1. Изготовление блока луночных микроаквариумов (для визуального подсчета под микроскопом)

Блок луночных микроаквариумов изготовляют из пластины органического стекла размером 15×8,5×1,3 см. В пластине высверливают с последующей полировкой 5 рядов по 9 лунок. Диаметр каждой лунки 1,2 см – верхний и 0,8 см – нижний, глубина – 0,7 см. Рабочий объем каждой лунки – 0,4 см3. Вместо блока микроаквариумов можно использовать микробиологические предметные стекла с отшлифованной лункой вместимостью 0,2 см3 (по 5 шт. на пробу).

2. Определение безвредности и биологической активности на тест-культуре Paramecium caudatum (Патент РФ № 2125261).

Данный способ биологического мониторинга экологических систем и объектов (в дальнейшем экспресс-биотест) позволяет быстро, с минимальными затратами, унифицировано определять токсичность, полноценность и специфическую активность почвы, воды, воздуха, пищи для человека, кормов для животных, лекарств, неизвестных веществ, предметов быта, неизвестных предметов и т. д.

В качестве тест-объекта в данном методе экспресс-биотеста используется свободно живущий, легко культивируемый одноклеточный микроорганизм – Paramecium caudatum. Экспресс-биотест достаточно чувствительно реагирует на активные вещества, содержащиеся в испытуемых объектах, и отражает их отношение к жизнеспособности организма. Скорость течения процессов жизнедеятельности тест-организма зависит от качества и количества пищевого субстрата.

2.1. Приготовление рабочего раствора питательной среды для культивирования Paramecium caudatum.

Средой для культивирования инфузорий служит раствор Лозина-Лозинского следующего состава: NaCl – 0,01 %, KCl – 0,001 %, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,001 %, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,001 %, $NaHCO_3$ – 0,002 %.

Приготовление 10-кратного концентрированного раствора:

растворяют по 1,0 г NaCl, KCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaHCO_3$.

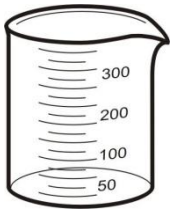
Доводят до метки водой

1 дм3

Не более 1 месяца

Рабочий раствор Лозина-Лозинского готовят путем разбавления в 10 раз (1 : 9) концентрированной среды дистиллированной водой. Рабочий раствор хранят не более двух недель при комнатной температуре.

2.2. Культивирование и хранение тест-организмов (инфузории Paramecium caudatum).



+ раб.р-р Лозина-Лозинского 1:2

20 мин

72 ч 37 оС

+ 10 см3 маточной культуры тест-организмов

Перемешивают, закрывают, датируют

Культивируют тест-организмы при температуре 22 – 25 оС. Для получения тесторганизмов в экспоненциальной фазе роста (3-х дневных) культуру пересевают в новую среду каждые 3 – 4 дня, а в стационарной фазе роста (2-х недельных) – 2 раза в месяц.

2.3. Подготовка пробы проверяемого объекта к исследованию.

подсушиваю т

30 оС

10 г

измельчаю т,

просеиваю т

По 0,1 г

+ H_2O 10 см3

Смесь выдерживают в течение 24 ч, 2 – 3 раза встряхивают, центрифугируют в течение 15 мин при частоте 50 – 83 с-1. Для дальнейшей работы используют центрифугат, представляющий разведение испытуемого объекта 1 : 100.

2.4. Первый этап. Оценка наличия биологической активности или токсичности вещества проверяемого объекта.

9 см3 р-ра тест-организмов

+ 1см3 H_2O, перемешивают

+1 см3 р-ра п.2.3, перемешивают

1:10 000

1:100 000

1:1 000 000

25о С

Через 0,5, 1,0, 3,0, 6,0 и 24 ч из каждой пробирки берут по 0,1 см3 раствора с тест-организмами (не менее 400 клеток) и заполняют им 5 микроаквариумов. Приготовленные пробы анализируют под бинокулярной лупой или микроскопом при малом увеличении, оценивая состояние тест-организмов в каждом микроаквариуме по следующим критериям:

- ИН – индифферентность (тест-организмы совершают равномерные броуновские движения);
- БА – биоактивность (тест-организмы совершают неравномерные движения с ускорениями);
- БЦ-50 – биоцидность-50 (погибло 50±10 % тест-организмов);
- БЦ-100 – биоцидность-100 (погибло 90±10 % тест-организмов).

