

# Экспресс-методы оценки токсичности сточных вод, попадающих в рыбохозяйственные водоемы, по скорости регенерации вакуолярного аппарата инфузорий *Spirostomum ambiguum* и *Stylonychia mytilus*

Л.Н. Павлова – Кафедра биоэкологии и ихтиологии Московского государственного университета технологий и управления

Наиболее крупными, массовыми и широко известными группами токсикантов являются металлы и их соли, а также нефтепродукты [Georg R.Y. *Potential effects of oil drilling and dumping activities on marine biota// Environmental Aspects of Chemical Use in Well-Drilling Operations. Conference Proceeding. May, 1975, Houston, Texas. Report N EPA-560/1-75-004, U.S. Environmental Protection Agency. P. 103–110; Hall, 1971; Kiortsis V., Trampusch H. A. L., eds. Regeneration in Animals and Related Problems. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. 1965. 568 pp.; Mayer F., Ellersieck M.R. Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemical and 66 species of freshwater animals// US Dep. Inter. Fish and Wildlife Serv. Resour. Publ. 1986. No. 160, IV. 506 pp.; Боровский Н.А. Изменение гидрохимических показателей воды при попадании буровых компонентов// «Газовая промышленность», 1990, № 6. С. 30–38]. Сточные воды, поступающие от автобусного парка, также содержат больше всего указанных загрязнителей. Именно такой тип загрязнения – стоками водной среды – был взят нами для исследования его влияния на процесс регенерации у гидробионтов.*

Сточная вода автобусного парка, прошедшая через очистное сооружение, как раз имеет характеристики, близкие к указанным. По этой причине нами исследовалось не воздействие отдельных токсикантов, содержащихся в сточной воде, а комплексное воздействие нефтепродуктов и тяжелых металлов, ПДК которых было превышено [Шиленко Н.А., Соколова С.А., Анисова С.Н. и др. *Перечень рыбохозяйственных нормативов: ПДК и ОБУВ вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО, 1999. 304 с.*].

Одноклеточные животные, как правило, легко регенерируют, и регенерационный процесс у них протекает гораздо быстрее, чем у любого многоклеточного существа.

Длина клетки у спиростомы может достигать 1,5 мм. Это простейшее, относящееся к классу разноресничных инфузорий.

**Спиростомы** – крупная инфузория, обладает по сравнению с другими инфузориями рядом преимуществ, которые могли бы быть использованы для изучения регенерации. На ее заднем конце расположен вакуолярный аппарат. Это выделительная система инфузории. Особую роль отводили исследованию регенерации вакуолярного аппарата, который в норме не меняет своего положения в теле инфузории. В образовании временной вакуоли, по всей видимости, активное участие принимает приводящий канал, из стенок которого и возникает новая сократительная вакуоль.

При надрезе заднего конца инфузории срастание стенок клетки происходит очень быстро – всего за 4 мин., но постоянная вакуоль появляется только через 1–2 мин. после восстановления клеточной стенки.

Высокая регенерационная способность заднего конца тела инфузории при нанесении продольного надреза позволяет использовать спиростомы в качестве биологических тест-объектов для обнаружения токсичности вредных веществ, содержащихся в сточных водах. Обычно регенерация заднего конца при нанесении продольного разреза происходит за 10 мин.; если же в исследуемой воде имеются ядовитые вещества, подавляющие процессы регенерации, то вакуоль после надреза будет восстанавливаться замедленно, что и является показателем присутствия токсичных веществ в исследуемой пробе воды. Подобный анализ можно отнести к экспресс-методам, так как ответ получают в течение 10–15 мин.

Для исследования процессов регенерации в условиях воздействия токсичного промышленного стока были взяты лабораторные культуры крупных инфузорий – *Spirostomum ambiguum* и *Stylonychia mytilus*.

Спиростомы культивировали в пробирках на среде, содержащей на 1 л: 20 мг *KCl*; 25 мг *MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O*; 25 мг *CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O*; 37,5 мг *NaHCO<sub>3</sub>* и 150 мг *NaCl*. В каждую пробирку, содержащую 15 мл среды, непосредственно после посева инфузорий добавляли 15 мг сухих пивных дрожжей.

Для нанесения надрезов инфузорий отбирали из культуры тонко оттянутой пастеровской пипеткой и переносили на предметное стекло в крупную каплю среды. Клетку надрезали микроскальпелем под микроскопом МБС-1 без применения наркотизирующих и замедляющих движение средств, так как скорость перемещения у *S. ambiguum* весьма невелика.

Были выполнены три серии опытов. В первой серии надрезали задний конец инфузории, так чтобы надрезалась вся сократительная вакуоль. Опыты делались с тем расчетом, что регенерацию вакуолярного аппарата следует считать законченной после начала функционирования сократительной вакуоли. Это в какой-то мере давало возможность стандартизировать опыт и наносить инфузориям калиброванный надрез.

