверхностной воды

№ пробы	Стимуляции хемотаксической реакции инфузорий по сравнению с контролем, %	Кратность превышения ПДК
1	15	As - 1,14 Be - 1,1 Pb - 1,3 F - 1,8 Al - 8,5
2	17	As - 0,85 F - 3 Mg - 1,5 Mn - 56 Fe - 10
3	18	As - 1,2 Mg - 1,5 Mn - 92 Br - 15 Ni - 1,1
4	22	Mg - 2 Mn - 216 Fe - 2,7 Sr - 7,5 Ba - 2,5 Br - 1,1 Ni - 9 Cd - 3 Tl - 1,3

*Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-3326.2012.5.*

#### Литература

1. Никаноров А.М., Хоружая Т.А., Бражникова Л.В., Жулидов А.В. Мониторинг качества вод: оценка токсичности. – Санкт-Петербург: Гидрометеиздат, 2000. – 159 с.
2. ФР.1.39.2007.03222 Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М.: Акварос, 2001. – 48 с.
3. ФР. 1.31.2005.01881 (ред. 2010) Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных вод экспресс-методом с применением прибора «Биотестер». ООО «СПЕКТР-М», 2010. – 13 с.
4. Марфенина О. Е. Микробиологические аспекты охраны почв. М.: Изд-во МГУ, 1991. – 118 с.
5. Никаноров А. М., Трунов Н.М. / под ред. Бедрецкого А. И. Внутриводоемные процессы и контроль качества природных вод С-Пб.: Гидрометеиздат, 1999. – 150 с.
6. Некрасова Ю. Н., Олькова А. С., Дабах Е. В. Влияние фторида натрия на физико-химические свойства и интегральную токсичность почв в модельном эксперименте // Теоретическая и прикладная экология. – 2012. – № 3. – С. 48-53.
7. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 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", 2010.
8. ФР. 1.31.2005.01882 (ред. 2010) Методика определения токсичности проб почв, донных отложений и осадков сточных вод экспресс-методом с применением прибора «Биотестер»: ООО «СПЕКТР-М». – 2010.

**OLKOVA A.S.**

*Vyatka State University of Humanities*

*Russia, 610002, Kirov, Krasnoarmeyskaya str. 26, e-mail: morgan-abend@mail.ru*

## **RESEARCH EXPERIENCE NATURAL AND INDUSTRIAL SYSTEMS OF THE BIOSPHERE BY BIOASSAY METHODS: FEATURES PROBLEMS, SOLUTIONS**

**Aims.** Synthesis of many years of experience with the features and problems of bioassays environmental components according to the certified methods and develop some solutions. **Methods.** With the test organisms of different trophic groups determined by the integral components of the toxicity of natural and industrial systems. We used the following organisms: *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, *Paramecium caudatum*, *Escherichia coli*. **Results.** Interpretation of the results of bioassays, if possible, should take into account the natural "matrix", effects of stimulation, as well as organisms reactions, manifested before the death of individuals. **Conclusion.** In our opinion, requires better methodological framework, the creation of a data bank, reflecting the dependence of the "dose-effect", the effects of the combined action of pollutants, as well as integrated effect of factors.

**Key words:** bioassay, the integrated toxicity, natural and industrial systems.

**СУСЛОВА О.С., ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., МАЦЕЛЮХ Б.П., ТАШИРЕВ О.Б.**

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України*

*Україна, ДОЗ680, Київ МСП, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: Golembiovaska@ukr.net*

## **ПІГМЕНТИ ДРІЖДЖІВ, ВИДІЛЕНИХ З ПЕЧЕРИ МУШКАРОВА ЯМА**

На сьогоднішній день карстові порожнини залишаються малодослідженими еконішами Землі щодо існування в них біологічних об'єктів. Печера Мушкарова Яма (Тернопільська область, Україна) утворена з гіпсу і є однією з таких порожнин. З цієї печери співробітниками нашого інституту на середовищі з високою концентрацією іонів токсичних металів ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}_4\text{O}^{2-}$ ) був виділений ряд мікроорганізмів. Серед них особливу увагу привернули колонії, які на другу добу культивування накопичували внутрішньоклітинний пігмент рожевого кольору. За допомогою методів світлової мікроскопії визначено, що дані мікроорганізми мають типову для дріжджів морфологію.

Дріжджі – хемоорганогетеротрофні мікроорганізми, класичними джерелами виділення яких в мікробіологічній практиці є субстрати, багаті на цукристі речовини [1]. Такими є поверхні плодів, листків чи місця навколо тріщин в корі, звідки може витікати сік дерев. Існування в таких місцях забезпечується харчуванням дріжджів прижиттєвими виділеннями рослин, некта-

ром квітів, раневими соками рослин, мертвою фітомасою і т. д. Відомі також представники дріжджів роду *Lypomyces*, які поширені у ґрунті, особливо у підстилці. Дріжджі родів *Candida*, *Pichia*, *Ambrosiozyma* постійно присутні у кишечнику і ходах ксилофагів (комах, що харчуються деревиною), різноманіття дріжджових співтовариств розвиваються також на листі, ураженому тлюю [7]. Українськими дослідниками були виділені дріжджі, переважно родів *Rhodotorula*, з ґрунтів скелястої області Малих Карпат та високогірних районів Криму, які відкриті сонячному випромінюванню [2]. Тому у нас викликало зацікавлення виділення пігментованих дріжджів з такої екосистеми як карстова печера, адже вона характеризується відсутністю світла і обмеженістю органічних речовин, що легко засвоюються.

Метою даної роботи була первинна ідентифікація внутрішньоклітинних кольорових пігментів, які синтезують дріжджі, виділені з печери Мушкарова Яма.

### **Матеріали і методи**

Препарати для світлової мікроскопії фіксували в полум'ї пальника і фарбували 0,5% водним розчином фуксину основного [1].

Дріжджі вирощували на м'ясопептоному агарі та на середовищі сусло при рН 4 [2]. Куль-

тивування на обох середовищах проводили протягом 3 діб при наявності та відсутності (термостат) світла, t 21 і 28°C. Біомасу дріжджів знімали з поверхні агару скальпелем, висушували при t 60-80°C та розтирали у фарфоровій ступці ква-