



**ИБВВ РАН**



# **МЕТОДЫ БИОДИАГНОСТИКИ ПРИ ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ**

**Курс лекций**

**Лекция 3  
Биотестирование**

**Г.М. Чуйко**

**Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия**

**Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова**

**[gchuiko@mail.ru](mailto:gchuiko@mail.ru)**

# Компоненты современной системы оценки антропогенного влияния на окружающую среду

**Физико-химический анализ**  
(количественная и качественная оценка стресс-фактора)

**Биодиагностика**  
(ответы биосистем на разных уровнях биологической организации)

**Биомаркирование**  
(суборганизменный уровень)

**Биотестирование**  
(уровень целого организма)

**Биоиндикация**  
(надорганизменный уровень)

Аналитические физико-химические методы используются для качественной и количественной оценки антропогенных факторов окружающей среды методами физико-химического анализа, а биодиагностика – для оценки степени их воздействия на биоту по её реакциям на разных уровнях биологической организации.



**Биотестирование** – оценка токсичности воды и донных отложений по ответным реакциям (выживаемость, размножение, рост, двигательная активность, поведение и т.п.) тест-организмов разных экологических уровней (микроорганизмы, простейшие, одноклеточные водоросли, беспозвоночные, икра, мальки и взрослые рыбы) из лабораторных культур;





С исторической точки зрения один из первых биотестов, примененных человеком – использование шахтерами в средние века (XVI-XIX вв.) канареек для обнаружения скопления газа рудничных газов (метана, углекислого и угарного газов) в забоях при разработке угля конце.



В гидробиологии биотестирование известно с начала XX в. как «рыбная проба», когда для оценки токсичности воды начали использовать рыб.



**Биотестирование как способ оценки качества воды вошел в практику в начале XX в., когда для токсикологической характеристики широко использовали «рыбную пробу».**

**Первые биотесты на планктонных ракообразных – дафниях и циклопах, были выполнены в 1918 г. В дальнейшем основным тест-объектом длительное время служила *Daphnia magna*.**

**С конца 30-х годов в качестве тест-объектов стали широко использоваться гидробионты разного систематического и трофического уровня.**

**В 1940 – 1941 гг. в систему испытаний включили простейших, ракообразных, червей и рыб.**

**Однако целенаправленная разработка и развитие методов биотестирования началось в конце 60-х – начале 70-х ХХ в., что на 20 лет раньше методов биомаркирования и биоиндикации.**

**Советский Союз (СССР), вместе с США и Германией занимал лидирующие позиции в мире в этом вопросе.**

**Исследования проводились большим коллективом отечественных водных токсикологов при решающем участии Н.С. Строганова (МГУ), Л.А. Лесников (ГосНОРХ), Б.А. Флеров (ИБВВ РАН), В.А. Терехова (МГУ), И.И. Томилина (ИБВВ РАН) и др.**



**За биологические показатели оценки качества воды были приняты:**

**1. Острая летальная токсичность**

- **Выживаемость**

**2. Хроническая сублетальная токсичность**

- **Репродуктивная способность (размножение)**
- **Выживаемость нарождающейся молодежи**
- **Темп роста**
- **Увеличение массы**
- **Поведенческие реакции – двигательная активность, реакция избегания, интенсивность питания**
- **Внешнее проявление физиологических функций – частота дыхания, частота сердечных сокращений, внешний симптомокомплекс и т.д.**

## Острая летальная токсичность

Токсическое действие, проявляющееся за период экспозиции к токсическому фактору не более 96 ч и заканчивающееся гибелью организма.

Токсикометрический критерий:

$ЛК_{50}$  ( $LC_{50}$ ) – летальная (смертельная) концентрация, вызывающая по сравнению с контролем гибель 50% и более тест-организмов за 96ч экспозиции.

$ЛД_{50}$  ( $LD_{50}$ ) – летальная (смертельная) доза, вызывающая гибель 50% и более тест-организмов за 96 ч экспозиции.



## Хроническая сублетальная токсичность

Токсическое действие, проявляющееся за период экспозиции к токсическому фактору более 96 ч и проявляющееся в специфическом симптомокомплексе отравления, который включает изменение внешнего вида, нарушение поведения и внешнего проявления физиологических функций организма.

Токсикометрический критерий:

$ЭК_{20}$  ( $ЕС_{20}$ ) – эффективная концентрация, вызывающая изменения в регистрируемых параметрах у 50% тест-организмов более чем за 96 ч экспозиции.

