

---

# ■ БИОТЕСТИРОВАНИЕ

- В целях общей оценки состояния окружающей среды и определения вклада отдельных источников в ее загрязнение, применяют санитарно-гигиенические и токсикологические нормативы (предельно допустимые концентрации поллютантов, предельно допустимые уровни воздействия).
- Антропогенные загрязнения действуют на живые организмы, и в том числе на человека, в самых различных сочетаниях, комплексно. Их интегральное действие можно оценить только по реакции живых организмов или сообществ.

- Используемые в практике экологического и санитарно-гигиенического нормирования показатели (ПДК, ПДД, ПДУ), всегда базирующиеся на токсикологических исследованиях с тестированием отдельных биообъектов, не могут учитывать изменений токсичности загрязнителей за счет эффектов синергизма или антагонизма при сочетанном действии антропогенных факторов. Эти нормативы не отражают зависимости токсического действия загрязнения от физических факторов среды, не учитывают процессы естественных трансформаций веществ в окружающей среде или исчезновения их в ходе детоксикации среды от конкретных загрязнителей.

- Биоиндикацию и биотестирование используют для получения объективных интегральных оценок качества среды. Биологические методы контроля качества среды ~~не требуют предварительной идентификации~~ конкретных химических соединений или физических воздействий, они достаточно просты в исполнении, многие экспрессны, дешевы и позволяют вести контроль качества среды в непрерывном режиме. Вместе с тем после выявления общей токсичности образцов почвы или воды для определения ее причин необходимо применить аналитические методы. Традиционные физико-химические методы необходимы также для оценки вклада отдельных предприятий или иных источников загрязнения в интегрированное техногенное воздействие на природу. Однако для общей оценки и прогноза состояния экосистем необходимо применение ~~методов биологической диагностики.~~

- Под **биотестированием** (англ. bioassay) обычно понимают процедуру установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности ~~независимо от того, какие вещества и в каком сочетании~~ вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов.
- Благодаря простоте, оперативности и доступности биотестирование получило широкое признание во всем мире.

- Биотестирование как метод оценки токсичности водной среды используется:
  1. при проведении токсикологической оценки промышленных, сточных бытовых, сельскохозяйственных, дренажных, загрязненных природных и пр. вод с целью выявления потенциальных источников загрязнения,
  2. в контроле аварийных сбросов высокотоксичных сточных вод,
  3. при проведении оценки степени токсичности сточных вод на разных стадиях формирования при проектировании локальных очистных сооружений,
  4. в контроле токсичности сточных вод, подаваемых на очистные сооружения биологического типа с целью предупреждения проникновения опасных веществ для биоценозов активного ила,
  5. при определении уровня безопасного разбавления сточных вод для гидробионтов с целью учета результатов биотестирования при корректировке и установлении предельно допустимых сбросов (ПДС) веществ, поступающих в водоемы со сточными водами,
  6. при проведении экологической экспертизы новых материалов, технологий очистки, проектов очистных сооружений и пр.

# Определения

- **Биотестирование** – оценка токсичности объекта внешней среды по его воздействию на биологическую тест-систему.
- **Тест-система** – это пространственно ограниченная совокупность чувствительных элементов (тест-организмов) и среды, в которой они находятся. Тест-система может состоять из группы организмов одного вида сообщества нескольких биологических видов, целой экосистемы.
- **Тест-реакция** – закономерно возникающей ответной реакции тест-системы на воздействие комплекса внешних факторов, выбранных для анализа состояния этой системы.
- **Тест-критерий** - это показатель, на основании которого производится оценка изменения тест-системы. По степени проявления тест-реакции судят о токсичности исследуемого образца

■ В результате воздействия токсического вещества тест-объект или вся тест-система претерпевает определенную деформацию, что проявляется в виде ряда реакций тест-системы на различных уровнях ее функционирования.

■ Эти реакции различаются по чувствительности, скорости проявления, легкости наблюдения. Одну из этих реакций выбирают в качестве тест-реакции – закономерно возникающей ответной реакции тест-системы на воздействие комплекса внешних факторов, выбранных для анализа состояния этой системы.

■ Степень проявления тест-реакции оценивается по тест-критерию. Это показатель, на основании которого производится оценка изменения тест-системы. По степени проявления тест-реакции судят о токсичности исследуемого образца.



