

УДК 574 (07)

И.С. Захаров, А.Г. Казанцева, А.А. Писарева

**БИОТЕСТОВЫЙ МЕТОД ДЛЯ КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНОСТИ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ ПО РЕАКЦИИ ДИНАМИКИ ГАЛЬВАНОТАКСИСА
ИНФУЗОРИЙ В ИНДИКАТОРНОЙ СРЕДЕ**

*Предложен способ объединения методов биотестового и аналитического контроля на основе измерения спектрофотометрических характеристик среды в индикаторной среде с помощью спектрофотометра СФ-56. На основе литературного обзора, выбран индикатор и проведены исследования, включающие опыты по выживаемости микроорганизмов в индикаторной среде, исследованию спектральных характеристик индикаторной среды с добавлением тяжелых металлов, по исследованию биотестовой реакции динамики гальванотаксиса инфузорий *P. caudatum* в индикаторной чистой среде и с добавлением тяжелых металлов. Полученные данные показывают возможность объединения методов биологического и аналитического контроля.*

Гальванотаксис; инфузории; тяжелые металлы; индигокармин; спектрофотометрия.

I.S. Zakharov, A.G. Kazantzeva, A.A. Pisareva

**BIOASSAY METHOD FOR TOXICITY CONTROL OF HEAVY METALS
WITH USING INFUZORIA GALVANOTAXIS DYNAMIC IN THE
INDICATION MEDIUM**

*In the paper is proposed a method combining techniques bioassay and analytical control on the basis of spectrophotometric measurements of characteristics of the medium indicator medium by a spectrophotometer. Based on the literature review, the indicator is selected and carried out research, including experiments on survival of indicator microorganisms in the environment, the study of spectral characteristics of the medium with the addition of an indicator of heavy metals, to study the reaction bioassay dynamics galvanotaxis ciliates *P. caudatum* indicator of a clean environment and with the addition of heavy metals. The data obtained show the possibility of combining the methods of biological and analytical control.*

Galvanotaxis; infusoria; heavy metals; indigo carmine; spectrophotometer

Экологический контроль водных сред предполагает дополнение аналитических методов биологическими, наиболее распространенным видом которого является микробиотестирование, т.е. биотехнологии, использующей организмы малых размеров и малые объемы пробы [1]. К ним относится биотестовый метод, основанный на тест-реакции динамики гальванотаксиса инфузорий [2]. Объединение в едином контуре биотехнической системы аналитического и биологического контроля снизил бы временные и материальные затраты на проведение исследований. Сложность их объединения заключается в том, что для биотестирования используется преимущественно визуальный метод наблюдения, для аналитического – аппаратная регистрация. Спектрофотометрия, как область техники, занимающаяся разработкой системы бесконтактных методов и приборов для измерения количественных оптических характеристик сред, может стать областью пересечения биологического и аналитического контроля.

Спектрофотометрия элементного состава среды основана на измерении спектров поглощения электромагнитного излучения, которые возникают при взаимодействии химических элементов в исследуемой водной среде с индикаторным веществом, а контроль биологических реакций, как правило, на сравнении результатов турбидиметрической регистрации оптических характеристик взвеси организмов в исследуемой и безвредной среде. Таким образом, проблема объединения аналитиче-

ского и биологического контроля с помощью спектрофотометрии состоит в подборе индикаторной среды, которая сохраняла бы возможность обнаружения химических элементов, будучи при этом безвредной для тест-организмов и тест-реакции.

В качестве тест-реакции данным требованиям удовлетворяет динамика гальванотаксиса инфузории-туфельки [2]. Контроль тест-реакции производят турбидиметрическим методом с помощью спектрофотометра, по измерению оптической плотности слоя инфузорий вблизи электрода.

Индикаторы для спектрофотометрии контроля токсичности водных сред при реакции с основными загрязнителями должны обладать свойством образовывать соединения, обладающие различными спектрами. В работе [3] в качестве индикатора присутствия в среде некоторых тяжелых металлов использовался индигокармин. Индигокармин (индиго-5,5'-дисульфокислота) – это краситель интенсивного синего цвета органического происхождения, часто используемый в пищевой промышленности (пищевая добавка E132). Используется как окислительно-восстановительный индикатор для титриметрического определения Fe (III), Mo (VI), U (VI), Tl (I, III), Pb (II), As (III), косвенного определения $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, K_2CrO_4 , $KClO_3$, $KBrO_3$, MnO_2 , PbO_2 [4].

