

Вишневецкий Вячеслав Юрьевич

Технологический институт федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южный федеральный университет» в г. Таганроге.

E-mail: vvu@fep.tsure.ru.

347928, г. Таганрог, пер. Некрасовский, 44.

Тел.: 88634371795.

Попружний Владислав Михайлович

Федеральное государственное учреждение «Информационно-аналитический центр по водопользованию и мониторингу Азовского моря».

E-mail: popruzhnyy@mail.ru.

347923, Россия, г. Таганрог, ул. Инструментальная, 48.

Тел.: 88634648714.

Vishnevetskiy Vyacheslav Yurievich

Taganrog Institute of Technology – Federal State-Owned Educational Establishment of Higher Vocational Education “Southern Federal University”.

E-mail: vvu@fep.tsure.ru.

44, Nekrasovsky, Taganrog, 347928, Russia

Phone: +78634371795.

Popruzhnyy Vladislav Mixailovich

Federal Government Department “Information Analysis Center of Water Consumption and Monitoring of Asov Sea”.

E-mail: popruzhnyy@mail.ru.

48, Instrumentalnaya street, Taganrog, 347923, Russia.

Phone: +78634648714.

УДК 57.075.8

И.С. Захаров, А.Г. Казанцева

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНОСТИ
ВОДНЫХ СРЕД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-РЕАКЦИИ
ГАЛЬВАНОТАКСИСА ИНФУЗОРИЙ**

Обоснована и экспериментально исследована возможность использования электрического поля в качестве стрессора, позволяющего выявлять токсичность водных сред при тест-реакции гальванотаксиса инфузорий.

Биотестирование; гальванотаксис; стресс; токсичность; импульс.

I.S. Zakharov, A.G. Kazantzeva

**THE THEORETICAL APPROACH OF METHOD FOR AQUA MEDIA TOXIC
CONTROL WITH USING GALVANOTAXIS INFUSORIA BIOASSAY**

The possibility of electric field using as stressor for detecting aqua media toxicity during galvanotaxis infusoria bioassay is stated and investigated experimentally.

Bioassay; galvanotaxis; stress; toxicity; pulse.

Методы биологического контроля способны отразить такой показатель как общая вредность исследуемой среды для человека, поэтому область их применения включает в себя тестирование водных сред, используемых для нужд человека, отходов производства и потребления, оценку состояния водных экосистем [1]. Помимо того, экологическая безопасность развития индустрии требует биологиче-

ского контроля предполагаемых загрязнителей уже на стадии разработки проектов, отнесенного к приоритетным направлениям развития научных исследований XXI века [2].

Методы биологического контроля основаны на регистрации реакций живых организмов. Такие реакции характеризуются несколькими стадиями: неспецифической реакцией на вредный фактор (стрессом), специфическим подавлением систем организма и необратимым нарушением функций. При действии малых концентраций загрязнителей за непродолжительное время биологическая реакция может отражать неблагоприятное воздействие среды в форме стресса. Изучение реакции растений на стресс широко используется в биоиндикации [3]. Современные исследования показали, что стресс проявляется в реакциях, как макро- так и микроорганизмов, что позволяет создавать высокочувствительные микробиологические методы обнаружения веществ при использовании в качестве стрессоров азотного голодания, теплового и осмотического шоков [4].

Малоизученным остается вид стресса у микроорганизмов вызываемый электрическим полем, обуславливающим популяционную, этологическую реакцию гальванотаксиса – направленное перемещение микроорганизмов под действием разности потенциалов к электроду определенной полярности.

Гальванотаксис инфузорий *P. caudatum* был использован в качестве тест-реакции для контроля токсичности водных сред [5], но фактор воздействия электрического поля, как стрессора, не был изучен. Целью настоящей статьи является исследование возможности разработки метода биотестирования, основанного на особенностях протекания гальванотаксиса инфузорий в стадии стресса при комбинированном воздействии токсического вещества и электрического поля.

Регистрация гальванотаксиса инфузорий проводилась с помощью спектрофотометра СФ-56 в режиме «кинетика оптической плотности» ($\lambda = 560$ нм, $\Delta\lambda = 6$ нм). В кюветный держатель помещалась гальванотаксическая ячейка, состоящая из стандартной фотометрической кюветы с взвесью инфузорий *P. caudatum* и погруженными в них графитовыми электродами. Концентрация взвеси микроорганизмов составляла 1000 кл/мл, культивирование производилось на среде Лозины–Лозинского.

Параметры ячейки описаны в [5], но, в отличие от прежнего метода, на электроды подавались прямоугольные импульсы напряжения длительностью 5...10 с. Вместо однократной фиксации перемещающегося слоя в центре кюветы была произведена многократная регистрация гальванотаксиса инфузорий возле электрода. Это позволило получить серии гальванотаксических импульсов и огибающих их амплитуд, как характеристики безвредной и токсичной среды.

Первоначально был исследован гальванотаксис инфузорий в безвредной среде (среде культивации). Напряжение подавалось на электроды в течение 600 с со сменой полярности напряжения каждые 10 с. На рис. 1 представлен типичный график изменения оптической плотности взвеси клеток в культуральной среде. Импульсы на графике отражают увеличение количества инфузорий у электрода при отрицательной полярности напряжения и уменьшения при положительной.