■ В качестве тест – организмов, как правило, используются бактерии, водоросли, простейшие, ракообразные и рыбы. *Daphnia magna* Straus является международным стандартизированным тест – объектом, и метод с их использованием считается одним из основных и наиболее показательных. В нашей лаборатории тестирование проводится морфофизиологическим методом с использованием лабораторной культуры ветвистоусых ракообразных *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) и их близких родственников *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg.

# Методология БТ

Фундаментальным показателем состояния ТС является эффективность физиологических процессов, обеспечивающих нормальное развитие организма. В оптимальных условиях организм реагирует на воздействие среды посредством сложной физиологической системы буферных гомеостатических механизмов. Эти механизмы поддерживают оптимальное протекание процессов развития. Под воздействием неблагоприятных условий эти механизмы могут быть нарушены, что приводит к состоянию стресса. Такие нарушения гомеостаза могут происходить до появления изменений обычно используемых параметров жизнеспособности живых существ. Таким образом, методология биотестирования, основанная на исследовании эффективности гомеостатических механизмов, позволяет уловить присутствие стрессирующего воздействия раньше, чем многие обычно используемые методы.

# Задачи БТ

---

- Основная задача любого токсикологического опыта – определение максимальной недействующей (или безвредной, пороговой, неэффективной) концентрации веществ, при которой не обнаруживается изменений в организмах. При проведении опытов с различными тест-объектами (рыбами, беспозвоночными и т.д.) устанавливают безвредную концентрацию вещества для наиболее чувствительного организма, которая служит отправной точкой для определения допустимой концентрации этого вещества.

■ Тест-объект (test organism) - организм, используемый при оценке токсичности химических веществ, природных и сточных вод, почв, донных отложений, кормов и др.

■ Тест-объекты, по определению Л.П.Брагинского - "датчики" сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) водной среды ("да" или "нет"), независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ, какой обычно представляют собой сточные воды. Тест-объекты с известной степенью приближения дают количественную оценку уровня токсичности загрязнения водной среды - сточных, сбросных, циркуляционных и природных вод.

# Тест-организмы

---

- Важное условие правильного проведения биотестирования – использование генетически однородных лабораторных культур, так как они проходят проверки чувствительности, содержатся в специальных, оговоренных стандартами лабораторных условиях, обеспечивающих необходимую сходимость и воспроизводимость результатов исследований, а также максимальную чувствительность к токсическим веществам.

# Методы

Основным методом оценки чувствительности тест-организмов к токсикантам является регистрация их смертности. Основная (классическая) продолжительность теста – 96 часов. Как отмечают А.Н. Тюрин и Н.К. Христофорова (Биология моря, 1995), причина «классической» длительности токсикологических тестов в 96 часов, скорее, социальная, чем фундаментальная, и имеет корни в исторически сложившейся продолжительности рабочей недели ученых разных стран – 5 суток.

В начале XX века основным методом оценки токсичности среды был метод определения выживания рыб – так называемый метод «рыбной пробы». Основоположники метода – российские ученые Гримм, Арнольд, Чермак, Долгов, Никитинский. Метод получил широкое распространение и за рубежом; благодаря простоте и удобству его применяют до сих пор. Недостаток метода заключается в необходимости длительного периода адаптации рыб к лабораторному содержанию (15–20 сут.), которое само по себе является стрессом. Дальнейшее развитие метод «рыбной пробы» получил в США после разработки систем для бесконтактной регистрации двигательной активности и некоторых поведенческих реакций рыб, по изменению которых определяли наличие токсикантов в среде.

# Одноклеточные водоросли



# РЫБЫ

Руководство по определению методов биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М: РЭФИА, НИА-Природа, 2002.

Аквариумные рыбы данио (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan) и гуппи (*Poecilia Reticulata* Peters).