Сточные воды автобусного парка № 15 разбавлялись водопроводной отстойной водой в следующих соотношениях: без разбавления; 1:1; 1:3 и 1:6. Затем в них помещались спиростомы: за 6 ч до нанесения надреза заднего конца тела и сразу после нанесения надреза, когда при наличии токсикантов шла регенерация клеточной стенки инфузории и вакуолярного аппарата. Продолжительность воздействия сточных вод (6 ч) взята согласно методическим указаниям по биотестированию отходов, поступающих в окружающую среду. О воздействии токсикантов сточных вод на регенерацию надреза у спиростомы следили по времени регенерации вакуолярного аппарата при разведении в соотношениях, указанных выше.

В общей сложности наблюдали за регенерацией 120 клеток. Особую роль отводили исследованию регенерации вакуолярного аппарата, который в норме не меняет своего положения в теле инфузории.

Помимо спиростом регенерацию вакуолярного аппарата при действии указанного стока исследовали у брюхогесничной инфузории *Stylonychia mytilus*. Длина клетки – около 250 мкм, тело сильно сплющено в спинно-брюшном направлении. Ротовой аппарат расположен на брюшной стороне. Здесь же находятся брюшные цирры, с помощью которых инфузория «бегает» по различным поверхностям. По краю клетки размещены краевые цирры, служащие для плавания клетки в толще воды. На заднем конце клетки расположены длинные хвостовые цирры, при движении которых инфузория способна производить резкие скачки, разом отрываясь от поверхности, на которой находится. Сократительная вакуоль – одна, расположена в средней части клетки, ближе к спинной поверхности, с правой стороны.

Оптимальная температура для жизнедеятельности этой инфузории – 17–20° С (по другим данным – 24–25° С), инфузория жизнеспособна при температуре до 25° С. Оптимальное значение рН среды – 6,5–7,1; допустимое – 6,0–9,5.

Культивирование стилоухий мы проводили на водопроводной воде, отстоянной в течение недели и стерилизованной кипячением на водяной бане в течение 1 ч. В качестве корма использовали сухие пекарские дрожжи в количестве 0,003 г (1 мм<sup>3</sup>) на 10 мл.

Стилоухиям микроскальпелем наносился надрез с правой стороны так, чтобы надрезать сократительную вакуоль. Во-первых, это давало возможность сделать калиброванный надрез, во-вторых – проследить за регенерацией надреза в различных разведениях сточных вод по окончании восстановления сократительной вакуоли.

Как и в экспериментах со спиростомами, сточные воды автобусного парка исследовались без разбавления и при разбавлении в 2, 3 и 6 раз. Окончанием регенерации считается время, за которое сократительная вакуоль восстанавливается и начинает функционировать.

В общей сложности была исследована регенерация 80 стилоухий в сточных водах и 20 – в чистой отстойной водопроводной воде (контроль).

У спиростомы *Spirostomum ambiguum* в контроле при надрезе заднего конца тела инфузории с полным разрезом сократительной вакуоли удалось установить, что через 2 мин. выше надреза начинает образовываться новая сократительная вакуоль, которая близка по размерам к разрезанной вакуоли. В это же время начинают восстанавливаться клеточные стенки разрезанного конца и отстоящие друг от друга участки клеточной стенки в области разреза начинают сливаться. Через 3 мин. разрезанные стенки клеточной оболочки соединены и виден только шов, который на 4-й мин. после нанесения разреза исчезает, и клеточная стенка заднего конца тела инфузории выглядит нормальной. Однако задняя вакуоль появляется только через 1 мин. после полного восстановления клеточной стенки заднего конца тела инфузории. На 7-й мин. после разреза временная и постоянная вакуоли вступают в контакт и начинается процесс их слияния, который длится около 3 мин. Через 10 мин. после надреза происходит полное восстановление вакуолярного аппарата.

В том случае, когда одновременно с надрезом заднего конца тела инфузории производится боковой надрез, картина регенерации клеточной стенки и вакуолярного аппарата была несколько иной. Задний конец инфузории в этом случае регенерирует так же, как и в предыдущем. Дополнительный надрез приводит к тому, что временная сократительная вакуоль образуется всегда над ним. Поэтому, изменяя положение дополнительного надреза, можно регулировать место появления временной сократительной вакуоли.

После нанесения косо надреза он начинает сужаться, а отделенный надрезом участок клетки утолщается и начинает формировать выступ, похожий на задний конец тела инфузории. Этот выступ задерживает продвижение временной сократительной вакуоли к восстановившейся постоянной вакуоли. Только на 12–14-й мин. после нанесения надрезов временная вакуоль начинает передвигаться к заднему концу, однако это передвижение заканчивается не сближением с постоянной вакуолю, а вхождением в сформированный выступ.

