

Учебно-научный центр физико-химической биологии
Саратовского национального исследовательского государственного
университета имени Н.Г. Чернышевского
и Института биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Д.С. Чумаков, А.А. Голубев, С.А. Коннова, В.А. Богатырев

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЛОНОВОДНОЙ
МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA*
КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТА В
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Учебно-методическое пособие для студентов биологического
факультета, обучающихся по направлению
«06.03.01 - Биология (Бакалавриат)»

Саратов – 2017

Чумаков Д.С., Голубев А.А., Коннова С.А., Богатырев В.А.

Использование солоноводной микроводоросли *Dunaliella salina* как тест-объекта в токсикологических исследованиях: Учеб. - метод. пособие для студентов биол. фак., обучающихся по направлению «06.03.01 - Биология (Бакалавриат)» / Чумаков Д.С., Голубев А.А., Коннова С.А., Богатырев В.А. – Саратов, 2017. – 29 с.: ил.

В пособии изложены базовые навыки работы с суспензионными культурами микроводорослей при проведении токсикологических экспериментов. Пособие предназначено для студентов старших курсов, специализирующихся в области биохимии и биофизики, для магистрантов, аспирантов, учителей и научных работников.

Пособие подготовлено в Учебно-научном центре физико-химической биологии СГУ имени Н.Г. Чернышевского и ИБФРМ РАН, в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН

Публикуется по рекомендации Ученого совета биологического факультета СГУ имени Н.Г. Чернышевского и Ученого совета ИБФРМ РАН

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 6-04-00520)

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

УДК 577.336

© Чумаков Д.С., Голубев А.А., Коннова С.А., Богатырев В.А. 2017

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ТЕМА 1. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ <i>D.SALINA</i>	6
Работа 1. Приготовление культуральной среды.....	6
ТЕМА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЧИСЛОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ В КУЛЬТУРАХ <i>D.SALINA</i>	7
Работа 2. Фотометрические измерения поглощения хлорофилла в суспензиях культур <i>D.salina</i>	7
Работа 3. Фотометрические измерения поглощения хлорофилла в экстрактах культур <i>D.salina</i>	10
Работа 4. Определение числовой концентрации клеток в культурах <i>D.salina</i>	11
ТЕМА 3. ПОДДЕРЖАНИЕ И МОНИТОРИНГ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУРЫ <i>D.SALINA</i>	15
Работа 5. Поддержание культуры.....	15
Работа 6. Микроскопический контроль морфофизиологического состояния культуры....	16
Работа 7. Фотометрический контроль физиологического состояния культуры.....	16
ТЕМА 4. ПОСТАНОВКА ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....	17
Определение диапазона тестируемых концентраций токсикантов и приготовление концентрационных рядов.....	17
Работа 8. Постановка токсикологического эксперимента с пероксидом водорода.....	18
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	23
Приложение 1. Ожидаемые результаты в работах 2-3.....	23
Приложение 2. Ожидаемые результаты в работе 4.....	24
Приложение 3. Ожидаемые результаты в работах 6-7.....	25
Приложения 4 Ожидаемые результаты в работе 8.....	28
Список использованной литературы.....	29

ВВЕДЕНИЕ

Биотестирование представляет собой оценку токсичности тех или иных поллютантов с использованием тест-объектов. Данный метод является одним из основных в водной токсикологии [1]. Микроводоросли различных видов представляют собой значимую группу тест-объектов, поскольку они достаточно чувствительны к загрязнению среды и играют важную роль в биотическом круговороте, являясь важнейшим источником органического вещества в водных экосистемах [2]. Во многих странах мира одноклеточные водоросли включены в процедуру биотестирования, а проведение токсикологических исследований с данными организмами регламентируется специальными документами [3, 4].

Важным в экотоксикологических исследованиях является понятие тест-функции. Под тест-функциями понимают различные критерии, используемые в биотестировании для характеристики отклика тест-объекта на действие токсиканта. Непосредственным показателем благополучия организма является его выживаемость. Определение живых и мертвых клеток в культурах микроводорослей при воздействии токсикантов можно проводить с использованием флуоресцентной микроскопии, а также различными цитохимическими методами [2]. К критериям токсичности для культур одноклеточных водорослей можно также отнести визуальные изменения состояния культуры, изменения рН среды, численности клеток, скорости роста культуры, подвижности клеток, содержания фотосинтетических пигментов, интенсивности фотосинтеза и т.д. Некоторые из перечисленных тест-функций можно регистрировать несколькими способами; к таковым относится в частности содержание хлорофилла, которое можно оценивать спектрофотометрическим и флуориметрическим методами.

На ход протекания токсикологического эксперимента с культурами микроводорослей оказывают влияние многие факторы. Условно их можно разделить на две группы. К первой относят факторы внешнего воздействия на систему, связанные с условиями культивирования, а ко второй – факторы, связанные с непосредственным состоянием самих клеток. Влияние освещенности и температуры относят к факторам внешнего воздействия. Недостаточное освещение культур тормозит их рост в контрольных пробах, что снижает адекватность сравнения их с экспериментальными. Повышение температуры выше 25 °С, как правило, усиливает воздействие токсикантов, а снижение до 12-15 °С – ослабляет. К факторам, ассоциированным с состоянием собственно культуры, относят степень ее синхронизации, фазу жизненного цикла клеток и посевную плотность. Наиболее чувствительны к воздействию токсиканта клетки, находящиеся в экспоненциальной и ранней стационарной фазах роста, так как подготовка и реализация репродуктивных процессов снижает их адаптационные возможности. С увеличением посевной плотности токсическое действие вещества ослабляется поскольку уменьшается его концентрация и может снижаться биодоступность. Синхронизация культуры позволяет повысить ее однородность и чувствительность к токсиканту за счет увеличения количества клеток, находящихся на одной стадии жизненного цикла [2].

Классическая постановка токсикологического эксперимента с микроводорослями предполагает использование колб Эрленмейера для экспозиции клеток с поллютантом. Более эффективной альтернативой является использование для этих целей микропланшетов на 96 лунок. Каждая лунка микропланшета в этом случае представляет собой культивационную емкость с контролируемыми параметрами. Подобные миниатюризированные тесты обладают рядом преимуществ: уменьшение объема образцов, увеличение числа повторностей, уменьшение риска контаминаций за счет использования одноразовой посуды, снижение времени постановки эксперимента [5]. Было также показано, что данные, полученные в результате экспериментов с

микропланшетными системами, хорошо согласуются с результатами традиционных “колбовых” тестов [6].

В биотестировании используются как пресноводные, так и солоноводные виды микроводорослей. В частности, в качестве тест-объектов применяются представители цианобактерий (*Anabaena flos-aquae*, *Synechococcus leopoliensis*), диатомовых водорослей (*Skeletonema costatum*, *Navicula pelliculosa*) и зеленых микроводорослей (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus subspicatus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*). Могут быть использованы и другие виды микроводорослей при условии, что они проявляют чувствительность к действию токсиканта и являются представительными для своего трофического уровня.

В частности, интересным тест-объектом является экстремофильная одноклеточная солоноводная водоросль *Dunaliella salina*. Представители данного вида являются основными и зачастую единственными автотрофными продуцентами в трофических цепях экосистем гипергалинных водоемов, а также обладают биотехнологической ценностью [7]. Наряду с этим токсиколого-диагностическую значимость данного вида обуславливает устойчивость микроводорослей ко многим неблагоприятным факторам окружающей среды, уникальность строения (отсутствие плотной клеточной стенки [8]) и высокая скорость роста в культурах. В ряде работ водоросли рода *Dunaliella* использовались в качестве тест-объектов для оценки токсичности различных поллютантов: пестицидов [9], детергентов [10], квантовых точек [11], серебряных [12] и золотых наночастиц [13].

В настоящем пособии рассматривается микропланшетная токсикологическая тест-система с использованием микроводоросли *D. salina* в качестве объекта. Краткая характеристика тест-системы приведена в таблице 1. В пособии изложены некоторые аспекты, касающиеся работы с суспензионными культурами *D. salina* (приготовление культуральной среды, определение числовой концентрации клеток при посеве, поддержание культуры, мониторинг физиологического состояния) и дизайна токсикологического эксперимента (приготовление концентрационных рядов токсикантов, фотометрические и флуоресцентно-микроскопические измерения, расчет токсикометрических параметров).

Таблица 1.

Краткая характеристика токсиколого-диагностической тест-системы

Тест-объект	<i>D. salina</i>
Длительность токсикологического эксперимента	48-часовой хронический эксперимент
Формат проведения эксперимента	В 96-луночном плоскодонном планшете
Общий объем содержимого в лунке	200 мкл
Плотность клеток при посеве	10^6 кл \times мл ⁻¹ .
Культуральная среда	Среда Ven-Amotz [14]
Режим освещения	Непрерывное освещение люминесцентными лампами, создающими поток фотонов 80-100 мкмоль \times м ⁻² \times с ⁻¹
Поддерживаемая температура	23 \pm 2 °С
Регистрируемые тест-функции	Содержание хлорофилла, соотношение числа живых и мертвых клеток
Определяемые токсикометрические параметры	Полулетальная концентрация (LC50 ₄₈) и полуэффективная концентрация (EC50 ₄₈) токсиканта

ТЕМА 1. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *D.SALINA*

Работа 1. Приготовление культуральной среды

Под термином “культуральная среда” понимается искусственная питательная смесь, предназначенная для выращивания микроводорослей. Она представляет собой водный раствор солей, содержащий все необходимые для микроводорослей элементы минерального питания в необходимых соотношениях. Правильный подбор культуральной среды очень важен для обеспечения интенсивного деления клеток и, как следствие, быстрого роста культуры в контрольных пробах в условиях токсикологического эксперимента.

К физиологически значимым минеральным элементами относятся N, S, P, Na, K, Ca, Mg, Cl, Fe, Cu, Co, Mn, Mo, Zn, B и ряд других. Ознакомиться с функциональным значением некоторых из них можно в соответствующей литературе [15]. Для культивирования микроводоросли *D. salina* применяют среду Ben-Amotz [14] с незначительными модификациями. Она включает в себя все основные макро- и микроэлементы. Поскольку *D. salina* является галофитом в среду добавляется NaCl, который выступает в роли, как источника минеральных элементов, так и осмотически активного вещества. Она обладает высокой пластичностью по отношению к солености и может сохранять жизнеспособность и наращивать биомассу в средах с 0,5 – 4 М содержанием NaCl [12]. Одним из управляющих ростом культуры факторов является NaHCO₃, который служит источником углерода для микроводорослей. Необходимость добавления гидрокарбоната натрия обусловлена низкой растворимостью углекислого газа в растворах с высокой соленостью, что препятствует его фиксации фотоавтотрофами, которыми являются представители вида *D. salina*.

Принцип метода.