Острый токсический эксперимент – 96 часов

Хронический эксперимент - 1-3 месяца



Аквариумная рыбка *Brachydanio rerio*

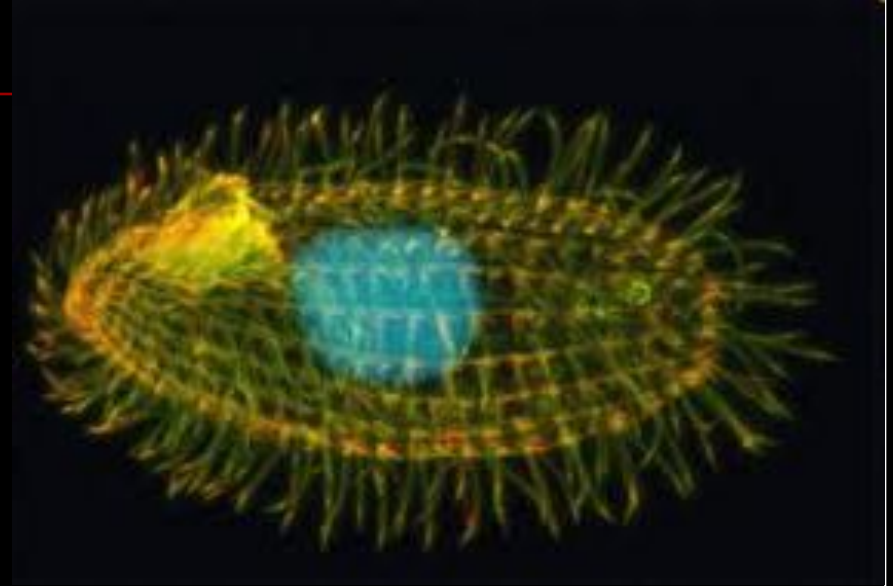


# Зеркальный карп



Инфузория-туфелька, парамеция хвостатая (лат. *Paramecium caudatum*) — вид инфузорий рода *Paramecium*.  
Одноклеточное животное.

---



Обыкновенная дафния (лат. *Daphnia pulex*) — вид ракообразных семейства дафнид.

---



# Дафнии



# Растения

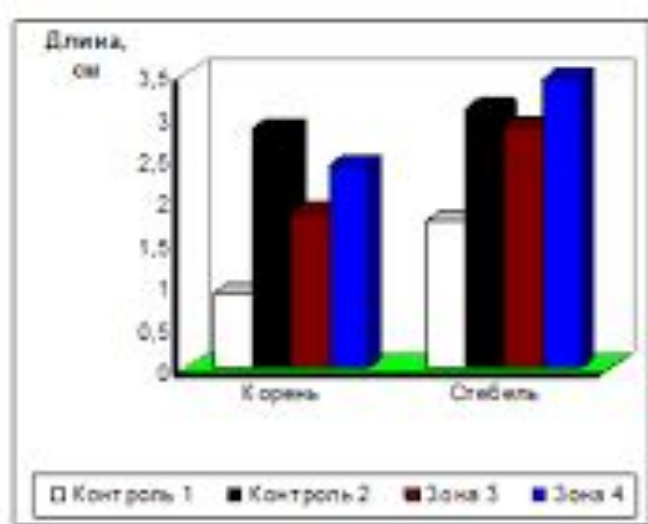
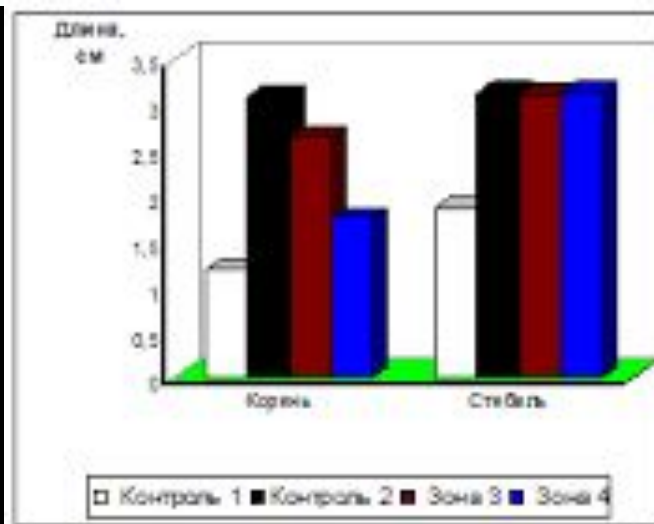
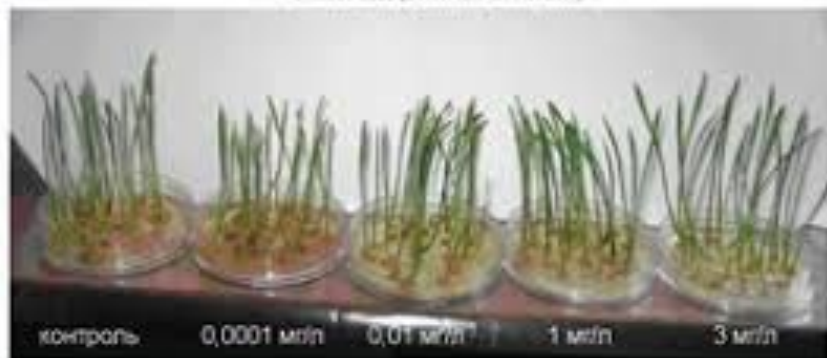
---





