

УДК 577.472:577.486:628.394

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ БУМАЖНЫХ ИЗДЕЛИЙ, ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ГРУНТА МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В. И. Ипатова, А. Г. Дмитриева, В. Ю. Прохоцкая

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

E-mail: viipatova@hotmail.com

Поступила в редакцию 07.05.13 г.

Оценка токсичности бумажных изделий, пищевых продуктов и грунта методом биотестирования с использованием микроводорослей. – Ипатова В. И., Дмитриева А. Г., Прохоцкая В. Ю. – Предложен метод оценки токсичности бумажных изделий, пищевых продуктов и грунта по структурно-физиологическому состоянию популяций клеток микроводорослей. Метод является перспективным, интегральным, характеризуется высокой чувствительностью и может быть рекомендован для экспресс-оценки токсичности жидких и твердых сред и материалов.

Ключевые слова: микроводоросли, биотестирование, бумажные изделия, пищевые продукты, грунт.

Bioassays of paper products, food and soil using microalgae. – Ipatova V. I., Dmitrieva A. G., and Prokhot'skaya V. Yu. – A method of assessment of paper goods, food, soil biotoxicity using structural and physiological test-parameters of microalgal populations is suggested. The method is promising, integral, highly sensitive and can be recommended for rapid assessment of the toxicity of liquid and solid media and materials.

Key words: microalgae, bioassay, paper products, food, soil.

ВВЕДЕНИЕ

В биомедицинских исследованиях и биотестировании изделий и продуктов медицинской, косметической, бумажной промышленности и сельского хозяйства традиционно используются живые позвоночные животные (например, мыши, крысы, морские свинки и т.д.). Такие методы трудоемки и требуют длительного времени для выявления биотоксичности образца для организма и его потомства, не говоря уже о биоэтике использования позвоночных животных в таких исследованиях.

Есть данные по использованию беспозвоночных водных животных для оценки токсичности ряда продуктов и содержащихся в них веществ, например, антибиотиков (Wollenberger et al., 2000). Загрязнение воды, почвы, воздуха, продуктов промышленности и сельского хозяйства приводит к необходимости разработки и внедрения новых, альтернативных и нетрудоемких методов быстрой оценки токсичности различных веществ, препаратов, материалов и пищевых продуктов, используемых человеком, а также почвы и донных грунтов, которые могут накапливать потенциально опасные для живых организмов и человека вещества и супертоксиканты, например, диоксины.

Традиционно микроводоросли используют в биотестировании в качестве тест-объекта для оценки качества жидких сред (сточных и природных вод, водных растворов токсических веществ). В последнее время их стали использовать и при биотестировании твердых сред и материалов. Известен способ определения токсичности бумаги с помощью культуры микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Филленко и др., 2000). *Scenedesmus quadricauda* используют и в диагностике загрязнения почвенных растворов (Путинцев и др., 1998).

Целью данной работы явилось определение биотоксичности бумажных изделий, продуктов питания с применением в качестве тест-объекта культуры пресноводной зелёной хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb., а также донного грунта с использованием в качестве тест-объектов культуры *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. и морской диатомовой микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hastle.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Альгологически чистые культуры зелёной хлорококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. (strain S-3) выращивали на среде Успенского № 1, а диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hastle – на среде Гольдберга – Кабановой в стандартных условиях в люминостате при периодическом освещении лампами дневного света. Для экспериментов использовали культуры в логарифмической фазе роста. Длительность опытов составляла 3 – 4 суток (при экспресс-тестировании), а при необходимости эксперимент пролонгировали до 10 – 14 или 30 суток (хронический эксперимент).

Основные тест-реакции – изменение численности клеток водорослей (выживаемость) и быстрая флуоресценция (эффективность фотосинтеза). Подсчет численности клеток осуществляли в счетной камере Горяева под световым микроскопом. Для оценки фотосинтетической активности водорослей снимали индукционные кривые флуоресценции на портативном флуориметре и рассчитывали величину эффективности фотосинтеза в опыте и контроле. Флуоресценция, как правило, дает более ранний ответ при определении токсичности испытуемого материала, чем изменение численности клеток водорослей. Это дает возможность широко применять данную тест-реакцию при экспресс-биотестировании.

Исследовали биотоксичность водных вытяжек ряда образцов изделий из распушенной целлюлозы, предназначенных для использования в санитарно-гигиенических целях (санитарно-гигиенические пакеты). Вытяжки готовили из расчета 100 мг образца на 1 л воды при 37°C в течение 24 часов, а затем добавляли в культуру *S. quadricauda* для выявления биотоксичности. На токсичность оценивали исходные вытяжки и разведенные на порядок. Опыты проводили в трех повторностях в пенициллиновых пузырьках. Учет численности клеток и снятие индукционных кривых флуоресценции осуществляли на 1-, 2-, 3-, 5-, 7-, 10- и 14-е сутки.