$ЭД_{20}$  ( $ED_{20}$ ) – эффективная доза, вызывающая изменения в регистрируемых параметрах у 20% тест-организмов за более чем 96 ч экспозиции.

**Однако целенаправленная разработка и развитие методов биотестирования началось в конце 60-х – начале 70-х XX в., что на 20 лет раньше методов биомаркирования и биоиндикации.**

**Советский Союз (СССР), вместе с США и Германией занимал лидирующие позиции в мире в этом вопросе.**

**Исследования проводились большим коллективом отечественных водных токсикологов при решающем участии Н.С. Строганова (МГУ), Л.А. Лесников (ГосНОРХ), Б.А. Флеров (ИБВВ РАН), В.А. Терехова (МГУ),**

**И.И. Томилина (ИБВВ РАН) и др.**

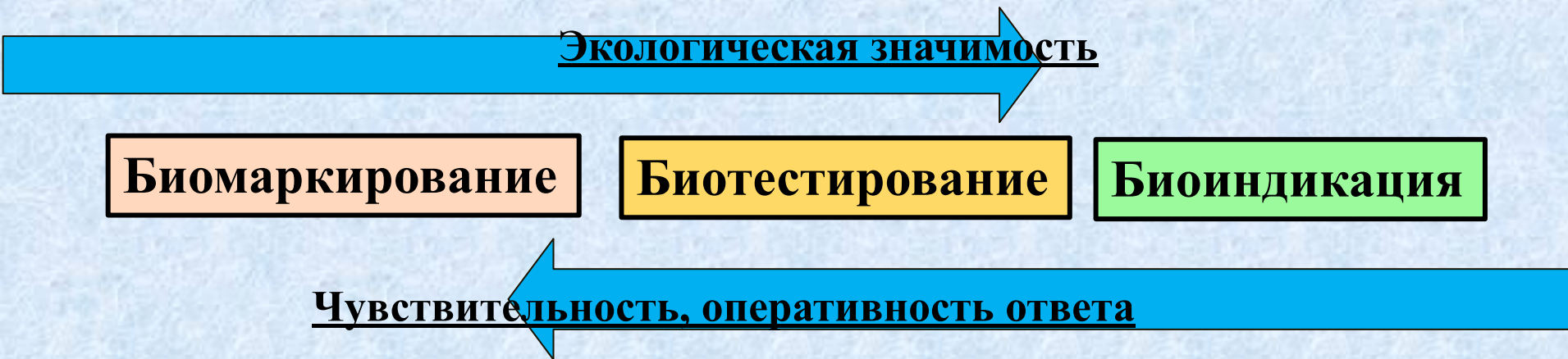


# Биотестирование

Биотестирование обладает меньшей оперативностью ответа, чем биомаркирование (от нескольких часов до нескольких недель), но его экологическая значимость на уровне отдельной особи более очевидна: гибель организма, снижение репродуктивной способности вплоть до прекращения воспроизводства, нарушения роста, развития, различных типов поведения и т.д.



# Эффективность методов биодиагностики антропогенного влияния на окружающую среду



Суборганизменный (биомаркирование) и организменный (биотестирование) уровни:

- время ответа от нескольких минут до нескольких дней,
- использование в оперативном биомониторинге,
- нельзя адекватно оценить изменения в экосистемах за длительное время и прогнозировать варианты воздействия на дальнейшее развитие экосистем.

Надорганизменные биосистемы (биоиндикация):

- время ответа от нескольких недель до нескольких лет
- использование в долгосрочном биомониторинге,
- позволяют адекватно оценить изменения в экосистемах за длительное время и прогнозировать варианты воздействия на дальнейшее развитие экосистем.





# Биотестирование

- **Использование нескольких тест-организмов из разных экологических групп (простейшие, микроводоросли, беспозвоночные, высшие растения, рыб)**
- **Показатели: выживаемость, рост, стадии развития, двигательная активность, репродуктивные способности, поведенческие реакции, внешние морфо-анатомические проявления**