## Экотоксикологические свойства нанопорошков не обнаруживают монотонной зависимости от их концентрации в ДС

Влияние ДС  $\text{NiO}$  - 7 нм разных концентраций на проростки  
пшеницы (*Triticum aestivum*)



# Тест-организмы

Для биотестирования используются различные гидробионты - водоросли, микроорганизмы, беспозвоночные, рыбы. Наиболее популярные объекты - ювенальные формы (juvenile forms) планктонных ракообразных-фильтраторов *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*..

Важное условие правильного проведения биотестирования - использование генетически однородных лабораторных культур, так как они проходят проверки чувствительности, содержатся в специальных, оговоренных стандартами лабораторных условиях, обеспечивающих необходимую сходимость и воспроизводимость результатов исследований, а также максимальную чувствительность в токсическим веществам.

- 
- Стандартные методики, регламентированные нормативными документами, определяют тест-объекты, которые используются при определении токсичности тех или иных сред. В Украине в качестве стандартных приняты тесты с ветвистоусыми и жаброногими ракообразными, водорослями, инфузориями, светящимися бактериями.



- Жизненная функция или критерий токсичности (toxicity criterion), используемые в биотестировании для характеристики отклика тест-объекта на повреждающее действие среды.
- Тест-функции, используемые в качестве показателей биотестирования для различных объектов:
- для инфузорий, ракообразных, эмбриональных стадий моллюсков, рыб, насекомых - выживаемость (смертность) тест-организмов.
- для ракообразных, рыб, моллюсков - плодовитость, появление аномальных отклонений в раннем эмбриональном развитии организма, степень синхронности дробления яйцеклеток.
- для культур одноклеточных водорослей и инфузорий - гибель клеток, изменение (прирост или убыль) численности клеток в культуре, коэффициент деления клеток, средняя скорость роста, суточный прирост культуры.
- для растений - энергия прорастания семян, длина первичного корня и др.

- Длительность биотестирования зависит от задачи, поставленной исследователем.
- Острые биотесты (acute tests), выполняемые на различных тест-объектах по показателям выживаемости, длятся от нескольких минут до 24-96 ч.
- Краткосрочные (short-term chronic tests) хронические тесты длятся в течение 7 суток и заканчиваются, как правило, после получения первого поколения тест-объектов.
- Хронические тесты (chronic tests) на общую плодовитость ракообразных, охватывающие 3 поколения.

- Токсический эффект (toxic effect) - изменение любого показателя жизнедеятельности или функций организма под воздействием токсиканта. Зависит от особенностей яда, специфики метаболизма организма, факторов внешней среды (содержание кислорода, рН, температуры и др.).

■ 11. Какая разница между острой и хронической токсичностью?