Токсичность других бумажных образцов (разные слои детских памперсов) оценивали по изменению структурных и функциональных характеристик в популяции клеток *S. quadricauda*. В этом случае биотестирование проводилось двумя способами.

1. Помещали тест-объект в водный экстракт из исследуемых слоев памперса (№ 1 – 5) с добавлением питательной среды Успенского № 1. О действии экстракта на водоросли судили по изменению численности клеток, эффективности фотосинтеза, размеров клеток и соотношению живых и мертвых клеток в опытах длительностью 10 суток в трех повторностях.

2. Наносили пасту водорослей на исследуемые слои памперса. Для этого вырезались небольшие квадратные участки (0.5 см) каждого слоя, на которые наносили пасту водорослей (толщиной 0.5 – 1 мм). Предварительно культуру сгущали с помощью аппарата Зейтца на мембранный фильтр № 5. Исследуемые образцы помещали в чашку Петри на фильтр, смоченный средой Успенского № 1, на двое суток. Каждые сутки определяли эффективность фотосинтеза и измеряли размеры клеток (10 измерений в каждой из трех повторностей).

Нами также была проведена оценка токсичности водной вытяжки зерен и шелухи отечественной пшеницы и риса отечественного и вьетнамского производства по изменению численности клеток и величины эффективности фотосинтеза *S. quadricauda* в хронических испытаниях длительностью 14 суток.

Кроме того, были исследованы водные вытяжки донных грунтов из Южного Вьетнама, загрязненных диоксинами, на культурах пресноводной водоросли *S. quadricauda* и морской – *T. weissflogii* в длительных экспериментах. Оценку потенциальной токсичности проб грунта проводили в соответствии с методическими рекомендациями по биотестированию и нормированию загрязнения водной среды (Методическое руководство..., 1991; Методические указания..., 1998). Предварительно проводили экстракцию диоксинов соответствующими средами культивирования в течение 1 – 3 суток при температуре 30°C (Дмитриева и др., 2004). Определяли численность клеток в динамике роста культур, а в конце наблюдения на 30-е сутки дополнительно определяли содержание в клетках фотосинтетических пигментов: хлорофиллов, каротиноидов, феофитина (продукта деградации хлорофиллов).

Основным критерием токсичности исследуемых проб (бумажных изделий, зерна и донного грунта) служило достоверное отличие опытных значений от контроля, а также величина этого отклонения в процентах. Испытуемая проба считалась слаботоксичной, если отличие показателей опыта от контроля было достоверно и находилось в пределах $\pm 25\%$, или нетоксичной, если оно недостоверно. Превышение показателей от контроля более чем на $\pm 25\%$ рассматривали как фактор токсического действия. Если снижение или стимуляция более чем на 25% проявляется уже на 3 – 4 сутки, то это свидетельствует о высокой токсичности и накопительном эффекте токсических веществ, содержащихся в пробе. Поскольку некоторые токсические вещества обладают способностью медленно накапливаться клетками водорослей, то их токсическое действие может проявиться в более поздние сроки. Поэтому в случае, если за 3 – 4 суток не выявлено токсическое влияние, то эксперимент следует продлить до 7 – 14 суток для установления хронического действия. Если после первоначального токсического влияния показатели приближаются к уровню контроля, то такая реакция свидетельствует о приспособляемости водорослей к данному веществу или детоксикации последнего клетками водорослей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты показали, что при тестировании зерна флуоресценция была более показательной, чем изменение численности клеток водорослей. Вытяжки из зерна пшеницы (после обмолота) и шелухи давали в отдельные сроки наблюдения снижение эффективности фотосинтеза на 30 – 47% по сравнению с контролем. Наиболее токсичным для водорослей оказался вьетнамский рис – снижение эффективности фотосинтеза на 25 – 45% сохранялось в течение всего 14-суточного срока наблюдения.

Биотестирование водных вытяжек бумажных изделий из распушенной целлюлозы показало снижение численности клеток водорослей уже на 3-и сутки для двух образцов изделий. На 7-е сутки достоверное снижение численности наблюдалось для всех образцов и во всех вариантах эксперимента. Ингибирующий эффект по показателю эффективности фотосинтеза зарегистрирован уже на 1 – 2-е сутки наблюдения в большинстве вариантов опыта, при этом наиболее значительное воздействие оказала исходная неразбавленная вытяжка из 100 мг/л образца.