В дальнейшем образовавшийся выступ с вакуолю медленно перемещается к каудальной части тела инфузории. В конце концов, происходит слияние выступа с задним концом инфузории, а затем – и слияние обеих вакуолей. Из-за медленного перемещения выступа процесс слияния вакуолей длится 1 ч и более после нанесения надрезов.

Если боковой надрез производится перпендикулярно продольной оси тела инфузории либо косо в сторону каудальной части инфузории, ход регенерации вакуолярного аппарата не меняется. Во всех случаях над надрезом возникает временная сократительная вакуоль, формируется выступ тела, подобный заднему концу инфузории, и временная сократительная вакуоль входит в этот выступ. В дальнейшем сформированный выступ с сократительной вакуолю перемещается к каудальной части тела.

При нанесении инфузориям только боковых надрезов на различных расстояниях от хвостового конца тела над надрезом всегда возникает временная вакуоль, несмотря на то, что постоянная вакуоль в заднем конце тела сохраняется. Если же надрез произведен очень близко к переднему концу инфузории, то регенерация идет за счет перемещения выступа с временной вакуолю к заднему концу инфузории.

Почти полностью отсеченные участки переднего и заднего конца инфузории, оставшиеся только на малом стебельке клеточной стенки, не отбрасываются, а в процессе регенерации снова включаются в клетку.

При надрезе заднего конца инфузории срастание стенок клетки происходит очень быстро, всего за 4 мин., но постоянная вакуоль появляется только через 1–2 мин. после восстановления клеточной стенки. В общей сложности регенерация заднего конца тела у спиростом занимает около 10 мин., что позволяет экспресс-методом определять действие вредных веществ на регенерационные процессы у простейших. Очевидно, время задержки появления вакуоли на заднем конце инфузории после его полного восстановления объясняется первоначальным синтезом мембранелл, из которых впоследствии собирается мембрана сократительной вакуоли.

Таким образом, для токсикологических экспериментов наиболее подходит нанесение надреза заднего конца тела инфузории, с рассечением всей сократительной вакуоли. Этот прием позволит за самый короткий срок определить последствия воздействия сточных вод на регенерацию надреза у инфузорий. Учитывая сказанное, в опытах со сточными водами автобусного парка при различных разведениях проводился только надрез заднего конца тела инфузории.

Для исследования воздействия токсикантов на процесс регенерации надреза заднего конца тела спиростом их предварительно экспонировали в течение 6 ч в неразведенной сточной воде, а также при разведении отстойной водопроводной водой в 2, 3 и 6 раз. Срок 6 ч взят согласно стандартизированным токсикологическим методам по определению токсичности водных растворов при работе с инфузориями (РД 64-085-89). Результаты исследований о времени регенерации надреза заднего конца тела спиростомы в области сократительной вакуоли представлены в *табл. 1*.

Таким образом, из результатов исследования видно, что биотестирование токсичности сточных вод после прохождения через очистное сооружение указывает на наличие токсичности, ско-

Таблица 1

Регенерация надреза заднего конца тела и выживаемость спиростом при различных разбавлениях сточной воды автобусного парка отстойной водопроводной водой

Разбавление сточной воды	Контроль	Без разбавления	В 2 раза	В 3 раза	В 6 раз
Время регенерации надреза, мин.	10,4 ± 1,2	<b>21,1 ± 2,5</b>	<b>17,3 ± 1,8</b>	9,8 ± 1,5	11,0 ± 0,8
Выживаемость, %	93 ± 1,4	<b>57 ± 6,6</b>	93 ± 7,0	96 ± 3,3	93 ± 6,6

Примечание. Жирным шрифтом выделена достоверная разница по критерию Стьюдента при  $P \leq 0,05$ .

рее всего, за счет наличия в стоке повышенного содержания нефтепродуктов и тяжелых металлов, таких как железо, медь, цинк и свинец. Сравнительный анализ чувствительности биотестирования сточной воды по регенерации и выживаемости спиростом показывает, что исследование токсичности по регенерации надреза более предпочтительно по сравнению с выживаемостью. Достоверные результаты по выживаемости получаются в неразбавленной сточной воде, в то время как при исследовании по регенерации надреза инфузории достоверная разница с контролем отмечается при разбавлении стока в 2 раза. Следовательно, даже после прохождения через очистное сооружение сточная вода автобусного парка требует разбавления нетоксичным стоком в 3 раза.