Готовится на дистиллированной воде культуральная среда Ben-Amotz следующего состава: NaCl, 1,5 М; NaHCO₃, 50 мМ; MgSO₄ × 7H₂O, 5 мМ; KNO₃, 5 мМ; CaCl₂ × 2H₂O, 0,3 мМ; K₂HPO₄ × 3H₂O, 0,2 мМ; ЭДТА, 30 мкМ; MnSO₄ × 5H₂O, 7 мкМ; FeCl₃, 2 мкМ; CuCl₂, 1 мкМ; ZnSO₄ × 7H₂O, 1 мкМ; CoSO₄, 1 мкМ; (NH₄)₂MoO₄, 1 мкМ; pH 9. Растворы микроэлементов и макроэлементов готовятся отдельно. Перед инокуляцией водорослей среду необходимо профильтровать через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Материалы и оборудование:

NaCl (ч., ДИА-М, Россия); NaHCO₃ (р., Sigma-Aldrich, США); MgSO₄ × 7H₂O (ч., ДИА-М, Россия); CaCl₂ × 2H₂O (ч., ЭКРОС, Россия); K₂HPO₄ × 3H₂O (ч., ЭКРОС, Россия); KNO₃ (р., Panreac, Испания); ЭДТА (р., Bio-Rad, США); FeCl₃; MnSO₄ × 7H₂O; CuCl₂; ZnSO₄ × 7H₂O; CoSO₄; (NH₄)₂MoO₄; дистиллированная вода; шпатели; весы с точностью 0,01 г; весы с точностью 0,0001 г; пластиковые пробирки на 2 мл; пластиковая пробирка на 50 мл; одноканальная автоматическая пипетка на 1 мл; колба Эрленмейера на 500 мл; мерный цилиндр на 1000 мл; магнитная мешалка с подогревом; магнитик в хемотермостойкой оболочке, фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США).

Ход работы

Приготовление раствора микроэлементов

1. Взвесить и перенести в пластиковую пробирку объемом 50 мл: 16,25 мг FeCl_3 ; 84 мг $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 67,5 мг CuCl_2 ; 143,5 мг $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 77,5 мг CoSO_4 и 98 мг $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$.
2. Внести в пробирку 50 мл дистиллированной воды.

Приготовление раствора макроэлементов

3. Взвесить и перенести в колбу Эрленмейера: 43,5 г NaCl и 2,1 г NaHCO_3 .
4. Взвесить и перенести в колбу 615 мг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и 250 мг KNO_3 .
5. Перенести в колбу 500 мл дистиллированной воды мерным цилиндром.
6. В три пробирки объемом 2 мл взвесить по: 22,5 мг $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 22,5 мг $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 5 мг ЭДТА.
7. Внести в каждую пробирку по 1 мл дистиллированной воды и перемешать пипетированием до растворения содержимого.
8. Перенести содержимое каждой пробирки в основной раствор в колбе.
9. Перемешать содержимое колбы на магнитной мешалке при максимальных оборотах и подогревом до растворения содержимого.

Смешивание растворов

10. Перемешать содержимое пробирки с раствором микроэлементов интенсивным ручным встряхиванием.
11. Перенести 500 мкл раствора микроэлементов в колбу. Перемешивать еще 5 минут.
12. Готовую среду следует хранить в холодильнике при 4 °С.

ТЕМА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА И ЧИСЛОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРАХ *D.SALINA*

Работа 2. Фотометрические измерения поглощения хлорофилла в суспензиях культур *D.salina*

Определение содержания фотосинтезирующих пигментов-хлорофиллов является одним из важных методов оценки токсического действия веществ на микроводоросли [2]. Основная идея, лежащая в основе данного метода, заключается в том, что при воздействии токсиканта интенсивность размножения клеток снижается по сравнению с контрольными образцами, где микроводоросли характеризуются сбалансированным ростом. Это снижение проявляется в разнице содержания хлорофилла между пробами, которая может быть зарегистрирована фотометрически. Стандартным способом определения содержания хлорофилла в клетках микроводорослей является фотометрическое измерение поглощения ацетоновых и спиртовых экстрактов [16]. Наряду с этим существует возможность неdestructивного мониторинга количества хлорофилла *in vivo*. Такой подход обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционной схемой: снижение временных затрат на манипуляцию, а также возможность многократного анализа образца. Сложность реализации данного подхода обуславливается двумя факторами: трудно контролируемым вкладом светорассеяния и отличием коэффициентов экстинкции хлорофилла, определяемых *in vitro* и *in vivo* [17].

Принцип метода.

В данной работе описывается фотометрический способ определения содержания хлорофилла *in vivo* в суспензиях серии разведений культуры *D. salina* в микроплашетной системе и обработка полученных данных. В основе метода лежит измерение высоты пика поглощения хлорофилла в красной области при длине волны 680 нм, скорректированного на величину неселективного ослабления по значениям ближайших локальных минимумов 640 и 740 нм. Расчет данного оптического параметра производится по формуле: $A_{680} = (E_{680} - E_{740}) - (E_{640} - E_{740}) \times 0,6$.

Материалы и оборудование:

Культуральный сосуд с накопительной 3-дневной суспензионной культурой микроводоросли *D. salina*; культуральная среда Ben-Amotz; автоматическая одноканальная пипетка на 200 мкл; плоскодонный 96-луночный планшет (Biofil, Китай); планшетный спектрофотометр Spark 10M (Tecan, Австрия); программа Microsoft Excel.

Ход работы

Приготовление серии разведений культуры *D. salina*

1. Перемешать накопительную суспензионную культуру пипетированием.
2. В лунки A1-A3 96-луночного планшета одноканальной пипеткой внести по 200 мкл суспензии исходной культуры. В лунках блока B1-D3 развести исходную культуру в 2, 4 и 8 раз средой Ben-Amotz таким образом, чтобы конечный объем в каждой лунке составил 200 мкл. Каждое разведение делать в трех повторностях. Протокол разведений приведен в таблице 2.

Таблица 2

Протокол разведений суспензий *D. salina*

Наименование лунок	Вносимый объем суспензии исходной культуры <i>D. salina</i> , мкл	Вносимый объем культуральной среды Ben-Amotz
A1-A3	200	0
B1-B3	100	100
C1-C3	50	150
D1-D3	25	175

Спектрофотометрические измерения суспензий культур *D. salina*

3. Поместить планшет в спектрофотометр.
4. Провести регистрацию спектров экстинкции в режиме кинетики сканирования (KinScan) после 7-минутной темновой паузы в диапазоне длин волн 400-800 нм с шагом 1 нм, спектральной шириной щели 3,5 нм, тремя циклами с 3-х минутным интервалом.

Обработка результатов спектрофотометрических измерений суспензий культур *D. salina*

Результаты измерений представлены в формате рабочего листа в книге Excel, состоящего из n таблиц, соответствующих каждой измеряемой лунке планшета. В каждой таблице в 401 строках, соответствующих длинам волн в 3 колонках (3 цикла измерений) записаны значения экстинкции. Кроме блока данных каждая таблица в рабочей области содержит пять служебных строк, в которых записаны: 1) обозначения – лунка/длина волны; 2) обозначение лунки и номера последовательных измерений; 3) время от начала

измерений (с); 4) температура (°C); 5) пустая строка в конце блока. Таким образом, вся таблица занимает 406 строк.

5. В колонке E, справа от значимых колонок вычислить среднее значение по временам измерений $E_i = \text{CPЗНАЧ}(B_i; D_i)$, где i- номер строки соответствующей длине волны контрольной точки.
6. В той же колонке вычислить среднее значение по 5 длинам волн в окрестностях контрольных точек: 640, 680 и 740 нм: $E_{i+3} = \text{CPЗНАЧ}(E_{i-2}; E_{i+2})$.
7. Во второй служебной строке “обозначение лунки и номера последовательных измерений” в колонке E вычислить значение поглощения хлорофилла A_{680} по формуле: $A_{680} = (E_{680} - E_{740}) - (E_{640} - E_{740}) \times 0,6$.
8. Выделить всю расчетную колонку таблицы вместе со всеми служебными строками и способом автозаполнения сформировать расчет результатов по всем таблицам листа.
9. Построить матрицу соответствия. Матрица соответствия представляет собой таблицу, которая отображает дизайн эксперимента в планшете. В верхней части листа справа от колонок со служебной информацией построить таблицу, в которой буквами A-D обозначить ряды, а цифрами 1-3–колонки.
10. Заполнить первые две ячейки таблицы буквой E и номером второй служебной строки “обозначение лунки и номера последовательных измерений”. В нашем случае это E42 и E448. Далее посредством автозаполнения сформировать расчет номера ячейки для всей таблицы.
11. Выделить рабочую область таблицы и командой поиска (Ctrl+F) заменить «E» на «=E». Если переадресация выполнена правильно, то отображенные значения совпадают с обозначениями строк и столбцов.

На рисунке 1 представлен внешний вид таблицы с результатами фотометрических измерений.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
28	Interval time				00:03:00								
29													
30	Mode	Absorbance											
31	Wavelength start	400 nm											
32	Wavelength end	800 nm											
33	Wavelength step size	1 nm											
34	Number of flashes	1											
35	Settle time	0 ms											
36	Part of Plate	A1-H3;A7-H9											
37													
38	Start Time	2016-11-29 15:06:32											
39													
40	Label 1												
41	Well / Wavelength				0,314213	C K2Cr2O7 мг/л			A680 1	A680 2	A680 3	M	SD
42	A1	1	2	3	0,023519	100	A		0,023519	0,024489	0,023666	0,023891	0,000523
43	Time [s]	0	180,053	360,059	0,333748	80	B		0,024291	0,029156	0,023217	0,025555	0,003165
44	Temp. [°C]	28,53	28,42	28,38	0,304252	60	C		0,024191	0,029236	0,025035	0,026154	0,002702
45	400	0,995436	0,992341	0,995298	0,994359	40	D		0,029978	0,032882	0,027686	0,030182	0,002604
46	401	0,95586	0,95678	0,953741	0,95546	20	E		0,033424	0,034008	0,032921	0,033451	0,000544
47	402	0,919046	0,914452	0,917943	0,917147	10	F		0,041786	0,043919	0,042109	0,042604	0,00115
48	403	0,885196	0,876781	0,878615	0,880198	5	G		0,049517	0,052052	0,051006	0,050858	0,001274
49	404	0,840098	0,840373	0,841015	0,840495		H		0,046249	0,048921	0,045899	0,047023	0,001653
50	405	0,809788	0,811003	0,807728	0,809506								
51	406	0,783514	0,780546	0,782226	0,782095								
52	407	0,757851	0,753578	0,756793	0,756074	C K2Cr2O7 мг/л			Eff 1	Eff 2	Eff 3	M	SD
53	408	0,731227	0,729311	0,729167	0,729902	100	A		49,14711	49,94228	48,43911	49,17617	0,752005
54	409	0,703865	0,704829	0,703079	0,703924	80	B		47,47758	40,40093	49,41675	45,76508	4,745602
55	410	0,686419	0,68407	0,686416	0,685635	60	C		47,69354	40,23784	45,45572	44,46237	3,82582
56	411	0,664254	0,661644	0,663985	0,663294	40	D		35,18035	32,78578	39,68105	35,88239	3,500835
57	412	0,649311	0,647	0,647794	0,648035	20	E		27,73043	30,48386	28,27435	28,82955	1,458258
58	413	0,636235	0,632003	0,633169	0,633802	10	F		9,65079	10,22524	8,258285	9,378105	1,011433
59	414	0,623879	0,620245	0,621877	0,622	5	G		-7,06612	-6,40059	-11,1269	-8,19785	2,55832

Рисунок 1 – Внешний вид таблицы Excel с результатами фотометрических измерений в режиме KinScan

Работа 3. Фотометрические измерения спиртовых экстрактов культур *D. salina*

Принцип метода.