Таким образом, при использовании культуры водоросли *S. quadricauda* в качестве тест-объекта и двух тест-параметров (изменение численности и эффективность фотосинтеза) был получен ответ на воздействие вытяжек из бумажных изделий. Анализ показал, что реакция фотосинтетического аппарата на сутки раньше дает ответ на токсическое действие образцов. Результаты эксперимента показывают, что вытяжки из образцов бумаги содержат вещества, которые накапливаются клетками водорослей и оказывают влияние не только на изменение физиологических процессов в культуре водорослей (изменение фотосинтетической активности), но и на генеративные процессы (изменение темпа деления клеток).

Достоверная стимуляция численности клеток (17 – 30% от контроля) *S. quadricauda* в вытяжках из разных бумажных слоев памперсов (образцы № 1 – 5) наблюдалась уже на 1 – 3-и сутки в зависимости от образца, а достоверное ингибирование – только на 10-е сутки. Доля живых клеток в культуре изменялась мало и колебалась в пределах 92 – 97% от контроля на протяжении всего опыта.

Более чувствительными показателями оказались размерная структура популяции и эффективность фотосинтеза клеток водоросли.

В течение 10-суточного эксперимента отмечалось достоверное увеличение ширины клеток: в экстракте № 1 на 3-и и 6-е сутки, № 2 – на 3-и и 10-е сутки, № 3 – на 3-и и 6-е сутки, № 5 – на 3-и сутки. Данные измерений ширины клеток *S. quadricauda* в соответствующие сутки исследования для контроля и опыта были разбиты на три размерные группы от 2 до 3, 3 – 4 и 4 – 7 мкм и была рассчитана встречаемость клеток каждой размерной группы в процентах от общего числа измеренных клеток и в процентах от контроля, когда значения каждой размерной группы в контроле принимали за 100% (табл. 1).

Анализ распределения клеток по размерам показывает, что уже на 1-е сутки опыта происходит перераспределение численности разных размерных групп в популяции клеток водорослей. Если в контрольных пробах на 1-е сутки максимальное число клеток представлено размерами (ширина) 2 – 3 мкм, то в экстрактах максимум численности смещается в размерную группу 3 – 4 мкм. При этом на-

блюдается существенное уменьшение числа клеток в группах 2 – 3 и 4 – 7 мкм. Изменение доли клеток разных размерных групп прослеживается и в дальнейшем на протяжении всего опыта в экстрактах разных образцов.

Таблица 1

Встречаемость клеток *S. quadricauda* разных размерных групп
в водных вытяжках бумажных образцов

№ образца	Размерная группа, мкм	Встречаемость, %			
		1-е сутки	3-и сутки	6-е сутки	10-е сутки
Контроль	2 – 3	100.0	100.0	100.0	100.0
	3 – 4	100.0	100.0	100.0	100.0
	4 – 7	100.0	100.0	100.0	100.0
№ 1	2 – 3	71.3	14.2	–	0
	3 – 4	141.8	55.5	50.1	109.6
	4 – 7	75.2	379.0	142.8	139.5
№ 2	2 – 3	14.3	71.7	–	0
	3 – 4	141.8	77.8	81.2	71.4
	4 – 7	225.6	219.8	100.0	299.4
Контроль	2 – 3	100.0	100.0	100.0	–
	3 – 4	100.0	100.0	100.0	–
	4 – 7	100.0	100.0	100.0	–
№ 3	2 – 3	16.5	0	116.5	–
	3 – 4	128.5	42.9	166.7	–
	4 – 7	110.2	300.4	53.4	–
№ 4	2 – 3	16.5	347.8	116.5	–
	3 – 4	164.2	90.4	200.0	–
	4 – 7	60.1	57.1	33.4	–
№ 5	2 – 3	16.5	398.5	83.5	–
	3 – 4	135.5	66.7	211.0	–
	4 – 7	100.0	114.6	40.0	–

В целом следует отметить, что вытяжки из различных слоев памперсов (образцы № 1 – 5) оказывали разное действие на изменение размеров клеток и изменение доли мелких и крупных клеток в популяции. Так, на 3-и сутки в вытяжках из образцов № 1, 2, 3 наблюдалось увеличение в культуре доли крупных клеток шириной 4 – 7 мкм и угнетение темпа деления, а в вытяжках из образцов № 4, 5 – стимуляция темпа деления и увеличение доли мелких клеток шириной 2 – 3 мкм. При этом длина клеток практически не изменялась во всех опытах и в среднем составляла 8.8 мкм, так же как и в контроле.