# Используемые в биотестировании группы гидробионтов и методы учета (РД 52.24.690-2006)

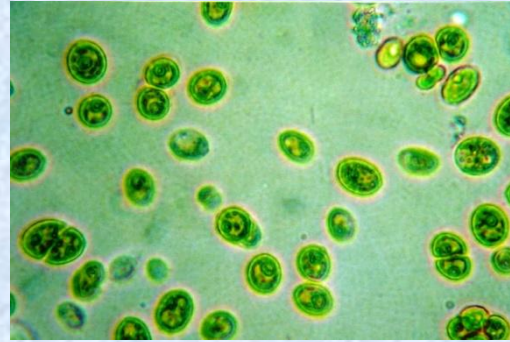
Тест-объект	Метод учета	
	Молодь (ювенильные особи)	Гибель (отмершие особи)
<b>PROTOZOA (Простейшие)</b> родов <i>Paramecium</i> , <i>Tetrachimena</i> , <i>Colpidium</i> , <i>Stylonichia</i>	<b>Микроскопирование:</b> - индивидуальные линии - подсчет численности	<b>Микроскопирование:</b> подсчет количества погибших особей
<b>ALGAE (Одноклеточные водоросли)</b> <i>Clorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	<b>Визуально:</b> - подсчет количества живых и погибших особей - внешний вид
<b>ROTATORIA (Коловратки)</b> <i>Brachionus calyciflorus</i> , <i>B. rubens</i> , <i>B. plicatilis</i> , <i>Philodina roseola</i> , <i>P. acuticornis</i>	<b>Микроскопирование:</b> - индивидуальные линии - подсчет молодежи	<b>Микроскопирование:</b> подсчет количества погибших особей
<b>CRUSTACEA (Ракообразные)</b> <i>Daphnia magna</i> , <i>Moina macrocopa</i> , <i>Ceriodaphnia reticulata</i> , <i>Artemia salina</i>	<b>Визуально:</b> - поведение - подсчет молодежи	<b>Визуально:</b> - подсчет количества погибших особей
<b>OLIGOCHAETA (Малощетинковые черви)</b> <i>Aeolosoma hemprichi</i> , <i>Hirudo medicinalis</i>	<b>Визуально:</b> - поведение - наличие кладок - симптомокомплекс	<b>Визуально:</b> - подсчет количества погибших особей

# Используемые в биотестировании группы гидробионтов и методы учета (РД 52.24.690-2006)

Тест-объект	Метод учета	
	Молодь (ювенильные особи)	Гибель (отмершие особи)
<b>Insecta (Насекомые)</b> <i>Chironomus plumosus, Ch. riparius</i> (личинки)	<b>Визуально:</b> - рост, время развития до куколки	<b>Визуально:</b> - подсчет количества погибших особей
<b>MOLLUSCA (Моллюски)</b> - <i>Lymnaea stagnalis;</i> - <i>Anadonta sp., p. Mytilis, p. Dreissena</i>	<b>Визуально:</b> - количество кладок - количество молодежи - частота сердечных сокращений (ЧСС)	<b>Визуально:</b> - подсчет количества погибших особей
<b>PISCES (Рыбы)</b> <i>Poecilia reticulata, Danio rerio</i>	<b>Визуально:</b> - количество молодежи - эмбриональное развитие - частота «кашля»	<b>Визуально:</b> - подсчет количества погибших особей
<b>Insecta (Насекомые)</b> <i>Chironomus plumosus, Ch. riparius</i> (личинки)	<b>Визуально:</b> - рост, время развития до куколки	<b>Визуально:</b> - подсчет количества погибших особей



# Тест-объекты



*Spirostomum ambiguum*  
*Tetrahymena thermophila*

*Chlorella vulgaris*

*Daphnia magna*  
*Ceriodaphnia dubia (affinis)*



*Dreissena polymorpha*

*Allium seppa*



*Chironomus riparius*



*Danio rerio*



# Заслуживают внимания специализированные методы биотестирования

- Интенсивно развиваются биосенсорные методы выявления токсичности вод.
- Разрабатываются электрохимические, оптические (на основе абсорбции, флуоресценции, люминесценции), акустические и оптико-электронные приборы.
- Биосенсорами, т.е. чувствительными элементами в них, служат ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты, микробные клетки.
- К числу явных преимуществ биосенсорных методов анализа можно отнести их направленность на определение конкретных загрязняющих веществ. При разработке новых биосенсорных методик биотестирования токсичности водной среды особое внимание в ряду тест-объектов занимают светящиеся бактерии. Природные штаммы этих бактерий, а также генно-инженерные конструкции, используют в качестве биологической основы биосенсоров – биоэлектронных систем, позволяющих в режиме on line регистрировать гибель, или изменение параметров метаболизма живых систем.

**Биосенсор** — это аналитический прибор, в котором для определения химических соединений используются реакции этих соединений, катализируемые ферментами, иммунохимические реакции или реакции, проходящие в органеллах, клетках или тканях. В биосенсорах биологический компонент сочетается с физико-химическим преобразователем.