В течение 200 с (рис. 1) наблюдался рост амплитуды импульсов, что происходило в результате увеличения доли числа клеток перемещающихся к электроду при воздействии электрического поля как стрессора. В интервале 200...600 с наблюдалась стабилизация амплитуды импульсов со средним значением оптической плотности $0,205 \pm 0,007$.

По полученным данным был рассчитан тренд огибающей гальванотаксических импульсов, который описывается для безвредной среды логарифмической функцией $y = 0,046\ln(x) + 0,066$ с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,95$.

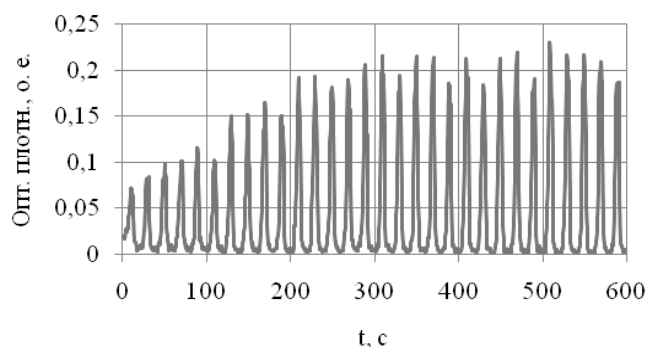


Рис. 1. Регистрация гальванотаксиса инфузорий в безвредной среде

В опытах, где культуральная среда при условиях эксперимента, описанных выше, была заменена на токсичную, в качестве токсиканта использовался CuSO_4 в концентрациях 10 мг/л и 1 мг/л. Последовательность зарегистрированных импульсов гальванотаксиса приведена на рис. 2.

Тренд огибающей в опытах с концентрацией токсиканта 10 мг/л описывался линейной функцией вида $y = -3,32\text{E-}04x + 2,06\text{E-}02$ ($R^2=0,92$), а при концентрации 1 мг/л – полиномиальной $y = -6\text{E-}07x^4 + 5\text{E-}05x^3 - 0,001x^2 + 0,015x + 0,072$ ($R^2 = 0,97$).

Были проведены опыты в безвредной среде по исследованию длительности фаз тревоги и адаптации за период измерения 6000 с при подаче двухполярных импульсов длительностью ≈ 8 с. За это время в кювете было зарегистрировано 380 гальванотаксических импульсов. При этом амплитуда импульсов упала незначительно притом, что взвесь инфузорий перемещалась под воздействием смены полярности напряжения несколько сот раз. Были поставлены аналогичные опыты при добавлении к взвеси инфузорий модельного токсиканта CuSO_4 в концентрациях 10 мг/л и 1 мг/л. На рис. 3 представлены огибающие 250 гальванотаксических импульсов в безвредной среде и токсичной.

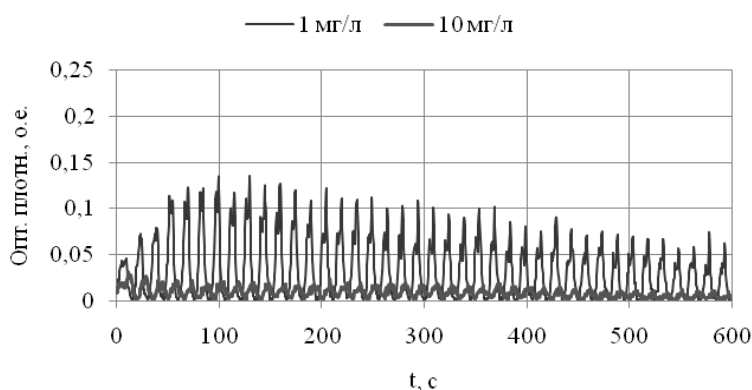


Рис. 2. Регистрация гальванотаксиса инфузорий в токсичной среде

Огибающая амплитуды импульсов за время 6 000 с (из которой на рис. 3 приведен фрагмент длительностью 4 000 с), характеризуется полиномиальным трендом третьего порядка $y = 1\text{E-}08x^3 - 9\text{E-}06x^2 + 0,002x + 0,155$ ($R^2 = 0,95$). Первый участок кривой длительностью 600 с так же, как и приведенный выше на рис. 1, характеризуется логарифмическим трендом $y = 0,014\ln(x) + 0,151$ ($R^2 = 0,95$).

Следующий участок 600...2 500 с характеризуется подъемом с линейным трендом $y = 0,001x + 0,182$ ($R^2 = 0,95$), а затем в диапазоне времени 2 500...6 000 с начинается незначительный спад амплитуды гальванотаксических импульсов с линейным трендом $y = -3,43E-04x + 3,12E - 01$ ($R^2 = 0,90$). Огибающие амплитуд гальванотаксических импульсов в токсичной среде характеризуются экс-спадом с экспоненциальным трендом ($R^2 = 0,95$ и $R^2 = 0,90$ для 10 мг/л и 1 мг/л CuSO_4 соответственно). При добавлении концентрации токсиканта 1 мг/л через примерно 3 000 с регистрации возникает небольшой подъем амплитуд импульсов.

