



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

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 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.



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:

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

LD_{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.

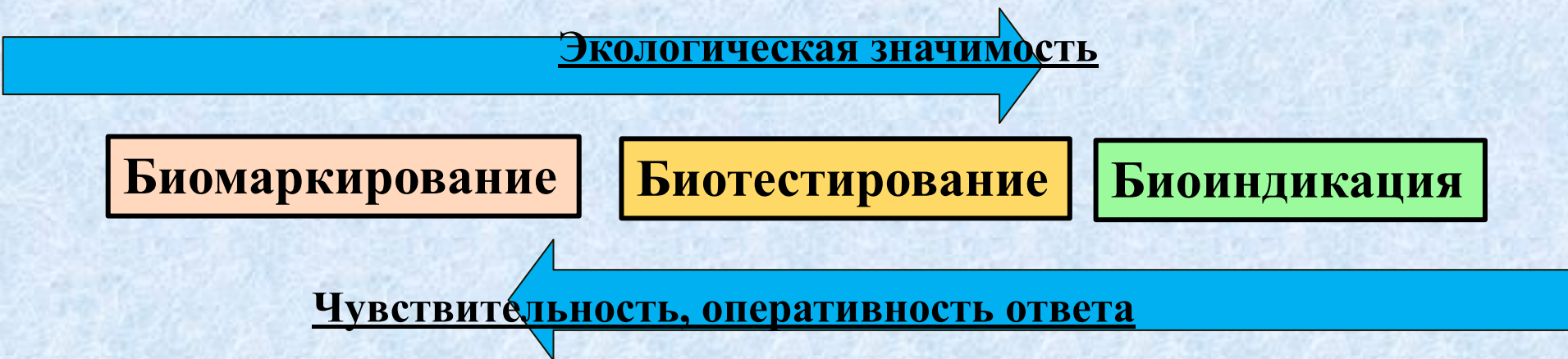


Биотестирование

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



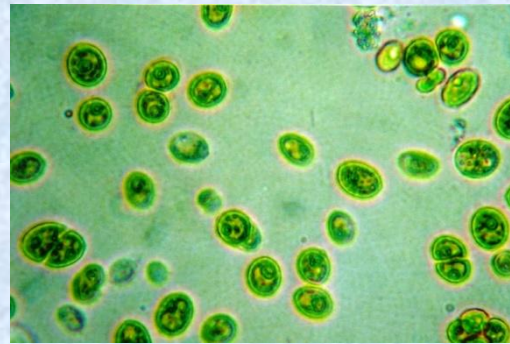
Используемые в биотестировании группы гидробионтов и методы учета (РД 52.24.690-2006)

Тест-объект	Метод учета	
	Молодь (ювенильные особи)	Гибель (отмершие особи)
PROTOZOA (Простейшие) родов <i>Paramecium</i> , <i>Tetrachimena</i> , <i>Colpidium</i> , <i>Stylonichia</i>	Микроскопирование: - индивидуальные линии - подсчет численности	Микроскопирование: подсчет количества погибших особей
ALGAE (Одноклеточные водоросли) <i>Clorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>	-	Визуально: - подсчет количества живых и погибших особей - внешний вид
ROTATORIA (Коловратки) <i>Brachionus calyciflorus</i> , <i>B. rubens</i> , <i>B. plicatilis</i> , <i>Philodina roseola</i> , <i>P. acuticornis</i>	Микроскопирование: - индивидуальные линии - подсчет молодежи	Микроскопирование: подсчет количества погибших особей
CRUSTACEA (Ракообразные) <i>Daphnia magna</i> , <i>Moina macrocopa</i> , <i>Ceriodaphnia reticulata</i> , <i>Artemia salina</i>	Визуально: - поведение - подсчет молодежи	Визуально: - подсчет количества погибших особей
OLIGOCHAETA (Малощетинковые черви) <i>Aelosoma hemprichi</i> , <i>Hirudo medicinalis</i>	Визуально: - поведение - наличие кладок - симптомокомплекс	Визуально: - 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)
Insecta (Насекомые) <i>Chironomus plumosus</i> , <i>Ch. riparius</i> (личинки)	Визуально: - рост, время развития до куколки	Визуально: - подсчет количества погибших особей
MOLLUSCA (Моллюски) - <i>Lymnaea stagnalis</i> ; - <i>Anadonta sp.</i> , <i>p. Mytilis</i> , <i>p. Dreissena</i>	Визуально: - количество кладок - количество молоди - частота сердечных сокращений (ЧСС)	Визуально: - подсчет количества погибших особей
PISCES (Рыбы) <i>Poecilia reticulate</i> , <i>Danio rerio</i>	Визуально: - количество молоди - эмбриональное развитие - частота «кашля»	Визуально: - подсчет количества погибших особей
Insecta (Насекомые) <i>Chironomus plumosus</i> , <i>Ch. riparius</i> (личинки)	Визуально: - рост, время развития до куколки	Визуально: - 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, флюоресценции, 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, появившийся 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_2 , который, в свою очередь, окисляется в несколько ступеней электродом.