Данная работа посвящена определению содержания хлорофилла *a* в спиртовых экстрактах той же серии разведений. Экстракцию проводят этиловым спиртом в колонках. В качестве оптического параметра, характеризующего количество хлорофилла, используется высота пика поглощения экстракта, выражающаяся как $A_{665}-A_{725}$. Результаты спектрофотометрических измерений суспензий живых водорослей *D. salina* коррелируют с результатами измерений спиртовых экстрактов тех же культур.

При проведении токсикологических экспериментов с бесцветными поллютантами удобно использовать неdestructивный оптический мониторинг культур *D. salina*. Условием применимости данного протокола является монотонный вид спектральной функции поглощения в области 650-750 нм. В противном случае, если на спектральной кривой выделяется пик в этой области, имеет место оптическая интерференция, что, например, характерно для сосуспензий коллоидного золота и серебра. В этом случае для оценки содержания хлорофилла в экспериментальных и контрольных пробах предпочтительнее использовать традиционную технологию его определения в экстрактах.

Материалы и оборудование:

Культуральный сосуд с накопительной 3-дневной суспензионной культурой микроводоросли *D. salina*; культуральная среда Ben-Amotz; автоматическая одноканальная пипетка на 200 мкл; этанол 80% v/v; центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия); пластиковые пробирки на 2 мл (12 штук); пробирки для ПЦР на 0,7 мл (12 штук); ножницы; препаровальная игла; пробойник; микроволоконные стеклянные фильтры GF/F (Whatman, Великобритания); плоскодонный 96-луночный планшет (Biofil, Китай); планшетный спектрофотометр Spark 10M (Tecan, Австрия); программа Microsoft Excel.

Ход работы

Изготовление колонок для экстракции

1. Препаровальной иглой проколоть крышку и дно ПЦР-пробирки (сепарационная пробирка).
2. Ножницами отрезать крышку у пробирки на 2 мл (коллекторная пробирка).
3. Пробойником вырезать кусочек фильтра GF/F диаметром 9 мм.
4. Рукояткой препаровальной иглы аккуратно уложить полученный фильтр на дно сепарационной пробирки.
5. Поместить сепарационную пробирку внутрь коллекторной пробирки.
6. По аналогичной схеме изготовить еще 11 колонок.
7. На каждой колонке обозначить маркером номер соответствующей лунки планшета.

Проведение экстракции

8. Перемешать содержимое каждой лунки блока A1-D3 пипетированием.
9. Отобрать из каждой лунки 200 мкл и перенести в сепарационную пробирку соответствующей колонки.
10. Осадить суспензии клеток в колонках центрифугированием при 800 об/мин, 5 минут.
11. Остаток среды выжать краткосрочным центрифугированием (short spin) при 13000 об/мин, 30 секунд.

12. Удалить среду из коллекторных пробирок всех колонок.
13. Добавить в сепарационную пробирку каждой колонки по 100 мкл этанола.
14. Центрифугировать при 1200 об/мин, 5 минут.
15. Провести краткосрочное центрифугирование (short spin) при 13000 об/мин в течение 30 секунд.
16. Повторить 2 раза шаги 13-15.
17. Перенести по 200 мкл экстрактов из коллекторных пробирок всех колонок в соответствующие лунки планшета.

Спектрофотометрические измерения экстрактов культур *D. salina*

18. Провести регистрацию спектров экстинкции в режиме однократного сканирования в диапазоне длин волн 400-800 нм с шагом 1 нм и спектральной шириной щели 3,5 нм.

Обработка результатов спектрофотометрических измерений спиртовых экстрактов культур *D. salina*

Результаты измерений представлены в формате рабочего листа в книге Excel в виде таблицы со значениями экстинкции для каждой лунки планшета (столбцы) и каждой из регистрируемых длин волн (строки). Необходимые для идентификации лунок и расчета оптического параметра строки имеют номера 33 (содержит номера измеренных лунок планшета), 299 (содержит значения экстинкции для $\lambda=665$ нм) и 359 (содержит значения экстинкции для $\lambda=725$ нм).

19. Скопировать строки 33, 299 и 359 и вставить их в нижней части листа так, чтобы они располагались одна над другой.
20. Под скопированной нижней 359 строкой сформировать расчетную строку. Для этого в первой ячейке этой строки рассчитать высоту пика поглощения хлорофилла *a* в лунке A1: $A_{665-725}=A_{665}-A_{725}$ и способом автозаполнения сформировать расчет результатов по всей строке для всех лунок.
21. Построить матрицу соответствия по принципу, описанному в шаге 9 протокола «Фотометрические измерения суспензий культур *D. salina* и обработка полученных данных»

Работа 4. Определение числовой концентрации клеток в культурах *D. salina*

Величина посевной дозы клеток микроводорослей оказывает большое влияние на ход и результаты токсикологического эксперимента. В одной из высокоцитируемых работ на эту тему на примере микроводорослей *Selenastrum capricornatum* и *Chlorella sp.* показано, что в 72-часовом эксперименте токсичность меди снижалась более чем в 2 раза при увеличении исходной плотности клеток с 10^2 до 10^5 кл/мл [18]. Подобные эффекты могут быть связаны как с уменьшением концентрации токсиканта, так и с изменением его свойств и свойств культуральной среды за счет взаимодействия с экссудатами микроводорослей и изменения значения pH. Согласно рекомендациям OECD [4] токсикологические эксперименты предлагается проводить при плотности клеток в диапазоне от 10^3 - 10^5 кл \times мл $^{-1}$. Тем не менее, надо учитывать, что при низких посевных плотностях не всегда возможно провести воспроизводимый эксперимент. Традиционным способом оценки числовой концентрации клеток в культурах микроводорослей является подсчет в специальных счетных камерах: Нажотта (0,01 мл); Горяева (0,9 мл) и других [2].

Принцип метода.

В настоящей работе описывается способ определения числовой концентрации клеток в сериях разведений культуры микроводоросли *D. salina* непосредственно в лунках микропланшета. Клетки химически фиксируют глутаровым альдегидом. Затем с помощью инвертированного микроскопа получают микроскопические изображения дна лунок в режиме флуоресценции. При облучении микроводорослей актиничным синим светом живые клетки флуоресцируют красным. Обработку полученных изображений и автоматический подсчет клеток по заданным геометрическим параметрам осуществляют в программе ImageJ. Расчет числовой концентрации клеток проводится с использованием коэффициента, полученного исходя из геометрических параметров лунки планшета и степени разведения. Проведя предварительные фотометрические измерения суспензий культур можно построить зависимость оптического параметра A_{680} от числовой концентрации клеток для быстрой оценки величины посевной дозы во всех последующих экспериментах. В данной работе не приводится подробное описание технических особенностей эксплуатации микроскопа и цифровой камеры. Для более глубокого ознакомления рекомендуется обратиться к учебно-методическому пособию Прилепского А.Ю. и соавторов [19].

Материалы и оборудование:

Культуральный сосуд с накопительной 3-дневной суспензионной культурой микроводоросли *D. salina*; профильтрованная культуральная среда Ben-Amotz; автоматическая одноканальная пипетка на 200 мкл; плоскодонный 96-луночный планшет (Biofil, Китай); планшетный спектрофотометр Spark 10M (Tecan, Австрия); глутаровый альдегид 25 % v/v (Electron Microscopy Science, США); инвертированный микроскоп DMI 3000 (Leica, Германия); цифровая камера DFC-450 (Leica, Германия); программы Leica Application Suite, Microsoft Excel и ImageJ.

Ход работы

Приготовление серии исходных разведений культуры *D. salina*

1. См. шаги 1-2 работы “Фотометрические измерения суспензий культур *D. salina* и обработка полученных данных”.

Спектрофотометрические измерения суспензий культур *D. salina*

2. См. шаги 3-4 работы “Фотометрические измерения суспензий культур *D. salina* и обработка полученных данных”.

Дополнительные разведения культур *D. salina*

3. Внести в каждую лунку блока A7-D9 по 180 мкл культуральной среды Ben-Amotz.
4. Развести каждую из исходных проб в 10 раз с целью уменьшения количества клеток в поле зрения и удобства их последующего подсчета на микроскопических изображениях. Редиспергировать суспензии в лунках пипетированием.
5. Перенести из каждой лунки блока A1-D3 по 20 мкл суспензии в соответствующие лунки блока A7-D9.

Фиксация клеток

6. Добавить в каждую лунку блока A7-A9 по 10 мкл 25 % глутарового альдегида (примечание: все операции с глутаровым альдегидом проводить в вытяжном шкафу).
7. Выдержать планшет в холодильнике при +4 °C в течение 2 часов.

Получение микроскопических флуоресцентных изображений

8. Поместить планшет на предметный столик микроскопа.
9. Выбрать объектив с увеличением $\times 20$.

10. Добиться равномерного освещения поля зрения и четкого изображения образца в фазово-контрастном режиме.
11. Включить блок флуоресценции.
12. Выбрать на револьвере цифру 2, соответствующую светофильтру D. Данный светофильтр соответствует диапазону длин волн возбуждения (350-470 нм) и эмиссии (650-700 нм) флуоресценции хлорофилла.
13. Перекрыть световой поток шторкой и открыть затвор флуоресценции.
14. Открыть затвор камеры, настроить значение экспозиции в программе Leica Application Suite (400-500 мс) и выполнить захват центра дна каждой из лунок.

Обработка и подсчет клеток в программе ImageJ

15. Открыть в программе **ImageJ** изображение, требующее обработки.
16. Дублировать изображение. Нажать на него правой кнопкой мыши и выбрать **Duplicate**.
17. Разделить изображение на цветовые каналы. Во вкладке Image выбрать пункт **Color** и опцию **Split channels**. Изображение будет разделено на красный, зеленый и синий каналы. Работать далее с красным каналом.
18. Бинаризовать изображение. Во вкладке **Process- Binary** выбрать опцию **Make it binary**.
19. Клетки, располагающиеся близко друг к другу могут сливаться в единые агрегаты после обработки. Для разделения этих агрегатов воспользоваться опцией **Watershed** во вкладке **Process-Binary**.
20. Во вкладке Analyze выбрать опцию **Analyze particles**. В меню инструмента выставить следующие настройки: **Size pixel: 50-2000, circularity 0,1-1, display outlines**. Поставить галочки в пунктах: **Display results, Summarize** и **Include notes**. Нажать **ОК**.
21. Оценить графический отчет анализа на предмет соответствия исходному изображению.

На рисунке 2 представлены примеры изображений, полученных в программе ImageJ в результате обработки флуоресцентного изображения культуры *D. salina*. Буквой А обозначено исходное изображения, полученное при помощи цифровой камеры. Буквой Б обозначено бинаризованное изображение, полученное в результате выполнения операций, описанных в шаге 18. Буквой В обозначен графический отчет о количестве и размерах клеток, полученный в результате операций, описанных в шаге 20.