Биосенсоры состоят из трёх частей:

- *биоселективного элемента* (биологический материал, например ткани, микроорганизмы, органеллы, клеточные рецепторы, ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты, и т. д.), материал биологического происхождения или биомимик). Чувствительный элемент может быть создан с помощью биоинженерии.
- *преобразователя* (работает на физико-химических принципах; оптический, пьезоэлектрический, электрохимический, и т. д.), который преобразует сигнал, появляющийся в результате взаимодействия аналита с биоселективным элементом, в другой сигнал, который проще измерить;
- *связанная электроника*, которая отвечает в первую очередь за отображение результатов в удобном для пользователя виде

**Самый известный пример коммерческого биосенсора — это биосенсор для измерения уровня глюкозы в крови, в котором используется фермент глюкозооксидаза для расщепления содержащейся в крови глюкозы.**

**В процессе расщепления фермент сначала окисляет глюкозу и использует два электрона для восстановления ФАД (компонент фермента) в ФАДН<sub>2</sub>, который, в свою очередь, окисляется в несколько ступеней электродом.**

**Результирующий ток пропорционален концентрации глюкозы. В этом случае, электрод является преобразователем, а фермент — биоселективным элементом.**





# Основные общие методические положения биотестового анализа





**Одна и та же проба на разные тест-объекты  
оказывает разный уровень воздействия**



**Хроническое токсическое  
действие**

**Подострое токсическое  
действие**

**Острое токсическое действие**

**Результаты биотестирования не редко  
имеют неоднозначный характер**

# Методология биотестового анализа

## Блок 1

Унификация биотестов

Стандартизация биотестов

Выход на приборный  
уровень  
(инструментализация)

Биосенсоры на основе  
биомаркеров  
(идентификация  
загрязняющих в-в ?)

## Блок 2

Синхронный отбор проб

Два контроля

Содержание маточной  
культуры в стандартных  
условиях

Проверка пригодности  
тест-объектов

# Методология

## Блок 3

Набор биотестов  
(biotest battery)

Экспресс-биотесты

Этологические биотесты

Длительные биотесты  
(prolong test)

Адресное биотестирование

Знание и учет  
эколого-биологических  
особенностей  
тест-объектов

## Блок 4

Регулярность  
биотестовых  
исследований водного  
объекта

Использование  
биотестирования в  
качестве скрининга

Определение кратности  
разбавления в случае ОТД

Итоговая оценка  
токсичности по набору  
биотестов

## Биотестирование водных растворов NaCl с использованием семян овса



контроль

1 г/дм<sup>3</sup>

5 г/дм<sup>3</sup>

25 г/дм<sup>3</sup>

Длина корней семян овса после 5 суток прорастания в среде с различной концентрацией NaCl





контроль	1 г/дм <sup>3</sup>	5 г/дм <sup>3</sup>	25 г/дм <sup>3</sup>
----------	---------------------	---------------------	----------------------

Длина корней семян овса после 5 суток прорастания в среде с различной концентрацией NaCl













Установка для биотестирования вод, суспензий почв и отходов на проростах семян растений



Таблица 1.

Специфичные симптомы отравления и последовательность их проявления у пиявки *Hirudo medicinalis* в растворах антихолинэстеразных веществ.

Описание симптомов, стадия	Фото
Латентный период, симптомы отсутствуют. Стадия 1	
Подгиб задней присоски, неспособность фиксировать ее к субстрату. Стадия 2.	
Все более сильное закручивание каудального конца пиявки вокруг задней присоски. Стадия 3	
Тело в форме улитки; двигательная активность прекращена. Стадия 4.	
Тело в форме «штопора», (контрактура диагонального слоя мышц). Стадия 5.	
Переход из «штопора» в 1-2 см «кубышку», (контрактура продольных мышц). Стадия 6.	
Глотка открывается, начинают работать челюсти, засасывается раствор, масса червя увеличивается до 130-200 %. Стадия 7.	
Выделяется обильно моча, масса пиявки падает до 100% и ниже, расслабляются продольные мышцы, тело удлиняется. Стадия 8.	
Тело распрямлено, достигает своих нормальных размеров 5-7 см. Стадия 9.	
Дорзальные мышцы сокращены более вентральных, тело пиявки дугообразно изогнуто. Стадия 10.	

# Биотестирование донных отложений Рыбинского водохранилища с использованием личинок хирономид



✓ Гибель личинок хирономид за 14 суток - 100 %

✓ Гибель личинок хирономид за 14 суток - 10 %