При разработке методических основ создания биотеста в индикаторной среде авторами были проведены ряд исследований: вредности индикатора для инфузорий, изменения спектра оптической плотности индикатора при воздействии гальванотаксических импульсов, изменения спектра индикатора при воздействии вредных веществ в диапазоне параметров среды, безвредных для тест-организмов.

Опыты проводились с помощью спектрофотометра СФ-56 (в режимах сканирования для снятия спектров оптической плотности индикаторной среды и динамики оптической плотности для регистрации тест-реакции динамики гальванотаксиса) и экспериментальной установки для гальванотаксиса инфузорий, описанной в работе [5].

Для исследования безвредности индикаторной среды были проведены опыты по выживаемости микроорганизмов. В опытах при помощи микроскопа подсчитывалась концентрация клеток в культуральной среде Лозины-Лозинского и среде Лозины-Лозинского с индигокармином концентрацией 0,05 г/л. Подсчет осуществлялся в конце фазы стационарного равновесия кривой роста инфузорий, которая составляла 7 дней. При проведении нового опыта бралась концентрация клеток, полученная в предыдущем опыте, что позволяет построить график роста. Результаты экспериментов приведены в табл. 1 (при обычной погрешности микроскопного счета $\pm 10\%$).

Таблица 1

**Результаты эксперимента по выживаемости микроорганизмов
в индикаторной среде**

<i>Дни</i>	<i>Концентрация клеток в чистой среде Л-Л, кл/мл</i>	<i>Концентрация клеток в среде с индигокармином, кл/мл</i>
0	875	875
14	2080	2650
21	1970	2560

Результаты эксперимента доказывают безвредность индикатора для тест-организмов и возможность использования его в качестве контрольной среды при проведении биотестирования на основе реакции динамики гальванотаксиса инфузорий.

Было исследовано изменение спектра рабочей концентрации индикатора при воздействии гальванотаксических импульсов. Импульсы напряжения с амплитудой 2 В от специализированного мультивибратора [2] подавались через электроды, погруженные в раствор индикатора в течение 30 мин. Изменение спектра индикаторного раствора до и после подачи гальванотаксических импульсов оценивалось по

величине $\delta\% = 100(\Sigma[(x_{1i} - x_{0i})/x_{0i}]^2/n)^{1/2}$ (где x_{1i} , x_{0i} – значения оптической плотности индикатора (относительно воздуха) для i -ой длины волны до и после подачи импульсов. Получено, что $\delta < 5\%$. Это дает основание сделать вывод о том, что импульсы гальванотаксического генератора не влияют на спектр раствора индикатора.

Исследование изменения спектра оптической плотности индикатора при протекании реакции гальванотаксиса исследовалось следующим образом. Раствор индигокармина в среде Лозины-Лозинского (смесь солей макроэлементов) концентрацией 0,1 г/л объемом 0,5 мл смешивался в стандартной фотометрической кювете с 0,5 мл среды Лозины-Лозинского, содержащей микроорганизмы в концентрации 1500 ± 500 кл/мл. Метод и средство контроля тест-реакции подробно описаны в [2]. Для сравнения параллельно проводились эксперименты с использованием среды Лозины-Лозинского в качестве контрольной. Тест-реакция динамики гальванотаксиса позволяет получить сигнал периодического импульсного процесса с изменяющимися амплитудами и функцию ингибирования биологического эффекта вида $f(N; K)$, где N – номер импульса сигнала, K рассчитывалось по формуле:

$$K = 1 - A_N/A_{\max}$$

где A_N – амплитуда N -го импульса сигнала; A_{\max} – амплитуда наибольшего импульса в сигнале. Результаты эксперимента приведены на рис. 1.