Расчет числовой концентрации клеток

Площадь дна лунки планшета Biofilm составляет 32,2 мм², а общий объем суспензии в ней 0,2 мл. Размер кадра для камеры составляет 0,615×0,46 мм. То есть, площадь кадра равна 0,2829 мм². Таким образом, площадь дна лунки больше площади кадра в 114 раз. Поскольку при химической фиксации все клетки располагаются на дне, можно утверждать, что 1 клетка в кадре эквивалентна 114 клеткам в масштабе всей лунки. Коэффициент 114 необходимо умножить на 10, так как исходные пробы разводились в 10 раз, и на 5, так как числовая концентрация клеток определяется в пересчете на 1 мл: 114×10×5= 5700.

22. Рассчитать числовую концентрацию клеток *D. salina* в пробе по формуле: $NC = 5700 \times N_{vis}$, где NC – числовая концентрация, кл ×мл⁻¹, 5700 – коэффициент пересчета, N_{vis} – количество объектов в поле зрения.

Построение калибровочного графика

23. Построить зависимость оптического параметра A_{680} (поглощения суспензий культур *D. salina* в красной области) от числовой концентрации клеток.

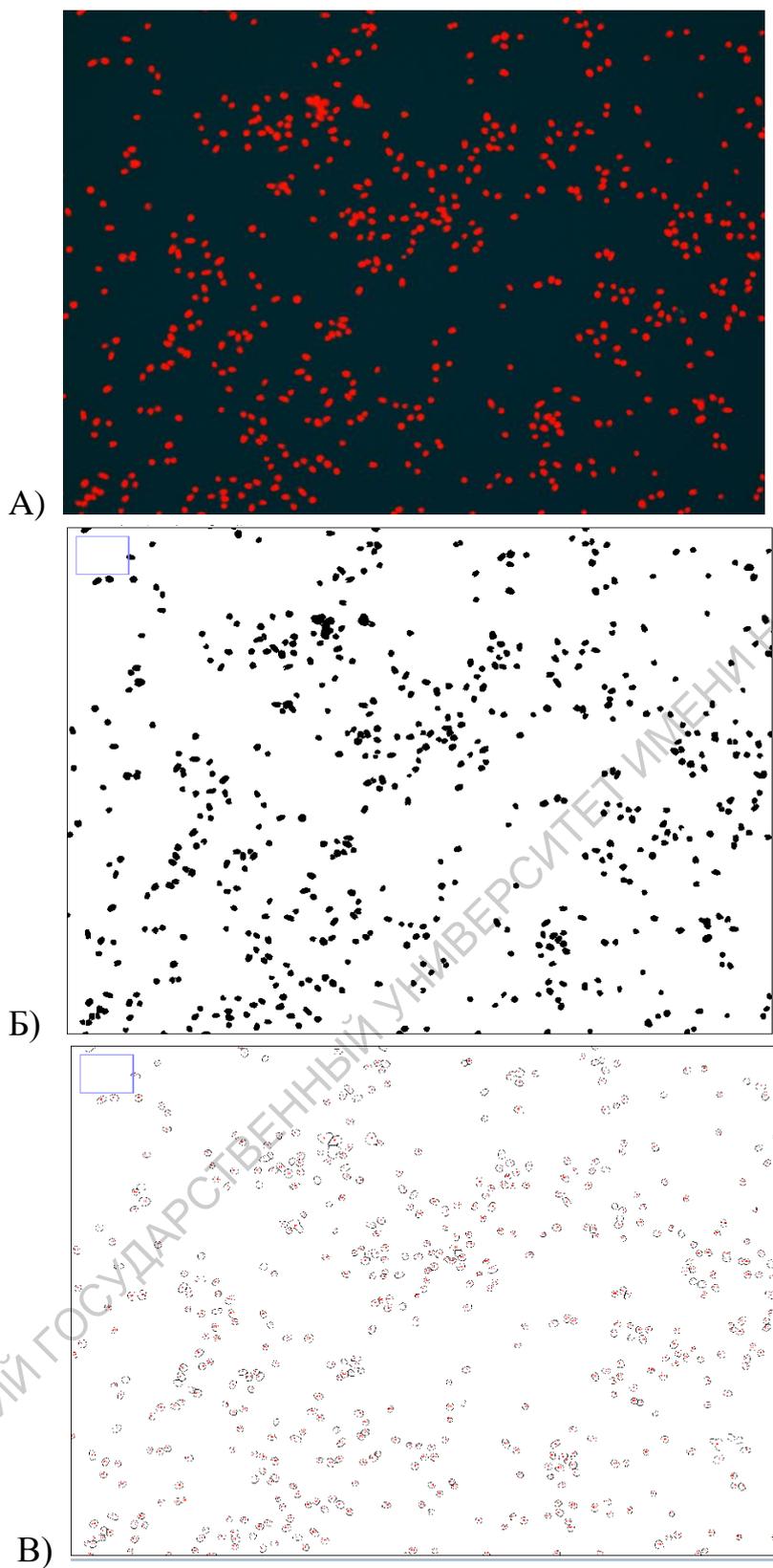


Рисунок 2 – Этапы обработки флуоресцентного изображения в ImageJ. А) исходное изображение, Б) бинаризованное изображение, В) графический отчет автоматического подсчета клеток на изображении.

ТЕМА 3 ПОДДЕРЖАНИЕ И МОНИТОРИНГ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУРЫ *D.SALINA*

Работа 5. Поддержание культуры

Принцип метода.

В данной работе описан процесс поддержания суспензионной культуры *D. salina*. Каждые 3-4 дня для сохранения жизнеспособности и повышения однородности культуру следует пересевать на свежую среду в 6-луночный планшет. Для получения частично синхронизированной культуры следует осуществить как минимум 2-3 пересева. Для получения накопительной культуры, пригодной для эксперимента, необходимо пересевать частично синхронизированную культуру в сосуд для культивации. Бактериальная контаминация не оказывает существенного влияния на темпы роста альгологически чистых культур, поэтому работа с культурами *D. salina* не требует стерильных условий.

Материалы и оборудование:

Культуральная среда Ven-Amotz; культура *D. salina*; пластиковые пробирки на 50 мл; фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США); лабораторные стаканы; 6-луночный планшет (Biofil, Китай); одноканальная автоматическая пипетка на 5 мл; одноканальная автоматическая пипетка на 1 мл; ламинарный шкаф; две люминесцентные лампы ЛЛ-12/16 Вт (IEK, Россия); инкубатор (Solent Scientific, Великобритания); емкости с дистиллированной водой объемом 500 мл; ртутный термометр.

Ход работы

1. Вынуть колбу с культуральной средой Ven-Amotz из холодильника. Отлить 50 мл среды в пластиковую пробирку.
2. Выдержать пробирку со средой в течение 20-30 минут при комнатной температуре.
3. Профильтровать среду через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.
4. Внести в лунку планшета 5 мл культуральной среды.
5. Внести в лунку планшета 500 мкл суспензионной культуры *D. salina*.
6. Культивировать в ламинарном шкафу при постоянном освещении двумя люминесцентными лампами, создающими поток фотонов $80-100 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Расстояние от крышки планшета до ламп должно составлять 10-11 см. Поддерживаемая температура воздуха должна составлять $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Мониторинг температуры осуществлять ртутным термометром, который помещается рядом с планшетом. При температуре воздуха в ламинарном шкафу ниже $20 \text{ }^\circ\text{C}$ необходимо включить прогрев инкубатором. С целью увлажнения воздуха в ламинарный шкаф также помещают две емкости с дистиллированной водой.
7. Каждые 3-4 дня пересевать культуру в новую лунку. Вносить в нее 500 мкл суспензии из предыдущей лунки и 5 мл профильтрованной культуральной среды Ven-Amotz. Осуществить как минимум два пересева.
8. Перенести в лабораторный стакан 50 мл среды.
9. Внести в тот же стакан для культивации *D. salina* 5 мл суспензии из лунки с наиболее молодой культурой.

Работа 6. Микроскопический контроль морфофизиологического состояния культуры

Принцип метода.

При поддержании культуры необходимо периодически осуществлять мониторинг ее морфофизиологических характеристик. В токсикологическом эксперименте следует использовать только физиологически активную культуру. В таблице 3 перечислены некоторые диагностические признаки, по которым можно судить о состоянии культуры *D. salina* при анализе, проведенном с использованием светового микроскопа.

Таблица 3 – Некоторые диагностические признаки морфофизиологического состояния культуры *D. salina*, доступные визуальной оценке

Состояние культуры	Диагностические признаки
Физиологически активная культура в условиях близких к оптимальным	Эллипсоидная и яйцевидная форма клеток; высокая клеточная подвижность; распределение клеток во всей толще среды; отсутствие пальмелл (большие скопления клеток).
Культура в условиях стресса	Сферическая форма клеток; низкая и полное отсутствие клеточной подвижности; расположение всех клеток на дне лунки планшета; наличие выраженных клеточных агрегатов.

Материалы и оборудование:

Культура *D. salina*, выращиваемая в 6-луночной планшете; инвертированный световой микроскоп DMI 3000 (Leica, Германия).

Ход работы

1. Поместить планшет с культурой на предметный столик микроскопа.
2. Выбрать объектив с увеличением $\times 20$
3. Добиться равномерного освещения и четкого изображения образца в фазово-контрастном режиме.
4. Оценить культуру на предмет соответствия диагностическим критериям, приведенным в таблице 3.

Работа 7. Фотометрический контроль физиологического состояния культуры

Состояние культуры можно оценить фотометрически. Для этого необходимо ее посеять в лунках 96-луночного планшета в инокуляционной дозе (порядка 10^6 кл \times мл $^{-1}$) и оценить скорость роста клеток в течение первых двух суток. Для кривой роста физиологически активной культуры характерна короткая лаг-фаза и быстрое вступление в экспоненциальную фазу роста. Скорость роста такой культуры составляет не менее одного удвоения в день в течение первых двух суток.

Материалы и оборудование:

Накопительная культура *D. salina*; культуральная среда Ben-Amotz; 96-луночный плоскодонный планшет (Biofil, Китай); одноканальная автоматическая пипетка на 200 мкл; планшетный спектрофотометр Spark-10M (Tecan, Австрия), программа Microsoft Excel.

Ход работы

1. Перенести по 200 мкл суспензии из сосуда с накопительной культурой *D. salina* в лунки А1-А3 96-луночного планшета.
2. Провести фотометрические измерения суспензий так, как описано в шагах 3-4 протокола “Фотометрические измерения суспензий культур *D. salina*”.
3. Обработать полученные данные так, как описано в шагах 5-11 работы “Фотометрические измерения суспензий культур *D. salina*”.
4. В лунках В1-В3 сделать разведения исходной культуры таким образом, чтобы значение A_{680} для каждой из них составило порядка 0,03 (что соответствует посевной дозе 10^6 кл/мл). Конечный объем в каждой лунке должен составить 200 мкл.
5. Провести фотометрические измерения суспензий культур *D. salina* в лунках В1-В3 и обработать полученные данные аналогично шагам 2 и 3.
6. Культивировать в течение 2 суток. Каждые сутки осуществлять фотометрические измерения суспензий и обработку полученных данных.
7. Рассчитать скорость роста культуры во всех лунках за каждые сутки по формуле: $\mu = 3,3(\lg N_2 - \lg N_1)/t$
где μ - скорость роста культуры, удвоения/день; N_2 – значение A_{680} культуры в конце заданного временного промежутка; N_1 – значение A_{680} в начале заданного временного промежутка; t – длительность временного промежутка, дни.
8. Оценить физиологическую активность культуры по значениям скорости ее роста.