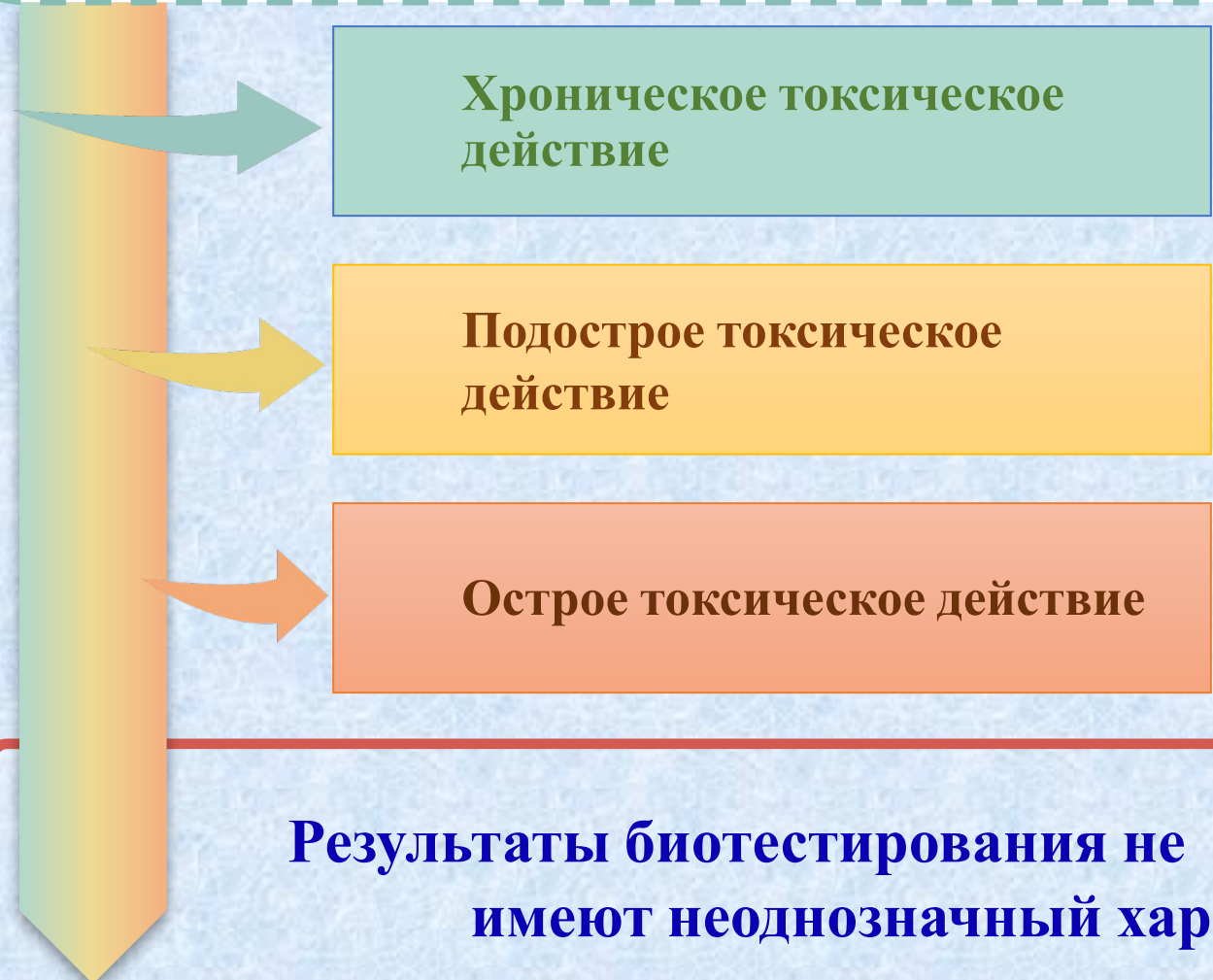
Результирующий ток пропорционален концентрации глюкозы. В этом случае, электрод является преобразователем, а фермент — биоселективным элементом.



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/дм³

5 г/дм³

25 г/дм³

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



контроль	1 г/дм ³	5 г/дм ³	25 г/дм ³
----------	---------------------	---------------------	----------------------

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 %