Эффективность фотосинтеза *S. quadricauda* в разных вытяжках колебалась во времени и носила фазный характер. Максимум для образцов № 1 и 2 приходился на 1-е сутки, а для образцов № 3, 4 и 5 – на 3-и сутки. Такое увеличение можно объяснить перераспределением численности различных размерных групп в течение опыта. Так, для образцов № 1 и 2 на 1-е сутки характерно максимальное значение численности средней размерной группы, а для образцов № 4 и 5 максимальное значение соответствует 3-им суткам. В то время как для образца № 3 на 3-и сутки

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ БУМАЖНЫХ ИЗДЕЛИЙ

максимум значения численности клеток перемещается в размерную группу 4 – 7 мкм и соответствует максимальному значению эффективности фотосинтеза.

Эффективность фотосинтеза водоросли в вытяжках из образцов бумажных слоев № 3, 4 и 5 достоверно снижалась на 1-е и 10-е сутки по сравнению с контролем, а в вытяжке образца № 1 достоверно увеличивалась на 1-е и 4-е сутки, что указывает на наличие в вытяжках веществ, которые оказывают различное физиологическое действие.

Исследование разных типов бумаги путем нанесения пасты водорослей позволяет быстрее (уже на 1-2-е сутки) оценить степень токсического действия по изменению фотосинтетической активности клеток водоросли. Ингибирование процесса фотосинтеза наблюдалось на всех исследованных образцах бумаги (кроме № 1) на 1-е и 2-е сутки (табл. 2).

Как видно из табл. 2, эффективность фотосинтеза *S. quadricauda* на поверхности бумаги № 2 и 3 снижалась ко вторым суткам и составляла 50% от контроля, а на поверхности бумаги № 1 восстанавливалась до уровня контроля. Эффективность фотосинтеза клеток водоросли, нанесенных на бумагу № 4 и 5, по отношению к контролю была нулевой на 1 – 2-е сутки в результате ингибирования процесса фотосинтеза.

Доля мелких клеток шириной 2 – 3 мкм на образцах № 1, 3, 4 и 5 на 2-е сутки составляла 0 – 10%, тогда как в контроле и на образце № 2 – 25% (табл. 3). Можно отметить тенденцию увеличения доли клеток средней размерной группы 3 – 4 мкм (за исключением образца № 2) и уменьшения количества мелких клеток 2 – 3 мкм, а на поверхности бумаги № 2 и 5 – увеличение количества крупных клеток 4 – 7 мкм по сравнению с контролем. Длина клеток, нанесенных на поверхность бумажных образцов, варьировала незначительно, как и в опытах с водными вытяжками.

Таблица 2

Эффективность фотосинтеза клеток водоросли
на различных образцах бумаги,
% от контроля

Образец	1-е сутки	2-е сутки
Контроль	100.0	100.0
№ 1	78.0	100.0
№ 2	78.0	50.0
№ 3	78.0	50.0
№ 4	0	0
№ 5	0	0

Таблица 3

Доля клеток разных размерных групп (%) на различных образцах бумаги

Ширина клеток, мкм	Контроль	№ образца				
		1	2	3	4	5
2 – 3	25.0	10.0	25.0	5.0	5.0	0
3 – 4	45.0	55.0	35.0	70.0	65.0	50.0
4 – 7	30.0	35.0	40.0	25.0	30.0	50.0

Сопоставление результатов оценки токсичности образцов бумаги путем нанесения пасты водорослей и в водных вытяжках показало, что начальный ингибирующий эффект образцов № 4 и 5 сходен.

В течение 3-4 суток эксперимента с вытяжками из загрязненного диоксинами грунта наблюдался достоверный эффект ингибирования роста культуры *S. quadricauda* до 50% по сравнению с контролем. При этом выявлены значительные мор-

фологические изменения клеток: утолщение клеточных оболочек и изменения формы клеток, появление крупных клеток неправильной формы с заметно увеличенными ядрами в составе двух клеточных ценобиев. На 21-е сутки опыта эффект ингибирования составлял 30%, и в популяции по-прежнему присутствовали крупные клетки с увеличенным ядром. Наличие таких клеток, по-видимому, свидетельствует о том, что в грунтах содержатся загрязняющие вещества, нарушающие процесс клеточного деления и приводящие к гибели клеток.