ТЕМА 4. ПОСТАНОВКА ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Определение диапазона тестируемых концентраций токсикантов и приготовление концентрационных рядов

Корректный выбор диапазона тестируемых концентраций того или иного поллютанта в токсикологическом эксперименте определяет достоверное определение его токсикометрических характеристик. Под термином “концентрационный ряд токсиканта” понимается совокупность его тестируемых концентраций в конкретном эксперименте. В идеале приготовленный концентрационный ряд должен содержать: концентрацию токсиканта, не оказывающую эффекта на жизнедеятельность микроводорослей (НОЕС); концентрацию, оказывающую 90-100 % эффекта; несколько концентраций, оказывающих менее и более 50% уровня эффекта. Алгоритм определения любого токсикометрического параметра (LC50, EC50) обычно подразумевает использование двух тестов: диапазонного (range-finding test) и определяющего (definitive test) [5]. Данные тесты отличаются друг от друга стратегией подбора экспериментальных концентраций. Диапазонный тест направлен на выявление примерного диапазона значений действующих концентраций токсиканта. Целью определяющего теста является расчет значения токсикометрического параметра.

В зависимости от степени изученности токсиканта при постановке эксперимента можно руководствоваться следующими соображениями. При работе с эталонным токсикантом (вещество с хорошо известными токсическими свойствами) для определения EC50 обычно достаточно определяющего теста. Значения концентраций в этом случае выбирают, исходя из литературных данных. К примеру, в России в экспериментах с

микроводорослями в качестве эталонного токсиканта чаще всего используют бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$). Если при посевной плотности порядка 3×10^4 кл \times мл $^{-1}$ полученная величина показателя ЕС50 за 48 часов находится в диапазоне реагирования тест-объекта, который равен 1,3-2,5 мг/л $K_2Cr_2O_7$, культура микроводорослей пригодна для биотестирования (РД 118-02-90). При постановке определяющего теста с культурами *D. salina* при посевной дозе 10^6 кл \times мл $^{-1}$ следует приготовить следующий концентрационный ряд: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 мг/л $K_2Cr_2O_7$ (коэффициент разведения 0,5). Присутствие в данном ряду больших концентраций дихромата калия обусловлено тем, что с увеличением посевной дозы тест-объекта токсический эффект поллютанта снижается и, как следствие, значение ЕС50 возрастает.

При исследовании вещества с неизвестной токсичностью необходима предварительная постановка одного или нескольких диапазонных тестов. К примеру, при постановке эксперимента, связанного с оценкой токсичности пероксида водорода (H_2O_2) для культур *D. salina*, следует готовить первоначальный концентрационный ряд широкого диапазона: 0,1; 1; 10; 100; 1000 мг/л H_2O_2 (коэффициент разведения 10). После обработки и интерпретации результатов следует поставить определяющий тест, сузив концентрационный диапазон токсиканта: 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60 мг/л H_2O_2 .

На практике последовательность разведений при приготовлении концентрационных рядов различных поллютантов, чаще всего, ведется по принципу стоковый раствор \Rightarrow промежуточный раствор \Rightarrow тестируемый раствор.

Стоковый раствор токсиканта следует готовить на дистиллированной воде. Его концентрация должна в 10-20 раз превышать максимальную тестируемую концентрацию. Это позволяет снизить степень разведения токсикантом культуральной среды Ven-Amotz.

Затем в нескольких пробирках готовятся промежуточные растворы токсиканта таким образом, чтобы конечный объем составил 400 мкл. В каждую пробирку вносят аликвоту стокового раствора и определенное количество культуральной среды Ven-Amotz. Концентрации поллютантов в промежуточных растворах в два раза превышают тестируемые. В контрольную пробирку добавляют 400 мкл культуральной среды. Стадия приготовления промежуточных растворов позволяет сократить число операций автоматической пипеткой при разведениях и ускорить процедуру тестирования.

На стадии приготовления тестируемых растворов готовятся дополнительные двойные разведения промежуточных растворов токсиканта. Автоматической восьмиканальной пипеткой из каждой пробирки переносится по 100 мкл в соответствующие лунки вертикального ряда (А-Н в случае 8-луночного ряда) 96-луночного планшета. Каждое разведение триплицируется. Затем той же пипеткой в каждую лунку каждого ряда вносится 100 мкл суспензии культуры *D. salina*.

В случае тестирования токсикантов, для которых характерна быстрая агрегация в присутствии неорганических солей, готовить промежуточные растворы токсикантов нецелесообразно. К таковым в частности относятся суспензии коллоидного золота и серебра. В этом случае следует готовить тестовые разведения стокового раствора токсиканта культуральной средой непосредственно в лунках планшета.

Работа 8. Постановка токсикологического эксперимента с пероксидом водорода

Принцип метода

В данной работе описывается функционирование токсикологической тест-системы с использованием культур *D. salina* на примере оценки токсических эффектов пероксида водорода (H_2O_2). Пероксид водорода представляет собой быстродействующий токсикант. Механизм его действия связан с повреждением клеточных структур в результате оксидативного стресса. Назначением данного теста является определение

токсикометрических характеристик поллютанта, поэтому работа ведется с узким концентрационным диапазоном.

В протоколе также описывается процесс подготовки культуры к эксперименту. Для получения корректных и воспроизводимых результатов для токсикологического тестирования следует использовать частично синхронизированную культуру микроводорослей, находящихся в экспоненциальной или ранней стационарной фазах роста (3-4 дневная культура) с посевной дозой 10^6 кл/мл. Выбор данного значения посевной плотности обусловлен возможностью адекватной фотометрической регистрации результатов эксперимента при оптических плотностях, примерно соответствующих данной посевной дозе, а также интенсивным ростом контрольных проб в течение первых двух суток, позволяющим произвести корректное сравнение их с экспериментальными.

Эксперимент реализуется в 96-луночном планшете. Таким образом, каждая лунка представляет собой культивационную емкость, в которой содержится контрольная или экспериментальная проба. Концентрационный диапазон токсиканта имеет вид: 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60 мг/л H_2O_2 . Концентрационные ряды в планшете ориентированы вертикально. В направлении лунок А=>Н концентрация поллютанта убывает. Каждая проба триплицируется.

В качестве тест-функций регистрируются содержание хлорофилла и количество живых и мертвых клеток культуры *D. salina* после 48-часовой экспозиции с различными концентрациями токсиканта. Содержание хлорофилла определяется фотометрически *in vivo* в суспензионных культурах. На основании спектрофотометрических измерений высоты красного пика поглощения хлорофилла рассчитывается полуэффективная концентрация токсиканта ($EC_{50_{48}}$), как 50% содержание хлорофилла от контроля, выращенного в тех же условиях, но без поллютанта. Флуоресцентные микроскопические измерения тех же образцов после химической фиксации глутаровым альдегидом позволяют произвести подсчет живых и мертвых клеток, оценить их соотношение, и произвести расчет полулетальной концентрации токсиканта ($LC_{50_{48}}$), как концентрации, вызывающей гибель половины популяции водоросли.

Материалы и оборудование:

Культура *D. salina*; профильтрованная среда Ben-Amotz; H_2O_2 37 % v/v (Химмед, Россия); глутаровый альдегид 25 % v/v (Electron Microscopy Science, США); дистиллированная вода; плоскодонный 96-луночный планшет (Biofil, Китай); пластиковая пробирка на 5 мл; пластиковая пробирка на 14 мл; ПЦР пробирки на 0,7 мл (8 штук); одноканальные автоматические пипетки на 200 мкл, 1 мл и 5 мл; восьмиканальная автоматическая пипетка на 300 мкл; лабораторная ванночка; ламинарный шкаф; люминесцентные лампы ЛЛ-12/16 Вт (IEK, Россия) (2 штуки); инкубатор (Solent Scientific, Великобритания); ртутный термометр; планшетный спектрофотометр Spark 10M (Tecan, Австрия); инвертированный микроскоп DMI-3000 (Leica, Германия); цифровая камера DFC-450 (Leica, Германия); программы Leica Application Suite, ImageJ, Microsoft Excel.

Ход работы

Подготовка культуры к эксперименту

1. Осуществить 2-3 пересева культуры *D. salina* в 6-луночном планшете (см. шаги 1-7 работы «поддержание культуры *D. salina*»).
2. Получить накопительную культуру (см. шаги 8, 9 той же работы).
3. Нарастивать культуру в течение 3-4 дней.

4. Непосредственно перед экспериментом отобрать из сосуда с накопительной культурой по 200 мкл суспензии и перенести в лунки А10-А12 96-луночного планшета.
5. Провести спектрофотометрические измерения суспензий в лунках (см. шаги 3,4 работы «Фотометрические измерения суспензий культур *D. salina* и обработка полученных данных»).
6. Обработать полученные результаты и рассчитать значение A_{680} для каждой лунки (см. шаги 5-11 той же работы).
7. В пластиковой пробирке на 14 мл развести исходную культуру таким образом, чтобы A_{680} суспензии в пробирке составила порядка 0,06.

Приготовление концентрационных рядов токсиканта

8. В пластиковой пробирке на 5 мл приготовить стоковый раствор пероксида водорода с концентрацией 2 г/л. Смешать в пробирке 27 мкл 37% H_2O_2 и 4973 мкл дистиллированной воды.
9. Одноканальными пипетками сделать серию разведений стокового раствора H_2O_2 (2 г/л) культуральной средой Ven-Amotz в предварительно промаркированных 0,7 мл ПЦР пробирках таким образом, чтобы концентрация токсиканта в каждом разведении в два раза превышала тестируемую. Конечный объем в каждой пробирке должен составить 400 мкл. Протокол разведений приведен в таблице 4.

Таблица 4 – Протокол приготовления промежуточных разведений токсиканта

№ пробирки	Добавляемый в пробирку объем раствора H_2O_2 с концентрацией 2 г/л, мкл	Добавляемый в пробирку объем культуральной среды Ven-Amotz, мкл	Конечная концентрация H_2O_2 в пробирке, мг /л
1	24	376	120
2	20	380	100
3	16	384	80
4	12	388	60
5	8	392	40
6	6	394	30
7	4	396	20
8	0	400	0

10. Сделать разведения токсиканта в трех повторностях в 96-луночном планшете. Автоматической восьмиканальной пипеткой перенести по 100 мкл содержимого из пробирок 1-8 в соответствующие лунки вертикальных рядов А1-Н1, А2-Н2, А3-Н3.

Внесение инокулята

11. Перелить культуру *D. salina* со значением поглощения A_{680} примерно 0,06 в лабораторную ванночку для заполнения многоканальных дозаторов.

12. Перенести автоматической восьмиканальной пипеткой по 100 мкл суспензии микроводорослей из ванночки в лунки рядов А1-Н1, А2-Н2 и А3-Н3 в микропланшете.