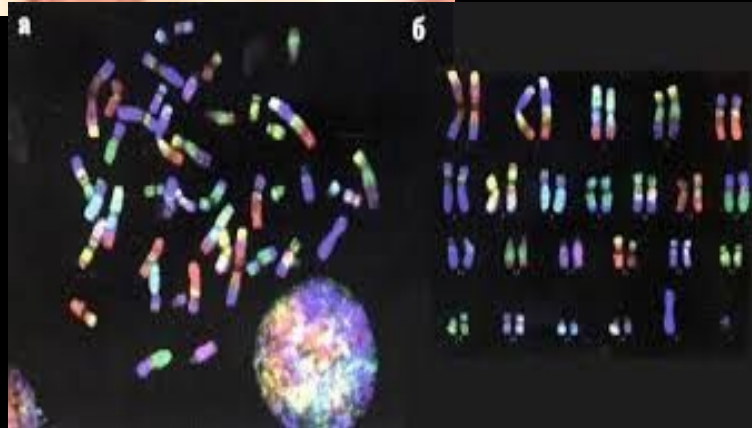
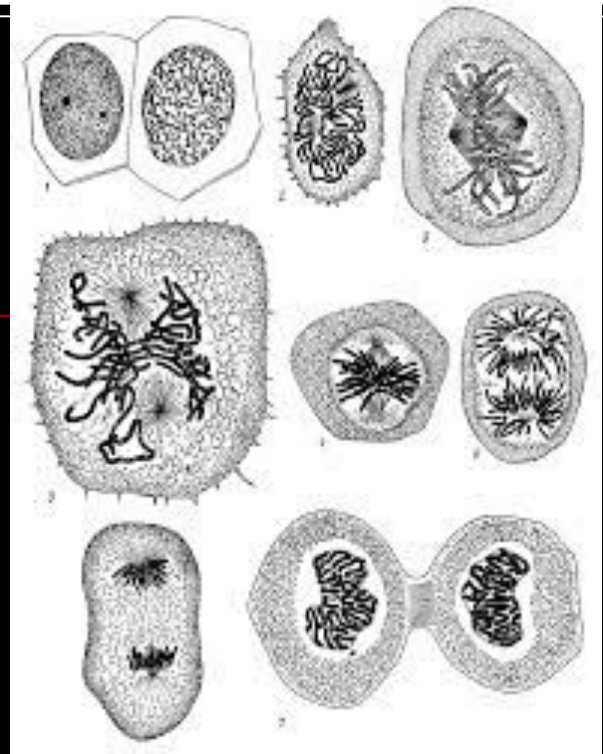
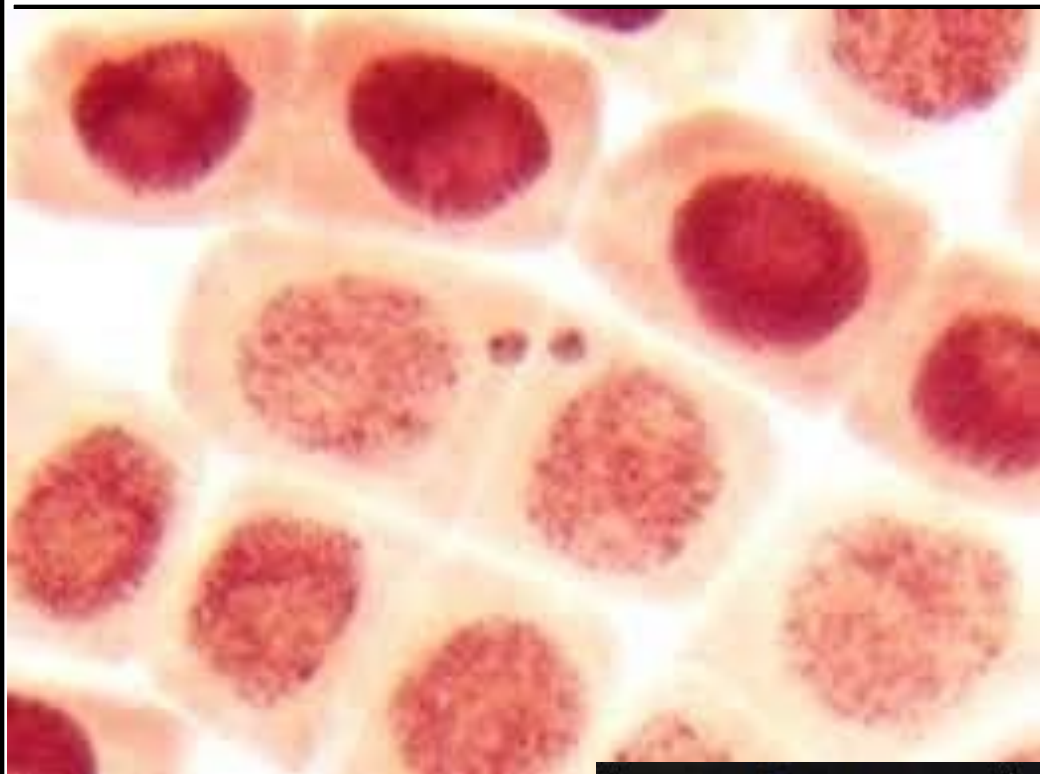
- Острая токсичность выражается в гибели отравленного организма за короткий промежуток времени - от нескольких секунд до 48 ч.
- Хроническая токсичность среды проявляется через некоторое время в виде нарушений жизненных функций организмов и возникновения патологических состояний (токсикозов).
- У водных организмов хроническая токсичность выражается в гонадотропном и эмбриотропном действии токсиканта, что приводит к нарушению плодовитости (продуктивности), эмбриогенеза и постэмбрионального развития, возникновению уродств (мутаций) в потомстве, сокращению продолжительности жизни, появлению "карликовых" форм.