К концу опыта наблюдали хлороз клеток. В клетках снижалось содержание хлорофилла *b*. Содержание же хлорофилла *a* в клетках из 3-суточной вытяжки оказалось почти вдвое выше, чем в контроле, при высоком содержании феофитина и отсутствии каротина. Результаты свидетельствуют о том, что водные вытяжки из загрязненного грунта нарушают синтез фотосинтезирующих пигментов и интенсифицируют деградацию хлорофилла *a* в клетках *S. quadricauda*.

Ингибирование роста числа клеток до 45% по сравнению с контролем в водных вытяжках из этого грунта наблюдалось и в популяции *T. weissflogii* в течение логарифмической фазы роста (до 14 суток) с преобладанием увеличенных в размерах клеток. Однако в последующие сроки численность клеток восстанавливалась до уровня контроля и даже превышала его на 15%. Такая реакция морской водоросли может быть следствием химических взаимодействий диоксинов и их производных в сильно забуференной морской среде.

Как показали наши эксперименты, токсический эффект диоксинов мало зависел от количества используемого для экстракции грунта и не зависел от времени его экстракции. Полученные данные дают основание предполагать, что эффект диоксинов в большей степени определяется их структурой, химическими свойствами и механизмами взаимодействия с растительной клеткой, чем концентрацией. Их эффект на культуру водорослей проявлялся в достоверном изменении численности клеток в культуре (перемежающемся угнетении и стимуляции), в изменении соотношения содержания пигментов, в появлении морфологически аномальных клеток и ценобиев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнивая полученные результаты по оценке токсичности бумажных изделий с использованием культуры микроводоросли *S. quadricauda* по ее структурно-физиологическому состоянию с данными санитарно-гигиенического исследования образцов бумаги, можно с достаточной долей уверенности утверждать, что использование культур микроводорослей для токсикологической оценки бумаги, предназначенной для санитарно-гигиенических целей, более перспективно и экономично (доступность тест-объекта, простота его содержания и культивирования, дешевизна метода).

Главное преимущество метода – его высокая чувствительность и экспрессность по сравнению с санитарно-токсикологическими исследованиями на животных. Этот метод может быть рекомендован для экспрессной оценки токсичности бумаги и изделий из нее, пищевых продуктов и других твердых материалов преж-

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ БУМАЖНЫХ ИЗДЕЛИЙ

де чем будет проведена санитарно-токсикологическая экспертиза с использованием тепловых животных.

Диоксины относятся к числу глобальных особо опасных ядов, наносящих непоправимый ущерб природе и здоровью населения. Из-за их чрезвычайно высокой стабильности загрязненные ими территории остаются опасными в течение десятков лет, о чем свидетельствует пример Южного Вьетнама и Камбоджи. Острота проблемы диоксинов для Российской Федерации обусловлена широким внедрением в последние десятилетия значительного количества отечественных и зарубежных «диоксиноопасных» технологий, в то время как контроль за образованием диоксинов, их распространением в окружающей среде практически не проводился. Основную опасность с точки зрения воздействия на системы жизнеобеспечения населения на данный момент представляет накопленный в почвах запас диоксинов, которые оказывают токсическое действие на иммунферментную систему человека. Потенциальная опасность диоксинов для водных экосистем очень велика в силу того, что эти вещества, присутствуя в водной среде даже в незначительных концентрациях, способны оказывать заметный токсический эффект на гидробионтов.

Разработанный нами метод с использованием в качестве тест-объектов микроводорослей, применяющихся для биотестирования водной среды, может быть рекомендован для целей биоиндикации и биомониторинга донных грунтов и почв, подвергшихся диоксиновому загрязнению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дмитриева А. Г., Кожанова О. Н., Дронина Н. Л., Ипатова В. И. Диоксины : распространение и опасность. М. : Изд-во МГУ, 2004. 75 с.

Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М. : Изд-во ВНИРО, 1998. 148 с.

Методическое руководство по биотестированию воды : РД 118-02-90. М., 1991. 48 с.

Путинцев А. И., Филенко О. Ф., Решетников С. И., Лукьянов А. С., Артюхова (Ипатова) В. И., Богатырев Г. П., Исакова Е. Ф., Кривенко М. С., Лебедева Г. Д. Комплексная диагностика загрязнения почвенных растворов с использованием водных биотестов // Токсикологический вестн. 1998. № 4. С. 27 – 31.

Филенко О. Ф., Дмитриева А. Г., Артюхова (Ипатова) В. И., Оганесян А. З. Способ определения токсичности бумаги // Экологические системы и приборы. 2000. № 6. С. 14 – 16.

Wollenberger L., Halling-Soerensen B., Kusk K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna* // Chemosphere. 2000. Vol. 40, № 7. P. 723 – 730.