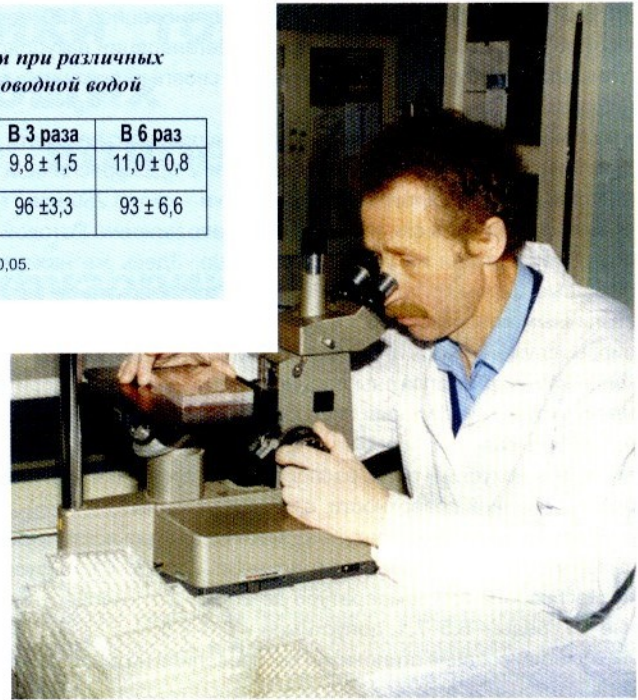


Таблица 2

Регенерация надреза у стилонихий и их выживаемость при различных разбавлениях сточной воды автобусного парка

Разбавление сточной воды	Контроль	Без разбавления	В 2 раза	В 3 раза	В 6 раз
Время регенерации надреза, мин.	22 ± 1,8	<b>32,4 ± 3,1</b>	<b>28,1 ± 2,4</b>	24,0 ± 1,7	21,2 ± 1,6
Выживаемость, %	100	<b>64 ± 5,2</b>	90 ± 4,4	93 ± 6,0	97 ± 3,0

Примечание. Жирным шрифтом выделена достоверная разница по критерию Стьюдента при  $P \leq 0,05$ .

**Стилонихии.** У стилонихий (*Stylonichya mytilus*) при нанесении надреза с правой стороны в области сократительной вакуоли после 6-часового экспонирования в загрязненной воде регенерация шла медленнее по сравнению со спиростомами. В контроле сократительная вакуоль полностью восстанавливалась через 22 мин. Как и в предыдущих опытах, регенерация клеточной стенки инфузории предшествовала восстановлению сократительной вакуоли и началу ее функционирования.

При культивации инфузорий в исследуемой сточной воде и при разбавлении сточной воды в 2, 3 и 6 раз время регенерации удлинялось. Результаты опытов по скорости регенерации надреза у стилонихий и выживаемости оперированных особей при различных разбавлениях сточной воды представлены в табл. 2.

Результаты по регенерации и выживаемости у стилонихий оказались сходными с теми же биологическими показателями у спиростом. В этом случае также удалось показать, что биотестирование по регенерации надреза – более чувствительный метод по сравнению с оценкой загрязнения водной среды по выживаемости.

Однако сравнительные показатели чувствительности у спиростом и стилонихий при регенерации надреза в области сократительной вакуоли свидетельствуют о том, что спиростомы более чувствительны к загрязнению водной среды нефтепродуктами и тяжелыми металлами. Это проявляется и в скорости регенерации, и в таком показателе, как выживаемость регенерирующих особей в загрязненной воде.

Помимо этого процесс регенерации у стилонихий занимает почти в 2 раза больше времени, чем у спиростом. При нанесении надреза под микроскопом опять же эту микрохирургическую опе-

рацию проще проводить на спиростомах, так как они медленно движутся, в то время как стилонихиям можно нанести надрез только во время остановки.

Учитывая все сказанное, можно сделать вывод, что для биотестирования сточных вод по регенерации инфузорий спиростомы в качестве тест-объекта подходят лучше, чем стилонихии, хотя в настоящее время значительная часть биотестирований по такому показателю, как выживаемость, проводится на стилонихиях.

**Pavlova L.N.**

**Express-methods for toxicity estimation of sewage falling into fisheries water bodies by the rate of regeneration of vacuolar apparatus of infusoria *Spirostomum ambiguum* and *Stylonichya mytilus***

The author studied the influence of industrial sewage pollution on regeneration processes of infusoria *Spirostomum ambiguum* and *Stylonichya mytilus*.

The results obtained show that regeneration and survival of both species are similar; biological testing based on regeneration of an incision is more sensitive method comparing to estimation based on survival rate.

Comparing these two species the author makes a conclusion that *Spirostoma* is more suitable indicator of water pollution: the infusorium is more sensitive to oil and heavy metals pollution, and the rate of its regeneration is twice more. Besides, *Spirostoma* are more convenient for microsurgical operation due to their lesser speed.