В случае токсичности исследуемого продукта парамеции изменяют свою обычную вытянуто-овальную форму на округлую, а движение – на беспорядочное с поворотом вокруг своей поперечной оси; прекращают движение и (или) подвергаются распаду – лизису (количество лизированных клеток зависит от степени токсичности объекта).

Обработку результатов проводят следующим образом:

ИН – объект биологически не активен.

БА – объект биологически: (1:1000) – слабоактивен; (1:10 000) – среднеактивен; (1:100 000) – активен; (1:1 000 000) – высокоактивен.

БЦ-50 – объект токсичен.

БЦ-100 – токсическое действие: (1:1000) – слабое; (1:10 000) – среднее; (1:100 000) – сильное; (1:1 000 000) – очень сильное.

БА-24 ч – биологическая активность очень стабильная.

БА-3,0-6,0 ч – биологическая активность стабильная.

БА-0,5-1,0 ч – биологическая активность слабо стабильная.

БЦ-100 – 0,5 – 1,0 ч – быстрое повреждение жизненных механизмов.

БУ-100 – 3,0 – 6,0 ч – постепенное повреждение жизненных механизмов.

БЦ-100 – 24 ч – медленное повреждение жизненных механизмов.

2.5. Второй этап. Оценка биологической активности вещества проверяемого объекта методом разрешающего воздействия.

Сущность метода заключается в выявлении с помощью до-полнительного разрешающего неблагоприятного фактора биоло-гического действия вещества проверяемого объекта на механизмы адаптации и резистентности тест-организмов (клеток). В работе используют тест-организмы из первого этапа, контактировавшие с различными концентрациями вещества проверяемого объекта в течение 24 ч, и не контактировавшие (контрольные).

Контрольная пробирка

1 см3 р-ра тест-организмов

Добавляют Nacl для гибели тест-организмов в течение 5 минут

Концентрация 8,0 ма0,1%-0,5 см3

Контроль гибели тест-организмов ведут в микроаквариумах под бинокулярной лупой с помощью секундомера.

1 см3 раствора тест-организмов

0,1-0,5 см3

и измеряют продолжительность жизни тест-организмов до 100 % их гибели. Опыты повторяют необходимое число раз и для дальнейшей ра- боты используют среднюю арифметическую величину.

Индекс биологической активности вещества проверяемого объекта *IБА определяют по формуле:*

$I_{ба}$=То/Тк

где *То – продолжительность жизни тест-организмов под действием разре- шающего фактора, проживших предварительно 24 ч в среде с выбранной концентрацией вещества проверяемого объекта, мин; tк – продолжитель- ность жизни контрольных тест-организмов под действием разрешающего фактора, проживших предварительно 24 ч в контрольной среде, мин.*

При *IБА=1,000±0,1000 вещество объекта биологически не активно, при IБА>1,000±0,1000 вещество объекта повышает жиз- неспособность тест-организмов, при IБА<1,000±0,1000 объект снижает жизнеспособность тест-организмов.*

Величина *IБА вещества проверяемого объекта и его концен- трация в растворе с тест-организмами характеризуют степень его биологической активности.*

2.6. Третий этап. Оценка биологической активности вещества проверяемого объекта по интенсивности размножения тест-организмов.