Спектрофотометрические измерения и обработка полученных результатов

13. Провести спектрофотометрические измерения суспензий в лунках (см. шаги 3,4 работы «Фотометрические измерения суспензий культур *D. salina* и обработка полученных данных»).
14. Обработать полученные результаты (см. шаги 5-11 той же работы).
15. Оставить микропланшет инкубироваться на 48 часов (см. шаг 6 работы «Поддержание культуры»).
16. Через 24 и 48 часов после начала эксперимента повторить шаги 13, 14.

Расчет скорости роста

17. Рассчитать скорость роста в контрольных пробах (см. шаг 7 работы «Фотометрический контроль физиологического состояния культуры»).

Фиксация клеток и получение микроскопических изображений

18. Через 48 часов экспозиции с токсикантом зафиксировать клетки (см. шаг 6 работы «Определение числовой концентрации клеток в культурах микроводоросли *D. salina*»).
19. Получить флуоресцентные микроскопические изображения лунок (см. шаги 8-14 той же работы). Перед захватом изображения камерой необходимо провести визуальную оценку его пригодности для обработки. Следует фотографировать только те лунки, в которых клетки обеспечивают образование рыхлого монослоя. В случае наложения изображений клеток друг на друга следует использовать систему десятикратных разведений (см. шаги 3-5 той же работы).

Обработка изображений и подсчет числа клеток

20. Обработать полученные флуоресцентные изображения и провести автоматический подсчет числа клеток с использованием программы ImageJ (см. шаги 15-21 той же работы). Необходимо обработать и провести подсчет клеток на изображениях не только красного (**Red**), но и зеленого (**Green**) канала. Обработка изображений зеленого канала производится по той же схеме, что и красного.

Расчет показателя смертности

21. На основании результатов, полученных в результате обсчета изображений, рассчитать показатель смертности для экспериментальных проб по формуле:

$$M_{ог} = (NB/NG) \times 100, \%$$

Где $M_{ог}$ - показатель смертности, %; NB – количество клеток синего цвета на изображении; NG – общее количество клеток на изображении.

Расчет полулетальной концентрации токсиканта (LC50₄₈)

22. Рассчитать показатель LC50₄₈ методом линейной интерполяции в окрестностях $M_{ог} = 50$ по формуле:

$$LC50_{48} = ((C_{>50\%} - C_{<50\%}) / (M_{ог>50\%} - M_{ог<50\%})) \times (50 - M_{ог<50\%}) + C_{<50\%}$$

Где LC50₄₈ – полулетальная концентрация токсиканта после 48-часовой экспозиции, мг/л; $C_{>50\%}$ – значение концентрации токсиканта, давшее более 50 % эффекта, мг/л; $C_{<50\%}$ – значение концентрации токсиканта давшее менее 50 % эффекта, мг/л; $M_{ог>50\%}$ – значение показателя смертности более 50 %; $M_{ог<50\%}$ – значение показателя смертности менее 50%.

Расчет эффективности действия токсиканта

23. На основании фотометрических данных рассчитать величину эффективности токсиканта для каждой экспериментальной пробы по формуле:

$$\text{Eff} = (1 - (A_{680}C / A_{680}C_0)) \times 100$$

Где Eff- величина эффективности действия токсиканта, %; $A_{680}C$ – значение величины поглощения хлорофилла в экспериментальной пробе; $A_{680}C_0$ – значение величины поглощения хлорофилла в контрольной пробе.

Расчет полумаксимальной эффективной концентрации токсиканта (EC50₄₈)

24. Рассчитать показатель EC50₄₈ методом линейной интерполяции в окрестностях Eff =50 по формуле:

$$\text{EC}_{50_{48}} = ((C_{>50\%} - C_{<50\%}) / (\text{Eff}_{>50\%} - \text{Eff}_{<50\%})) \times (50 - \text{Eff}_{<50\%}) + C_{<50\%}$$

Где EC50₄₈ – полумаксимальная эффективная концентрация токсиканта, мг/л;
 $C_{>50\%}$ – значение концентрации токсиканта, давшее более 50 % эффекта, мг/л;
 $C_{<50\%}$ – значение концентрации токсиканта, давшее менее 50 % эффекта, мг/л;
 $\text{Eff}_{>50\%}$ значение эффективности действия более 50 %; $\text{Eff}_{<50\%}$ – значение эффективности действия менее 50%.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ГЕОРГИЯ ПЛЕРИНСКОГО

Ожидаемые результаты в работах 2-3

На рисунках 3 и 4 изображены калибровочные графики. График на рисунке 3 отражает зависимость фотометрической оценки содержания хлорофилла *in vivo* в суспензиях культур *D. salina* от оптической оценки количества хлорофилла в экстрактах тех же культур. График на рисунке 3 отражает зависимости показателей поглощения хлорофилла в красной области в суспензиях и экстрактах от степени разведения. Полученные экспериментальные данные аппроксимируются линейной функцией $y=ax+b$. На рисунках также показаны значения R^2 - коэффициента детерминации. Данный коэффициент отражает долю дисперсии зависимой переменной, которая обусловлена ее взаимосвязью с независимой переменной. К примеру, на рисунке 1 $R^2=0,99$. Это значит, что 99% изменчивости оптического параметра A_{680} обуславливается взаимосвязью с показателем поглощения $A_{665-725}$ в спиртовых экстрактах. То есть, построенная линейная регрессионная модель адекватно описывает поведение и изменчивость зависимой переменной.

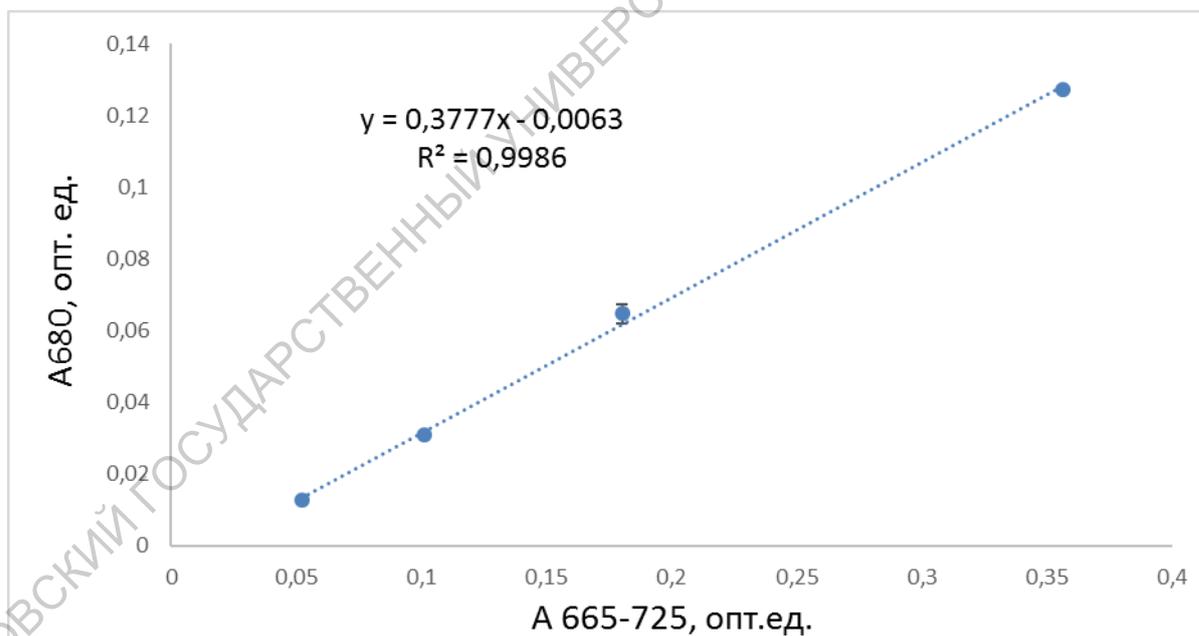


Рисунок 3 – Зависимость показателя поглощения хлорофилла *in vivo* (A_{680}) в суспензиях культур *D. salina* от показателя поглощения в спиртовых экстрактах ($A_{665-725}$).

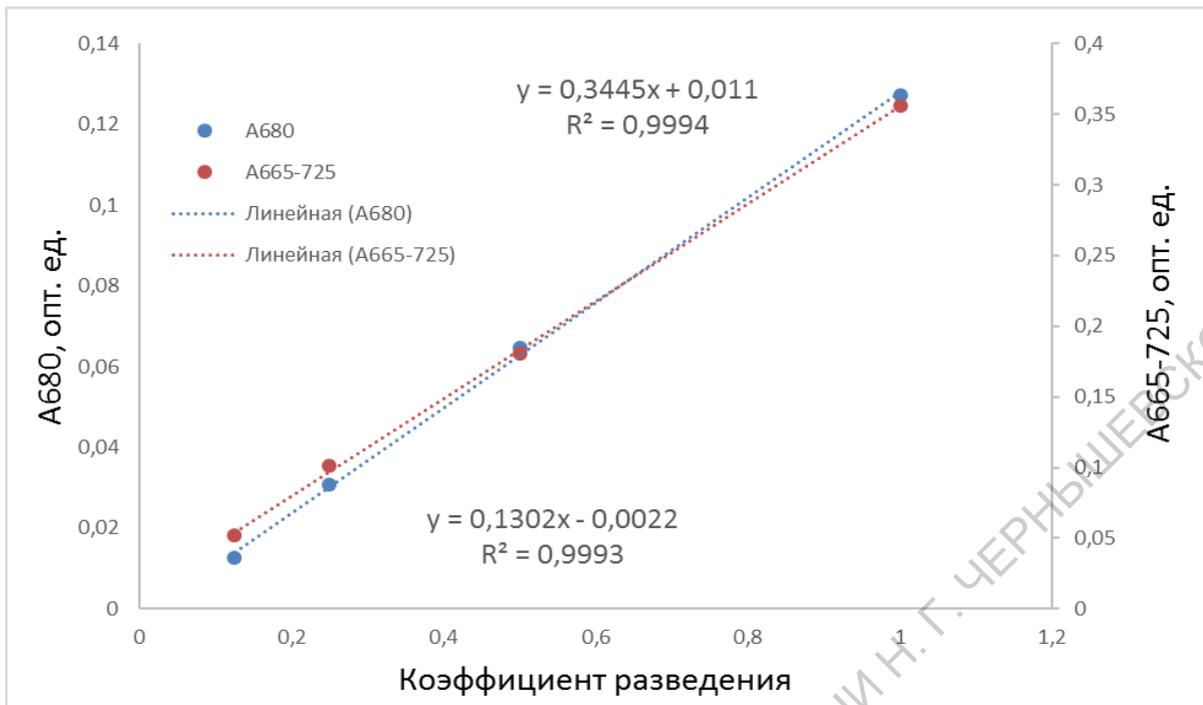


Рисунок 4 – Зависимость показателей поглощения хлорофилла в суспензиях и экстрактах от степени разведения.

Приложение 2

Ожидаемые результаты в работе 4

На рисунках 4 и 5 представлены калибровочные графики. График на рисунке 4 отражает зависимость поглощения *in vivo* культур *D. salina* от числовой концентрации клеток. Графики на рисунке 5 отражают зависимость показателя поглощения и числовой концентрации клеток от степени разведения культуры. Полученные экспериментальные данные аппроксимируются линейной функцией $y=ax+b$. На рисунках также показаны значения R^2 - коэффициента детерминации.