# Что такое токсикометрия?

---

- Токсикометрия (toxicometry) совокупность приемов оценки токсичности веществ. Основными приемами токсикометрии являются установление минимально переносимой или пороговой (threshold concentration) концентрации ( $LC_0$ ), медианной летальной концентрации ( $LC_{50}$ ), или дозы (LD50), и зоны токсического действия (toxic effect limits) - диапазона токсических концентраций - от  $LC_0$  до абсолютно летальной ( $LC_{100}$ ).

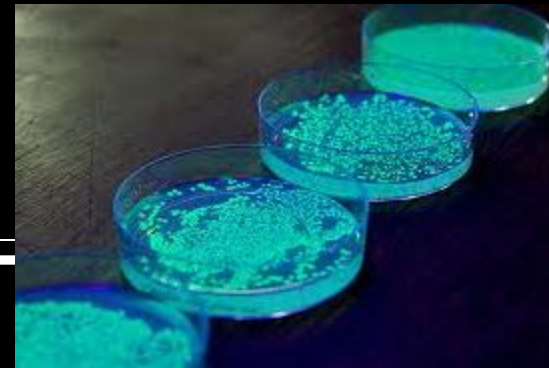
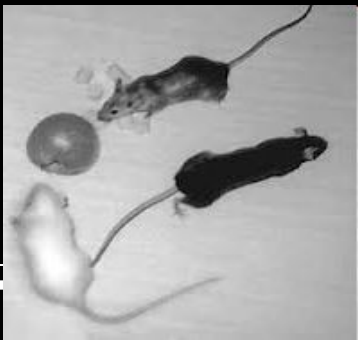




# Существует несколько методов оценки канцерогенности вещества.

---

- Прежде всего, это традиционный путь воздействия на организм в течение всей жизни.
- Различные тест-системы *in vitro* для изучения мутагенности, в том числе повреждение ДНК, мутагенное действие на бактерии и эукариоты и трансформация клеточных структур.





## • *КРАТКОСРОЧНЫЕ ТЕСТЫ* *(ускоренные скрининговые тесты).*

---

- Разработан ряд сравнительно недорогих тестов, во многих из которых вместо цельного организма млекопитающих используются другие биологические системы.
- Почти все краткосрочные тесты основаны на демонстрации хромосомных повреждений, генных мутаций или повреждения ДНК, при этом многие из них проводятся *in vitro*.
- В этих краткосрочных тестах используется очень широкий спектр организмов – от бактерий и дрожжей до насекомых, растений и культивируемых клеток млекопитающих.

- 
- Более углубленные исследования нужно, тем не менее, проводить на животных, т. к. на организменном уровне события развиваются несколько иначе. Организм – это сложная система. Иммунный надзор. Репарация. И т. д.
  - Кратковременные тесты используют для первичного скрининга химических веществ на потенциальную канцерогенную активность.
  - Около 80 % канцерогенов являются мутагенами.

## *Хронические тесты на животных.*

- Канцерогенные свойства в-ва на животных обычно определяются в результате длительного, сопоставимого с продолжительностью жизни срока воздействия.
- Эти тесты чаще всего проводятся на грызунах, среди грызунов предпочтительнее – мыши, крысы, сирийские хомячки (в силу их высокой чувствительности).
- Для мышей, крыс – это 1,5-2,5 года. Формируются группы животных, которые будут подвергнуты тестируемому в-ву, и контрольные группы. Доза должна быть достаточной, чтобы обеспечить канцерогенный эффект, но не настолько токсичной, чтобы животные погибали во время латентного периода.
- Считается, что опухоли чаще всего развиваются в последние 15 % жизни животного. Наблюдение проводится в течение всего эксперимента. Ежедневно фиксируют гибель животных. Проводят вскрытие погибших животных, отбор органов на гистологию, гистологические исследования. Определяют СПЖ животных без опухолей, СПЖ животных с опухолями, структуру смертности. Сравнивают показатели в контроле и экспериментальной группе.
- Эти эксперименты трудоемки и затратны.