Используют тест-организмы в экспоненциальной фазе роста, опыт проводят по методике первого этапа (п. 2.4), в ка- ждой пробирке определяют плотность инокулята *Р. Затем пробирки помещают в термостат с температурой 25 оС на 3 суток. При вы*держке проводят аэрацию смеси путем периодического встряхивания пробирок несколько раз в сутки. Через 3 суток в каждой пробирке определяют плотность инокулята *Р. При необходимости ставят несколько опытов и вычисляют среднее значение.*

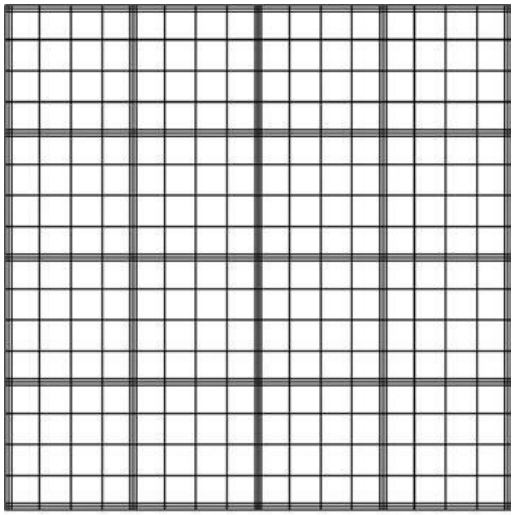
Определение плотности инокулята

1,0 см3 раствора

0,2 см3

тщательно перемешивают, заполняют полученным раствором камеру Фукса-Розенталя и подсчитывают под микроскопом количество тест-организмов в 10 квадратах.

Заполнение камеры Фукса-Розенталя и подсчет тест-организмов



Камера внешне представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла содержит выемку, на дно которой нанесена сетка. Боковые площадки расположены на 0,2 мм выше центральной и служат для притирания покровного стекла. Сетка камеры разделена на 16 больших или 256 малых квадратов. Большие квадраты сетки Фукса-Розенталя не разграфлены, сгруппированы по 16 шт., причем каждая такая группа ограничена тройными линиями (рис. 1). Объем камеры составляет 3,2 см3, глубина – 0,2 мм, площадь больших и малых квадратов сетки – соответственно 1/16 мм2и 1 мм2.

Предварительно камеру хорошо промывают и просушивают. На поверхность сеток наносят капилляром или пипеткой не- большую каплю исследуемого раствора, накрывают шлифованным стеклом и притирают покровное стекло к боковым площадкам. Жидкость под покровным стеклом должна растекаться по всей сетке равномерно, без пузырьков. Углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, двигают покровное стекло в противоположные стороны до появления картины интерференции (колец Ньютона), свидетельствующей о том, что стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем камеры соответствует рас- четному. Заполненную камеру помещают на столик микроскопа.

Подсчет тест-организмов рекомендуется начинать через 3 – 5 мин после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании находились в одной плоскости. Число тест- организмов подсчитывают с объективом 8х (10х), реже 40х в 16 квадратах сетки, следуя по диагонали; в случае малой численности тест-организмов – во всем поле камеры. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата.

Плотность инокулята (количество тест-организмов в 1 см3 исследуемого раствора) *Р, шт./см3:*

$P = x*10^3 / n*V$

где *х – число подсчитанных тест-организмов, шт.; n – число просчитанных маленьких квадратов камеры; V – объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата (V = 0,0125 мм3).*

Индекс интенсивности размножения тест-организмов $I_{ир}$:

$I_{ир} = P_{о2}*P_{к1} / P_{о1}*P_{к2}$

где *РО2 – плотность инокулята в опыте в конце инкубации, шт./см3;*
РК1 – плотность инокулята в контроле в начале инкубации, шт./см3;
РО1 – плотность инокулята в опыте в начале инкубации, шт./см3;
РК2 – плотность инокулята в контроле в конце инкубации, шт./см3.

Индекс интенсивности размножения при *ІИР =1,000±0,1000 показывает, что вещество объекта биологически не активно, при ІИР >1,000±0,1000 – вещество объекта стимулирует размножение тест-организмов, при ІИР <1,000±0,1000 вещество объекта угнета-ет размножение тест-организмов.*

Величина индекса интенсивности размножения в сочета-нии с концентрацией проверяемого объекта в среде характеризу-ет степень его влияния на механизм размножения тест-организмов.