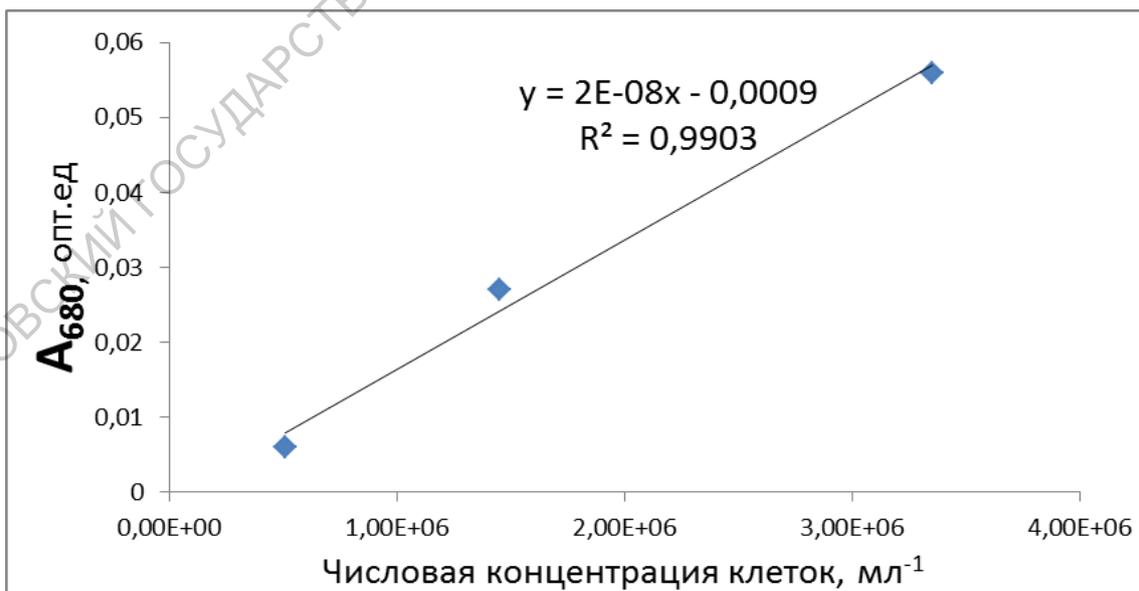


Рисунок 5- Зависимость показателя поглощения (A_{680}) *in vivo* от числовой концентрации клеток микроводоросли *D. salina*

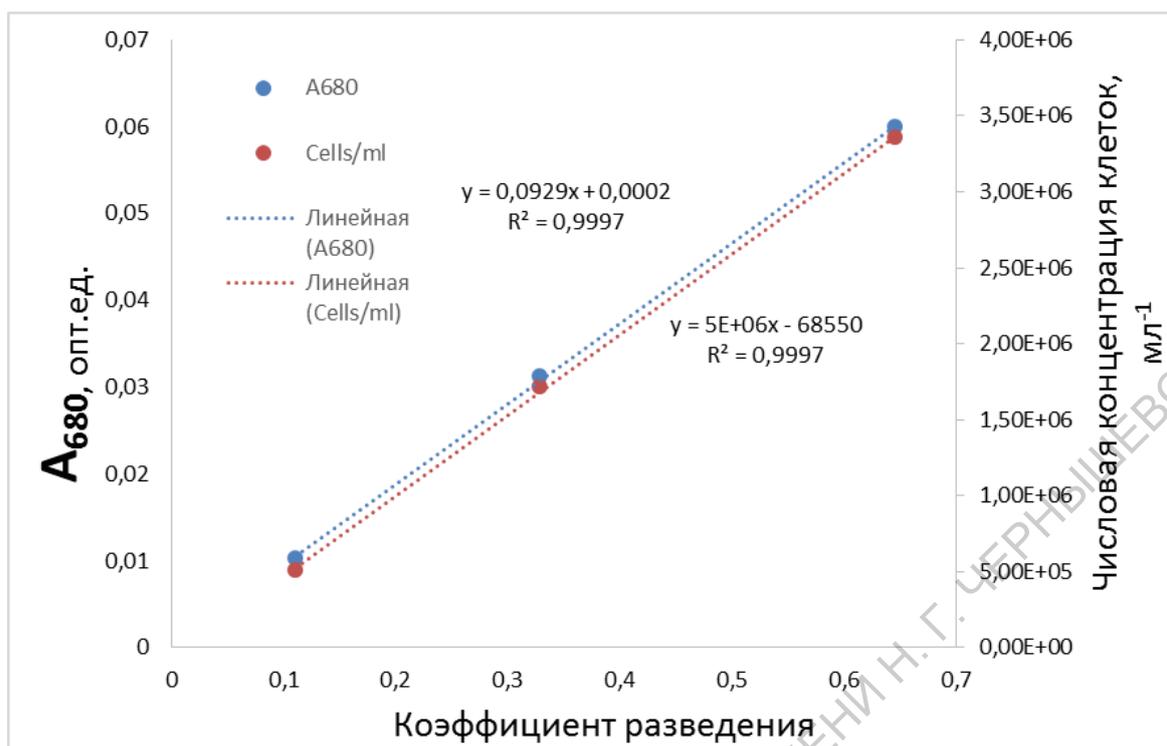


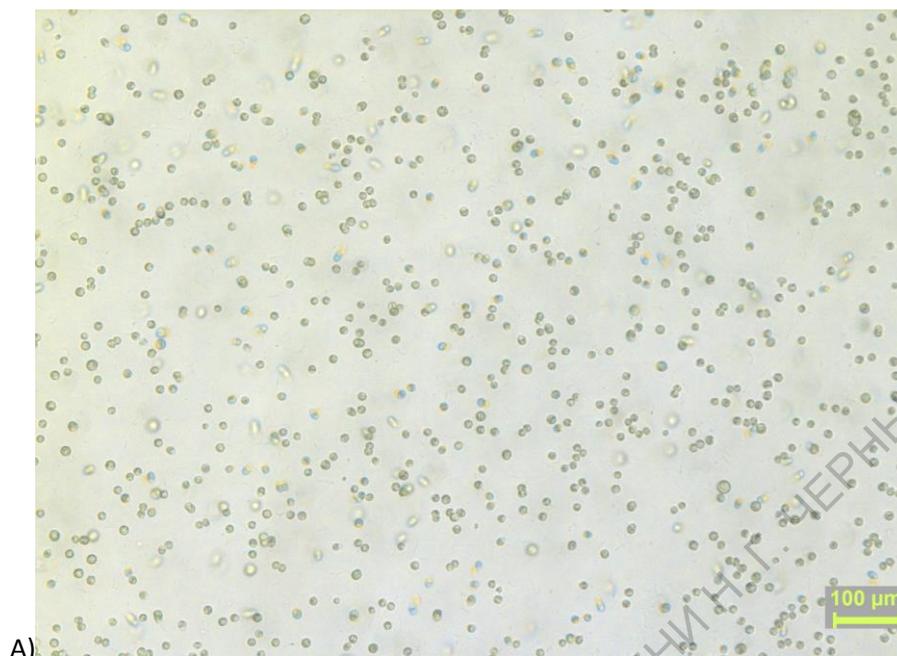
Рисунок 6 - Зависимость фотометрической и микроскопической оценки количества клеток от разведения

Приложение 3

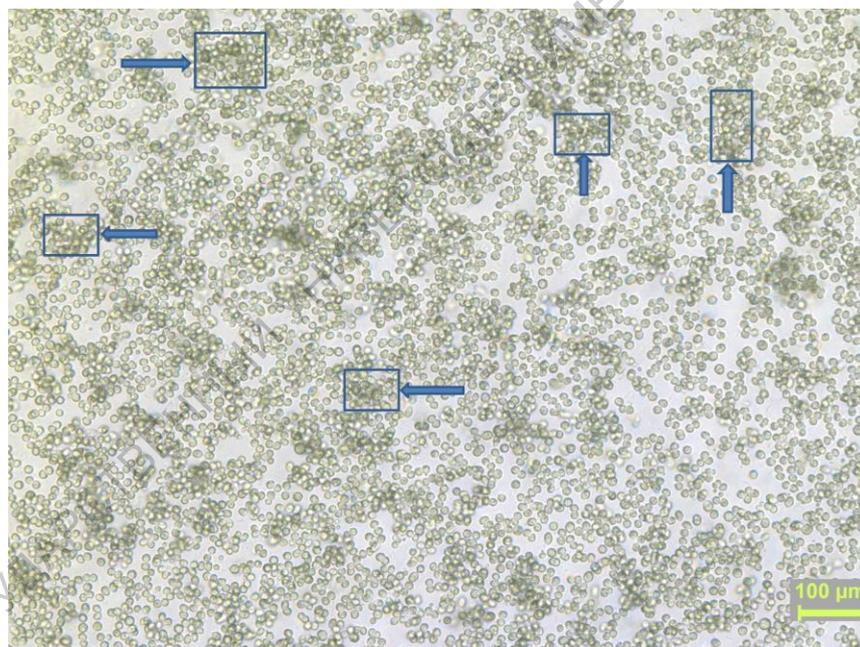
Ожидаемые результаты в работах 6-7

На рисунке 7 представлены фазово-контрастные изображения физиологически-активной культуры *D. salina* (А) и культуры в присутствии 10 мг/л дихромата калия (Б) через 24 часа экспозиции. Обе культуры были посеяны в одинаковой инокуляционной дозе порядка 10^6 кл \times мл⁻¹. На первом изображении можно отметить малое количество клеток на дне лунки, что свидетельствует о сохранении клетками подвижности. На втором изображении практически все клетки расположены на дне лунки. Также присутствует многочисленныe пальмеллоидные образования. Данные признаки свидетельствуют о стрессовом состоянии культуры.

На рисунке 8 представлена кривая роста культуры при условиях культивирования, близких к оптимальным, в течение 72 часов. Значения скорости роста в определенные временные промежутки представлены в таблице 5. Значения скоростей роста культуры в первые двое суток составляют 1,37 и 1,42 удвоений/день соответственно, что свидетельствует о физиологически активном состоянии *D. salina*.



А)



Б)

Рисунок 8 – Изображения дна лунки с культурами *D. salina* в режиме фазового контраста. А) Физиологически активная культура; Б) культура после 24-часовой экспозиции с 10 мг/л $K_2Cr_2O_7$. Стрелками и рамками обозначены пальмеллоидные образования.