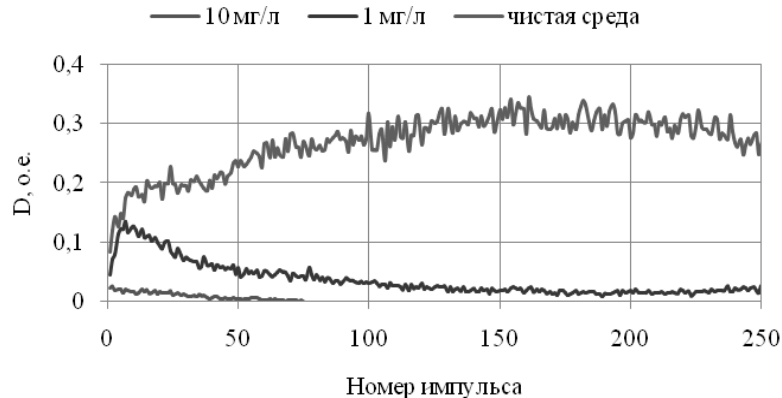


Рис. 3. Огибающие импульсов, зарегистрированных при гальванотаксисе инфузорий в безвредной и токсичной среде

Проведенные эксперименты показали, что взвесь клеток под воздействием электрического поля проявляет адаптивные свойства, позволяющие инфузориям многократно перемещаться при смене полярности напряжения, что доказывает сохранение их жизнеспособности.

При добавлении токсичных веществ характер огибающих кривых меняется. За кратковременным линейным ростом амплитуды импульсов следует спад с экспоненциальным трендом, отражающим уменьшение количества инфузорий передвигающихся к электроду. Экспоненциальная форма тренда позволяет предположить, что при каждом следующем гальванотаксисе количество жизнеспособных клеток уменьшается на одну и ту же долю.

С увеличением токсичности исследуемых проб фаза линейного роста уменьшается до исчезновения, а тренд спада становится линейным. Таким образом, в безвредной среде и токсичной возникает изменение формы гальванотаксических импульсов, характеризующихся огибающими функциями с зеркальной симметрией, что может быть использовано для скрининга и мониторинга токсичности водных сред, а также исследования специфичности загрязнителя.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов, С.А. Буймова, А.А. Гушин, Т.В. Извекова. – Иваново: ГОУ ВПО, 2007. – 112 с.
2. Research Priorities for the 21st Century. Special report / Environmental science & technology // News. – 1997. – Vol. 31, № 1. – P. 20A-27A.
3. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. – М.: Мир, 1991.
4. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от силы стрессорных воздействий супероксидных радикалов // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 1. – С. 109-116.

5. Аппаратурно регистрируемые характеристики и математическая модель гальванотаксического сигнала / Захаров И.С., Ковалевская А.С., Казанцева А.Г., Голядкин С.В. // Известия СПб.: ГЭТУ. Серия "Биотехнические системы в медицине и экологии". – 2006. – № 1. – С. 100-105.

Захаров Игорь Сергеевич

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ».
E-mail: Sergeich188@gmail.com.
197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 5.
Тел.: 88122349071.

Казанцева Анна Геннадьевна

E-mail:kazanutic@mail.ru.

Zakharov Igor Sergeevich

Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI".
E-mail: Sergeich188@gmail.com.
5, Prof. Popov street, Saint Petersburg, 197376, Russia.
Phone: +78122349071.

Kazantzeva Anna Gennadevna

E-mail:kazanutic@mail.ru.

УДК 504.064.38

А.С. Ковалевская, О.В. Смолова

**МЕТОД КЛАССИФИКАЦИИ ТОКСИКАНТОВ НА ОСНОВЕ ВЫЯВЛЕНИЯ
ХАРАКТЕРИСТИК ЭТОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИИ ИНФУЗОРИЙ**

Показано наличие отличительных особенностей воздействия различных групп токсикантов на характеристики этологических реакций инфузорий. Предложен новый метод контроля изменений данных характеристик.

Биотестирование; токсичность; этологические реакции; простейшие.

A.S. Kovalevskaya, O.V. Smolova

**CLASSIFICATION METHOD OF TOXIC SUBSTANCES BASED
ON IDENTIFICATION CHARACTERISTICS OF CILIATES ETHOLOGICAL
REACTIONS**

Distinctive effecting features of different toxicant groups on ethological reactions characteristics of ciliates were demonstrated. New method of monitoring changes in these characteristics was discussed.

Bioassay; toxicity; ethological reactions; ciliates.

Особую роль в оценке состояния окружающей среды играют биологические тесты. Они основаны на том, что для жизнедеятельности живых организмов необходима среда строго определенного химического состава. При изменении этого состава, например при исключении из питательной среды какого-либо компонента или введении дополнительного (определяемого) соединения, организм сразу или через некоторое время подает соответствующий ответный сигнал.

Одним из наиболее распространенных индикаторных организмов являются инфузории *Paramecium caudatum*. Они широко распространены в природе, обла-