

УДК 57.085.2

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ КИСЛОТ ДЛЯ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ

А.С. Богачева<sup>1,2</sup>, Е.В. Полозова<sup>1,2</sup>, И.Н. Ключкин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 191015, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья, 191036, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии», в г. Санкт-Петербург в Московском, Фрунзенском, Пушкинском, Колпинском районах и г. Павловске, 196653, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Проведена экспериментальная оценка возможности использования одноклеточных организмов: люминесцентных бактерий, инфузорий *Tetrahimena pyriformis* и сперматозоидов крупного рогатого скота в качестве тест-объектов для оценки токсичности кислот.

Установлено, что анализируемые биотесты имеют высокую чувствительность к токсическому действию кислот. Показано, что люминесцентные бактерии, инфузории *Tetrahimena pyriformis* и сперматозоиды крупного рогатого скота могут успешно использоваться в качестве методов ускоренной оценки загрязнений окружающей и производственной среды кислотами.

**Ключевые слова:** биотестирование, тест-объект, люминесцентные бактерии, *Tetrahimena pyriformis*, сперматозоиды крупного рогатого скота, кислоты.

**Введение.** В настоящее время актуальным вопросом является изучение возможности применения биотестов для оценки загрязнений производственной и окружающей среды, среди которых наиболее важным объектом является вода [5]. Биологические тесты играют особую роль в оценке производственной и окружающей среды, поскольку результаты химического анализа, проводимого с помощью сложного аналитического оборудования, во многих случаях не позволяют оценить истинную опасность тех или иных загрязнителей для среды обитания, прогнозировать последствия их воздействия на живые организмы. Кроме этого многообразные загрязняющие вещества, попадая в окружающую среду, могут претерпевать в ней различные превращения, усиливая при этом своё токсическое действие [1,2,3,4].

Именно методы биотестирования позволяют оценить интегральный характер воздействия на окружающую среду всей совокупности загрязнителей, что необходимо для формирования тактики комплексной оценки качества производственной и окружающей среды.

При выборе организмов в качестве тест-объектов приходится соблюдать определённые требования, среди которых возможность фиксировать чёткий, воспроизводимый и объективный отклик на воздействие внешних факторов, чувствительность этого отклика на малые содержания загрязнителей и т. д. Поэтому в качестве биотестов выбирают наиболее чувствительные к исследуемым загрязнителям организмы [5,6].

В связи с этим данная работа посвящена изучению сравнительной чувствительности различных биологических тест-объектов (люминесцентных бактерий, инфузорий *Tetrahimena pyriformis* и сперматозоидов крупного рогатого скота) к воздействию кислот (соляной, ортофосфорной и уксусной).

**Материалы и методы исследования.** Объектами исследования явились: лиофилизированная культура люминесцентных (светящихся) бактерий; инфузории *Tetrahimena pyriformis* (*T.pyriformis*) и сперма крупного рогатого скота. В экспериментах использовали различные концентрации кислот (соляной, ортофосфорной и уксусной).

**Богачева Александра Сергеевна (Bogacheva Aleksandra Sergeevna)**, доцент кафедры токсикологии и экстремальной медицины СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 191015, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация; научный сотрудник ФБУН «СЗНЦ гигиены и общественного здоровья», кандидат биологических наук, 191036, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, baltagy@list.ru

**Полозова Елена Валентиновна (Polozova Elena Valentinovna)**, профессор кафедры токсикологии и экстремальной медицины СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 191015, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация; ведущий научный сотрудник ФБУН «СЗНЦ гигиены и общественного здоровья», доктор медицинских наук, доцент, 191036, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, doctorpolozova@yandex.ru

**Ключкин Иван Николаевич (Kluskins Ivan Nikolaevich)**, заведующий отделением коммунальной гигиены – врач по коммунальной гигиене Филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в г. Санкт-Петербург в Московском, Фрунзенском, Пушкинском, Колпинском районах и г. Павловске, 196653, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, gupper10@yandex.ru

Чувствительность сперматозоидов к действию химических веществ определяли по методу Двоскина Я.Г. (2002) [2]. Принцип метода основан на изменении зависимости двигательной активности сперматозоидов от воздействия химических соединений. Для определения чувствительности сперматозоидов к химическим веществам готовили различные концентрации исследуемых жидкостей и помещали в них тест-объект – сперму крупного рогатого скота, замороженную в парах жидкого азота, предварительно разморозив и активировав в растворе цитрата натрия. Оценку показателя подвижности осуществляли путём подсчёта изменений интенсивности светового потока при движении сперматозоидов через оптический зонд при помощи специального аналитического прибора. Все результаты выводятся на монитор компьютера. Результаты выражали в единицах токсичности (ИТ, %) и рассчитывали  $EC_{50}$ , мг/л.