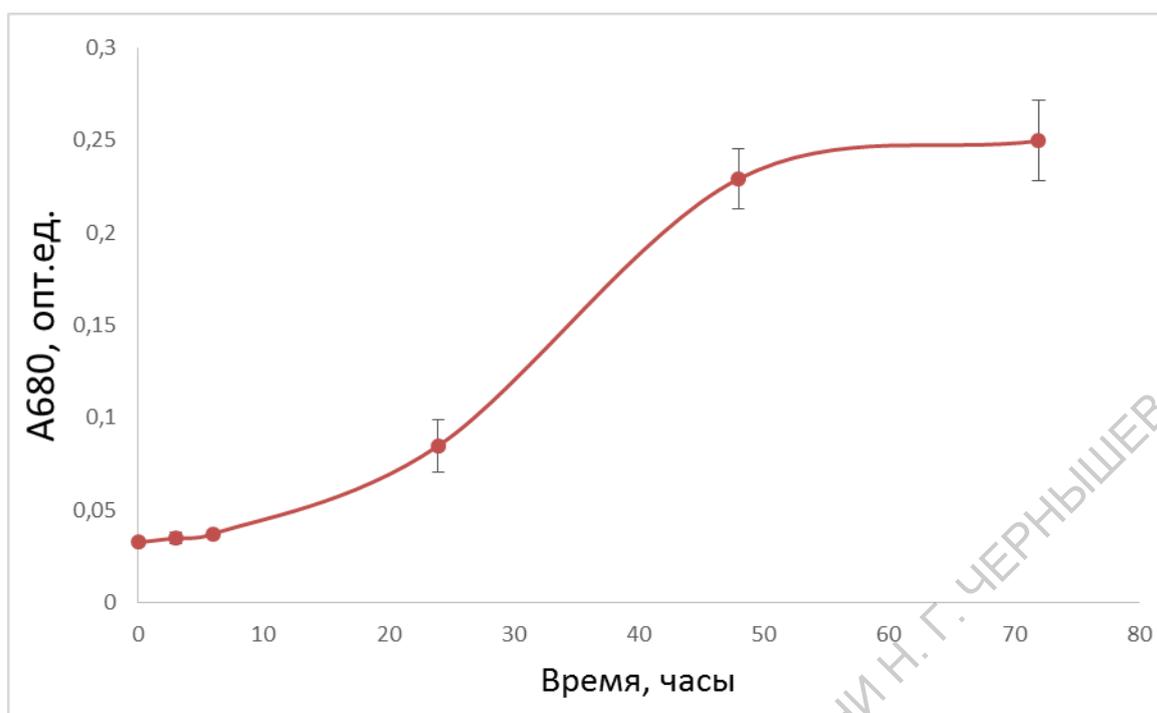


Рисунок 9 – Динамика роста культуры *D. salina* в течение 72 часов после инокуляции. Культивирование в условиях постоянного освещения двумя люминесцентными лампами при температуре $22,2 \pm 0,87$ °С.

Таблица 5 – Значения скоростей роста культуры *D. salina* в течение 72 часов при культивировании в условиях, близких к оптимальным

Временной интервал, часы	Скорость роста, удвоения/сутки
0-24	$1,37 \pm 0,09$
24-48	$1,43 \pm 0,08$
48-72	$0,12 \pm 0,01$

Ожидаемые результаты в работе 8

На рисунках 9 и 10 изображены гистограммы, демонстрирующие концентрационную зависимость показателя смертности и эффективности действия пероксида водорода применительно к культурам микроводоросли *D. salina*. Также представлены значения токсикометрических характеристик данного поллютанта.

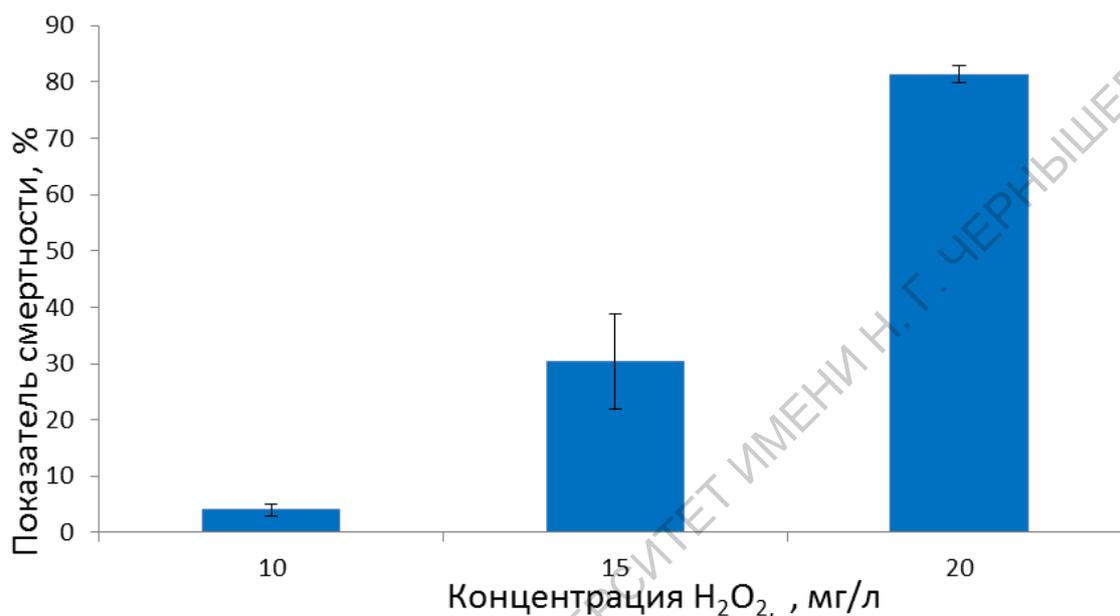


Рисунок 10 – Микроскопическая оценка показателя смертности при воздействии пероксида водорода на культуры *D. salina* после 48 часов экспозиции

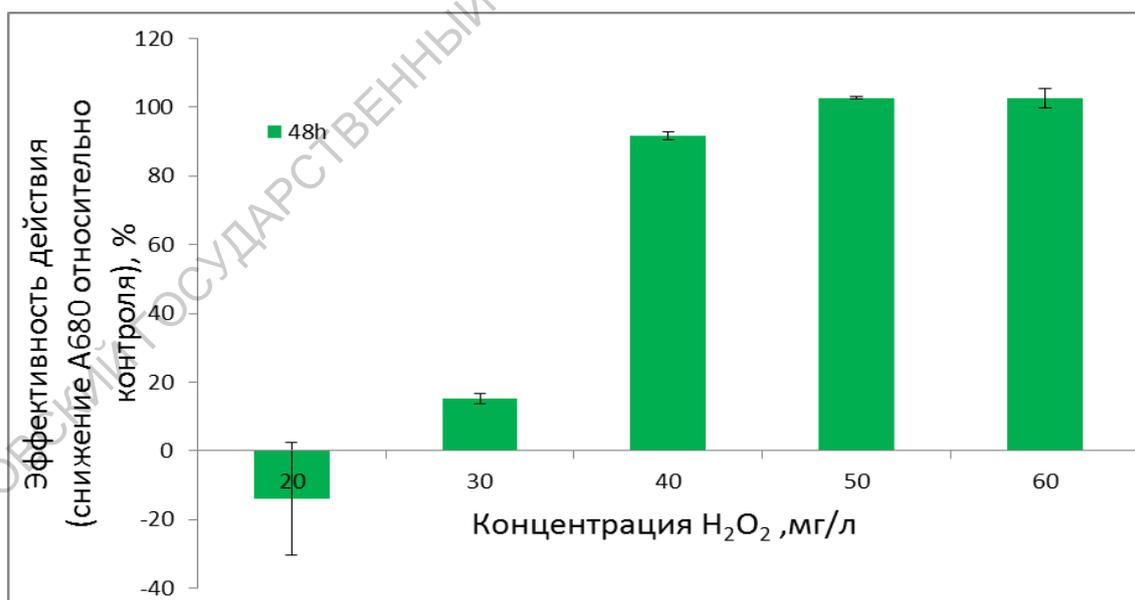


Рисунок 11 – Фотометрическая оценка эффективности действия пероксида водорода на клетки микроводоросли *D. salina* после 48 часов экспозиции

LC₅₀₄₈ (H₂O₂) = 16, 87 ± 0, 59 мг/л

EC₅₀₄₈ (H₂O₂) = 34, 56 ± 0, 06 мг/л

Список использованной литературы

1. Филенко, О.Ф. Основы водной токсикологии / учеб. пособие для вузов. О.Ф. Филенко, И.В. Михеева. Москва: Колос, 2007. 144 с.
2. Котелевцев, С.В. Эколого-токсикологический анализ растительных сообществ в водных экосистемах / учеб.-мет. пособие для вузов. С.В. Котелевцев, Д.Н. Маторин, А.П. Садчиков. Москва: Альтекс, 2012. 182 с.
3. Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей. ГОСТ: Р 54496-2011.
4. Freshwater alga and cyanobacteria , growth inhibition test. Test N 201. OECD guidelines for the testing chemicals, section 2. Paris, 2011. 25 p.
5. Blaise, C. Vasseur, P. Algal microplate toxicity test / in Small scale freshwater toxicity investigations / ed. by C. Blaise, J-F. Ferard. Springer, 2005. P. 137-159.
6. St-Laurent, D. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornatum* using microplate and flask bioassay procedures / D. St-Laurent [et. al] // Environmental toxicology. 1992. Vol. 7, № 1. P. 35-48.
7. Oren, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005 / A. Oren // Saline systems. 2005. Vol. 1. № 2. [10.1186/1746-1448-1-2](https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2)
8. Масюк, Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* teod. и перспективы его практического использования / Н.П. Масюк. Киев: Наукова думка, 1973. 244 с.
9. DeLorenzo, M.E. Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta* / M.E. DeLorenzo, Serrano L. // J Environ Sci Health B. 2003. Vol. 38, № 5. P. 529-538.
10. Qv, X.Y. Toxicity evaluation of two typical surfactants to *Dunaliella bardawil*, an environmentally tolerant alga / X.Y. Qv, J.G. Jiang // Environ Toxicol Chem. 2013. Vol. 32, № 2. P. 426-433.
11. Morelli, E. Interaction of CdSe/ZnS quantum dots with the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the green alga *Dunaliella tertiolecta*: a biophysical approach / E. Morelli [et al] // Biophys Chem. 2013. Vol. 182. P. 4-10.
12. Hazani, A.A. Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* / A.A. Hazani [et al] // Arch Biol Sci. 2013. Vol.165. P. 1447-1457.
13. Larginho, M. Evidence of one-way flow bioaccumulation of gold nanoparticles across two trophic levels / M. Larginho [et al] // J Nanopart Res. 2014. 16: 2549.
14. Shaish, A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil* / A. Shaish, M. Avron, A. Ben-Amotz // Plant Cell Physiol. 1990. Vol. 31, № 5. P. 689-696.
15. Физиология растений / учебник для студ. вузов. Под ред. И.П. Ермакова. Москва: Академия, 2005. 640 с.
16. SCOR-UNESCO Working group number 17. 1966. Determination of photosynthetic pigments. UNESCO monographs in oceanographic methodology No. : 1:9-18.
17. Kubin, S. in vivo chlorophyll determination in suspensions of chlorococcal algae / S. Kubin // Archiv für Protistenkunde. 1991. Vol. 139. P. 111-116.
18. Franklin, N.M. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal assays / N. M. Franklin [et al] // Environmental toxicology and chemistry. 2002. Vol. 21, № 4. P. 742-751.
19. Прилепский, А.Ю. Определение токсичности наноматериалов на животных клетках в культуре / учеб.-мет. пособие для студентов вузов. А.Ю. Прилепский, С.А. Староверов, В.А. Богатырев. Саратов, 2016. 74 с.