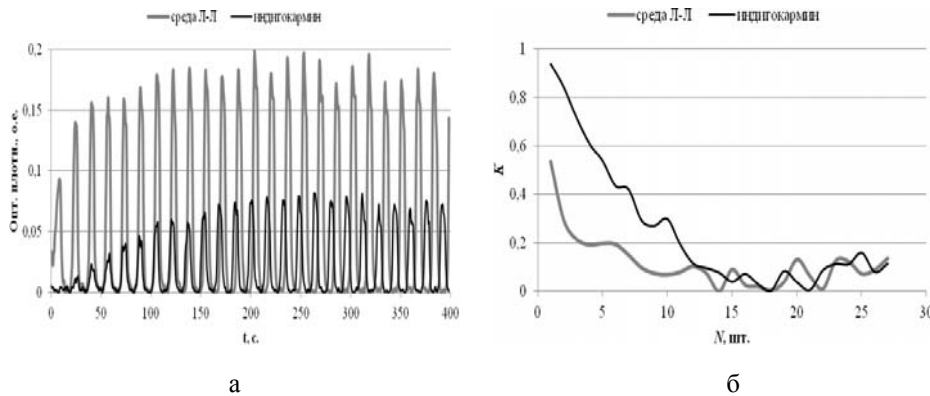


Рис. 1 Сигнал и функция ингибирования биологического эффекта тест-реакции динамики гальванотаксиса: а) Сигнал периодического импульсного процесса; б) Функция вида $f(N; K)$

Амплитуды сигналов в индикаторной среде и среде Л.-Л. различаются на в среднем на $0,113 \pm 0,004$ ед. оптической плотности, но при построении функциональной зависимости данная разница не играет существенного значения (коэффициент корреляции между кривыми составляет 0,86), поэтому раствор индигокармина в концентрации 0,05 г/л может быть использован в качестве контрольной среды при разработке метода биотестирования.

Эксперименты по исследованию возможности применения индикаторной среды для аналитического контроля основывались на материале, приведенном в [3]. Существенное различие в способе организации эксперимента было в том, что буферный раствор, используемый авторами [3], заменялся на среду Л.-Л. В опытах использовался раствор с концентрацией индигокармина 0,05 г/л. В качестве соли тяжелых металлов использовался CuSO_4 категории ЧДА, являющимся так же модельным токсикантом для биотестов на основе реакций инфузорий. Исследования проводились на спектрофотометре СФ-56 в режиме сканирования в диапазоне длин волн 400...800 нм относительно воды. На рис. 2 приведены результаты эксперимента с концентрациями модельного токсиканта $1-10^{-4}$ г/л.

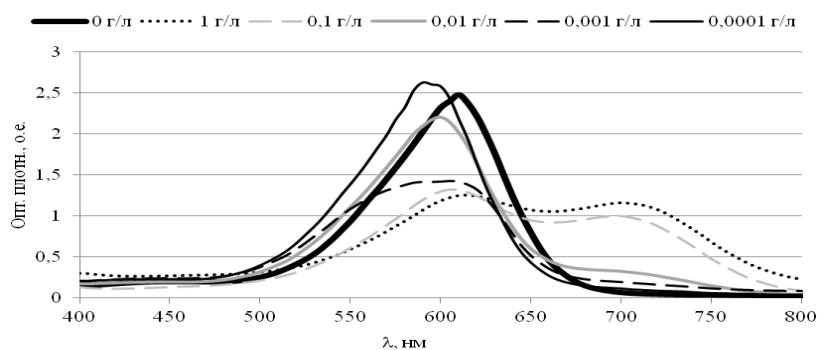


Рис. 2 Результаты эксперимента по исследованию возможности применения индикаторной среды для аналитического контроля

На рис. 2 видно, что график спектра оптической плотности раствора индигокармина с добавлением соли меди относительно воды (такую зависимость снимали для сопоставления результатов с полученными в работе [3]) имеет информативный участок в диапазоне длин волн 700-740 нм, где проявляется зависимость значений спектра от концентрации соли в диапазоне 1 г/л ... 10⁻³ г/л.

Различия формы гальванотаксических сигналов в индикаторной среде с токсикантом и без также изменяются в зависимости от концентрации последнего. Коэффициент корреляции между сигналом в чистой индикаторной среде и среде с CuSO₄ разной концентрации растет с уменьшением количества токсиканта в пробе. В табл. 2 приведены значения коэффициента корреляции сигналов.

Таким образом, применение индикаторной среды позволяет не только обнаруживать присутствие загрязнителя в исследуемой пробе, но и оценивать его концентрацию.

По корреляционному критерию оценивались опыты по биотестированию с применением реакции динамики гальванотаксиса с концентрациями CuSO₄ 0,01; 0,001; 0,0001 г/л. Эксперименты проводились согласно последовательности, описанной выше, но к взвеси клеток добавлялись растворы токсикантов в индикаторной среде. В табл. 3 приведены значения коэффициента корреляции между функцией ингибирования в чистой среде и среде с токсикантом CuSO₄ различной концентрации.