Изучение чувствительности люминесцентных бактерий к кислотам проводили по методу Сулова А.Н., Данилова В.С. (1996) с помощью прибора «Биотокс» [5]. Метод определения токсичности основан на способности люминесцентных бактерий изменять величину интенсивности биолюминесценции при действии токсических соединений, содержащихся в тестируемой пробе, по сравнению с контролем. Интенсивность свечения данного тест-объекта обусловлена изменением его физиолого-биохимических функций, в т.ч. изменением активности фермента бактериальной люциферазы, ответственного за интенсивность биолюминесценции. Во флакон с лиофилизированным биореагентом добавляли 10 мл бидистиллированной воды для получения суспензии бактерий. Исследуемое вещество разливали в пробирки по 0,9 мл, в которые затем добавляли по 0,1 мл рабочей суспензии бактерий. Время экспозиции составляло 40 минут, после чего измеряли интенсивность биолюминесценции бактерий с помощью прибора «Биотокс». Контролем служила культура бактерий в количестве 0,1 мл, разведённая в 0,9 мл дистиллированной воды. Критерием токсического действия явилось изменение интенсивности биолюминесценции

тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контролем. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту. Результаты выражали в единицах токсичности (ИТ, у.е.) и рассчитывали  $EC_{50}$ , мг/л.

Токсичность исследуемых растворов химических веществ при помощи инфузорий *Tetrahimena pyriformis* определяли по методу Ирлиной И.С. в нашей модификации (1998) [3]. Принцип метода основан на оценке выживаемости 2-х суточной культуры *Tetrahimena pyriformis* в растворах различной концентрации кислот. Для исследований использовались аксеничные культуры. «Музейная» культура получена из лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН. К 0,1 мл изучаемого вещества в убывающих концентрациях добавляли такое же количество 2-х суточной культуры тетрахимен. Время инкубации составило 30 мин при комнатной температуре. Подсчёт фиксированных клеток производили в камере Горяева. Контролем служила культура *Tetrahimena pyriformis* в количестве 0,1 мл в таком же количестве дистиллированной воды. Рассчитывали процент погибших клеток в каждом разведении по отношению к контролю. Расчёт производили методом пробит-анализа. Результаты выражали в величинах концентрации исследуемых веществ, вызывающей гибель половины простейших в пробе ( $EC_{50}$ , мг/л).

**Результаты и обсуждение.** Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Согласно представленным данным, все исследуемые тест-объекты обладают чувствительностью к кислотам. В то же время исследуемые биологические объекты обладают различной чувствительностью по отношению к исследуемым кислотам. Так, наибольшей чувствительностью к кислотам обладали люминесцентные бактерии. Чувствительность этого тест-объекта ко всем исследуемым химическим веществам в 1,4 – 20,4 раз выше по сравнению с *Tetrahimena pyriformis* и в 21,9 – 610,7 раза больше по сравнению со сперматозоидами. В то же время наибольшей устойчивостью к действию кислот обладал та-

Таблица

### Сравнительная оценка токсичности кислот в отношении люминесцентных бактерий, *Tetrahimena pyriformis* и сперматозоидов крупного рогатого скота

Кислоты	Бактерии, $EC_{50}$ , мг/л	<i>T. pyriformis</i> , $EC_{50}$ , мг/л	Сперматозоиды, $EC_{50}$ , мг/л
Ортофосфорная кислота	7,2 ± 0,3	146,2 ± 15,2	4400,4 ± 26,5
Соляная кислота	196,4 ± 16,3	270,3 ± 23,5	4300,7 ± 30,8
Уксусная кислота	146,4 ± 21,2	450,1 ± 28,4	5250,2 ± 48,6

Примечание: \* - различие с чувствительностью к уксусной кислоте достоверно ( $p < 0,05$ ).

кой клеточный тест-объект как сперматозоиды крупного рогатого скота, показатели токсичности кислот по отношению к этому тест-объекту находились в пределах 4300 – 5250 ЕС<sub>50</sub>, мг/л, что в 11,7 – 613,7 раз ниже по сравнению с двумя другими исследуемыми тест-объектами.

Среди анализируемых химических соединений наибольшей токсичностью по отношению к люминесцентным бактериям и тетрахименам обладает ортофосфорная кислота. Так, для люминесцентных бактерий ортофосфорная кислота в 20,3 – 27,3 раза токсичнее, чем уксусная и соляная кислоты соответственно, а по отношению к тетрахименам – в 1,8 – 3,0 раза.

Иная тенденция наблюдалась при исследовании токсичности кислот по отношению к сперматозоидам крупного рогатого скота. По отношению к данному тест-объекту наибольшей токсичностью обладали ортофосфорная и соляная кислоты. Токсичность этих химических соединений не имела достоверно значимых различий по отношению к анализируемому тест-объекту. В то же время токсичность ортофосфорной и соляной кислот по отношению к сперматозоидам была

в 1,2 раза больше по сравнению с уксусной кислотой.