Таблица 3

Значение коэффициента корреляции между значениями функции ингибирования биологического эффекта для раствора индигокармина концентрацией 0,05 г/л и значениями функций для растворов индигокармина (0,05 г/л) и CuSO₄ разной концентрации

Концентрация CuSO ₄ , г/л	Значение коэффициента корреляции
0,01	0,35
0,001	0,81
0,0001	0,89

Результаты исследования показали, что принципиально возможно объединение методов аналитического и биологического контроля и проведение биологической тест-реакции в безвредной для инфузорий *P. caudatum* индикаторной среде индигокармина. Контроль теста на базе спектрофотометрии позволяет определять токсичность, но и создать основу для последующей оценки вероятности наличия определенного тяжелого металла в среде, причем, биотестовый метод показывает более высокую чувствительность к малым концентрациям вредных веществ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Wells P.G., Kenneth Lee, Christian Blaise. *Microscale Testing in Aquatic Toxicology* // Science, 1998. – 720 p.
2. Казанцева А.Г., Захаров И.С. Разработка аппаратурного метода контроля токсичности водных сред по тест-реакции динамики гальванотаксиса инфузорий // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ» (Известия государственного электротехнического университета). – СПб., 2011. – Вып. 7. – С. 116-124.
3. Zanoni T.B., Cardoso A.A., Boldrin-Zanoni M.V. Exploratory study on sequestration of some essential metals by indigo carmine food dye // Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 46. – № 4.
4. Шарло Г. Методы аналитической химии. – 2-е изд. – Т. 1. – М., 1969. – С. 392, 821, 827; Индикаторы: Пер. с англ. – Т. 2. – М., 1976.
5. Казанцева А.Г., Захаров И.С. Особенности формирования гальванотаксического сигнала в токсичной среде // Материалы 63-ей науч.- техн. конф. профессорско-преподавательского состава университета СПбГЭТУ «ЛЭТИ». – СПб., 2010. – С. 254-260.

Статью рекомендовал к опубликованию к.т.н., доцент А.Н. Алипов.

Захаров Игорь Сергеевич – Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет; e-mail: Segeich188@gmail.com; 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Попова, 5; тел.: 88122349071; кафедра инженерной защиты окружающей среды; к.т.н.; доцент.

Писарева Ангелина Анатольевна – кафедра инженерной защиты окружающей среды; магистр.

Казанцева Анна Геннадьевна – Общество с ограниченной ответственностью «ГЦЭ-экология» в г. Санкт-Петербург; e-mail: kazanutik@mail.ru; 194292, 3-й Верхний пер., 25; тел.: 89213463888; инженер; к.т.н.

Zakharov Igor Sergeevich – Saint-Petersburg State Electrotechnical University; e-mail: Segeich188@gmail.com; 5, Popov's street, Saint-Petersburg, 197376, Russia; +78122349071; the department of ingeneering defence of environment; cand. of eng. sc.; associate professor.

Pisareva Angelina Anatoljevna – the department of ingeneering defence of environment; magister.

Kazantzeva Anna Gennadjevna – Saint-Petersburg «GCE-ecology»Ltd; e-mail: kazanutik@mail.ru; 25, 3-й Verhny street, Saint-Petersburg, 194292, Russia; phone: +79213463888; engineer; cand. of eng. sc.

УДК 535.37/535.31

Е.А. Кочелаев, А.О. Волчек, В.М. Сидоренко

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ИНДИКАТРИСЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЧАСТИЦЫ БИОАЭРОЗОЛЯ ОТ ЕЁ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ

Результаты численного моделирования углового распределения флуоресценции отдельных частиц аэрозоля сравниваются с экспериментальными данными, полученными в результате исследования белка Ovalbumin и спор Bacillus subtilis. Экспериментальные данные в целом согласуются с результатами модельных исследований. Они подтверждают наличие анизотропии индикатрисы флуоресценции, величина которой зависит от оптической плотности частиц аэрозоля на длинах волн возбуждения и флуоресценции. На основании проведенных исследований сделан вывод о том, что характеристики анизотропии индикатрисы флуоресценции могут быть использованы в качестве дополнительного маркера при качественном анализе частиц биоаэрозоля с целью повышения селективности проточно-оптического метода.

Биоаэрозоль; флуоресценция; индикатриса; частица.