**Заключение.** Проведенные исследования показали, что изучаемые нами тест-объекты имели высокую чувствительность к кислотам. Наибольшую чувствительность по отношению к кислотам показали люминесцентные бактерии. Тогда как наибольшей устойчивостью к токсическому действию кислот обладали сперматозоиды крупного рогатого скота.

Среди исследуемых кислот наибольшую токсичность по отношению к люминесцентным бактериям и *Tetrahymena pyriformis* проявила ортофосфорная кислота, а по отношению к сперматозоидам крупного скота – ортофосфорная и соляная кислоты. В то же время наименьшее токсическое действие на изучаемые тест-объекты оказала уксусная кислота.

Таким образом, люминесцентные бактерии, инфузории *Tetrahymena pyriformis* и сперматозоиды крупного рогатого скота можно рекомендовать в качестве альтернативных методов ускоренной регламентации химических факторов производственной и окружающей среды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богачева А.С., Шилов В.В., Полозова Е.В., Салова Л.С. Исследование токсичности химических веществ с использованием биологических тестов (альтернативных методов) // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2008. – № 1 (21). – С. 23 – 27.
2. Двоскин Я.Г., Меньшикова Т.А., Федосеева Т.А. и др. Оценка токсичности товаров бытовой химии.

3. Ирлина И.С., Меркулова Н.А. Определение токсичности с использованием в качестве тест-объекта *Tetrahymena pyriformis* // Цитология.

4. Методы оценки токсичности с использованием гидробионтов и клеточных культур: учеб. пособие /Е.В. Полозова, В.В. Шилов, Л.С. Салова, Т.Г. Мартинсон, А.С. Богачева. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2009. – 68 с.
5. Суслов А.Н., Данилов В.С. Определение токсичности воды и водных экс-

6. Шилов В.В.\*., Полозова Е.В., А.С. Богачева Сравнительная оценка токсического эффекта спиртов для биологических тест-объектов (бактерий, тетрахимен и сперматозоидов) // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – № 6. – С. 37–39.

## REFERENCES:

1. Bogacheva A.S., Shilov V.V., Polozova E.V., Salova L.S. Issledovanie toksichnosti khimicheskikh veshhestv s ispol'zovaniem biologicheskikh testov (al'ternativnykh metodov) // Vestnik Rossijskoj Voenno-meditsinskoj akademii. – 20- № 1 (21). – S. 23 – (in Russian)
2. Dvoskin YA.G., Men'shikova TA., Fedoseeva TA. i d.r. Otsenka toksichnosti tovarov bytovoj khimii. EHkspress-

3. Irina I.S., Merkulova N.A. Opredelenie toksichnosti s ispol'zovaniem v kachestve test-ob'ekta *Tetrahymena pyriformis* // Citologiya. – 1975. – T.17, № – S.1208 –

4. Metody ocenki toksichnosti s ispol'zovaniem gidrobiontov i kletochnykh kul'tur: ucheb. posobie /E.V. Polozova, V.V. Shilov, L.S. Salova, T.G. Martinson, A.S. Bogacheva. – SPb.: Izd-vo Politekhn. un-ta, 20- 68 s. (in Russian)
5. Suslov A.N., Danilov V.S. Opredelenie toksichnosti vody i vodnykh ehkstraktov iz ob'ektov okruzhayushchej sredy po

6. V.V. Shilov., Polozova E.V., A.S. Bogacheva Sravnitel'naya ocenka toksicheskogo ehffekta spirtov dlya biologicheskikh test-ob'ektov (bakterij, tetrahimen i spermatozoidov) // Sibirskij medicinskij zhurnal. – 20- № 6. – S. 37–(in Russian)

A.S. Bogacheva<sup>1,2</sup>, E.V. Polozova<sup>1,2</sup>, I.N. Klushkin<sup>3</sup>

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF ACIDS TOXICITY TO UNICELLULAR TEST OBJECTS

I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, 191015, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Northwest Scientific Center of Hygiene and Public Health”, 191036, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>3</sup>Federal Hygiene and Epidemiology Center of Rospotrebnadzor in St.-Petersburg, 196653, St. Petersburg, Russian Federation

The possibility of using unicellular organisms: luminescent bacteria, ciliates *Tetrahymena pyriformis* and cattle spermatozoa as test-objects for assessment of acids toxicity was experimentally evaluated. It was established that the analyzed bioassays are highly sensitive to the toxic effects of acids. It was shown that luminescent bacteria, ciliates *Tetrahymena pyriformis* and cattle spermatozoa can be successfully used in methods for accelerated assessment of acid-base pollution of the environment and working space. **Keywords:** biotesting, test-object, luminescent bacteria, *Tetrahymena pyriformis*, cattle spermatozoa, acids.

Материал поступил в редакцию 17.05.2016 г.