



Научная статья

Процедура выбора методов биотестирования в условиях разных видов загрязнения

А.С. Олькова 

Вятский государственный университет, 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36

morgan-abend@mail.ru

Поступила в редакцию: 24.03.2022

Доработана: 28.04.2022

Принята к печати: 11.05.2022

Опубликована онлайн: 19.08.2022

DOI: 10.23859/estr-220324

УДК 57.042+57.044

Аннотация. В статье описан алгоритм выбора целевого метода биотестирования, наиболее чувствительного к определенному загрязнению, преобладающему на территории исследования. Выбор производится из «батареи биотестов», в которую обязательно включен тест по смертности *Daphnia magna* Straus, 1820. Остальные методы для сравнения чувствительности выбираются ситуационно. Апробация алгоритма проведена на модельных и реальных образцах. В результате применения предложенного алгоритма было установлено, что в условиях загрязнения минеральными соединениями азота информативны тесты по смертности *D. magna* и *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900. В ситуациях преобладающего загрязнения минеральными солями Си, фосфатами и пиродифосфатами максимальную реакцию стоит ожидать от биолюминесцентного теста на препарате *Escherichia coli* Migula, 1895. В случае загрязнения водной среды Cd, Pb, Zn, нефтепродуктами, органическими гербицидами имазетапиром и имазамоксом наибольшую чувствительность проявляет тест по снижению хемотаксической реакции *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838. Представленный алгоритм является универсальным, однако должен применяться только при условии достоверно установленного приоритетного загрязняющего вещества, эффекты которого преобладают над действием других соединений в пробе.

Ключевые слова: методология биотестирования, выбор биотестов, тест-организм, чувствительность к загрязнению, приоритетное загрязнение, экологический мониторинг

Введение

К современным особенностям антропогенеза можно отнести комплексное и глобальное загрязнение окружающей среды, распространение ксенобиотиков (веществ, полностью чуждых живым организмам), сочетание негативного действия физических и химических факторов и т.д. По этой причине биодиагностика качества окружающей среды с каждым годом становится все более актуальной и важной с экологической и социальной точек зрения темой.

Биотестирование является одним из способов биодиагностики компонента окружающей среды по ответным реакциям лабораторных тест-организмов. Для точного заключения о токсичности пробы необходимо длительное содержание тест-организмов в контролируемых условиях и соблюдение протокола проведения испытания. Экстраполяция результатов модельных испытаний на процессы, происходящие в реальных экосистемах, остается сложной, но необходимой задачей для оценки воздействия химического стрессора на водные и наземные экосистемы (Schuijt et al., 2021).

На сегодняшний день имеется возможность выбора наиболее подходящих для конкретной цели методов биотестирования. Например, дрозофила традиционно остается удобным модельным организмом для генетических исследований, протоколы испытания новых лекарственных препаратов не обходятся без белых мышей, тестирование гербицидов принято проводить в первую очередь на целевых видах сорных растений (Gupta, 2016).

В сфере изучения токсичности природных компонентов (поверхностные воды, донные отложения, почва, воздух) трудно выделить один тест-организм, необходимый и достаточный для использования. В связи с этим сформировался принцип «батареи биотестов», включающей несколько методик биотестирования с применением разных организмов. В идеале батарея для биоанализа должна быть простой, недорогой и мультитрофичной, иметь широкий спектр реакции на токсичные вещества, давать быстрые, «экспрессные» результаты (Castillo and Schafer, 2000). К примеру, в работе L.K. Pandey с соавторами (2019) предлагается проведение биотестирования, основанного на шести организмах и их несходных реакциях.

Долгое время считалось, что «батарея биотестов» является единственно верным и экологичным подходом для определения токсикологической нагрузки на биоту. Однако позднее появились критические работы в этой области. Так, справедливо отмечено, что токсикологические исследования на животных не могут обеспечить необходимую производительность экономически эффективным способом (Morisseau et al., 2009).

Кроме того, существует проблема, связанная с реализацией программ экологического мониторинга, когда «батарея биотестов» используется в многолетнем режиме. В этом случае в результате нескольких циклов наблюдений становится ясно, какие тест-организмы и их тест-функции наиболее чувствительны к преобладающему загрязнению, однако по причинам, связанным с законодательством и другими бюрократическими аспектами, исполнители вынуждены по-прежнему использовать весь перечень методов биотестирования, включенных в программу мониторинга. Например, во Франции с 1998 г. отработывалась стратегия испытаний для оценки экотоксикологических свойств отходов с использованием батареи из шести стандартизированных биологических анализов. К 2006 г. многомерные статистические анализы продемонстрировали, что для получения той же классификации отходов можно сократить количество испытаний до трех. Согласно российскому законодательству рекомендуется использовать минимум два тест-организма разных трофических уровней для определения токсичности отходов¹ и 2–3 – для режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши². Кроме того, существует положительная практика увеличения количества биотестов при утверждении программ экологического контроля и мониторинга опасных и особо опасных промышленных объектов. В этом случае в набор биотестов обычно включают «основные» и «дополнительные» методы³.

Таким образом, внедрение подхода, подразумевающего выбор наиболее чувствительного биотеста, окажется весьма эффективным для получения объективных данных, а также будет способствовать экономии материальных и трудовых затрат. Искомый метод можно назвать целевым биотестом, отличающимся доказанной высокой чувствительностью к основному загрязнению на территории исследования. Отметим, что такой подход следует применять только в том случае, если известно приоритетное опасное вещество, эффекты которого преобладают над действием других возможных токсикантов.

Несмотря на повсеместное загрязнение окружающей среды комплексом веществ, а так-

¹ Приказ Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации от 4 декабря 2014 г. №536 «Об утверждении Критериев отнесения отходов к I–V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду».

² РД 52.24.309-2016. Организация и проведение режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши.

³ РД 52.24.868-2017. Использование методов биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов.

же образование и действие их контаминантов, также распространены территории, для которых известно приоритетное загрязнение. Например, многие сельскохозяйственные земли подвержены постоянному воздействию гербицидов или инсектицидов, что обуславливает необходимость поиска целевого биотеста и его применение для эффективного агроэкологического мониторинга. Так, из «батареи» восьми видов растений рапс был идентифицирован в качестве наиболее подходящего растения для биоанализа атразина (Ramezanpoor et al., 2021). В работе E.E.V. Chapman с соавторами (2012) приводится оценка нескольких методов биоанализа на предмет их пригодности для определения риска, связанного с загрязнением почвы цинком. Интересен метод высокопроизводительного скрининга с использованием девяти биотестов на основе ферментов и пяти – на основе рецепторов, который позволяет одновременно выявлять потенциально опасные химические соединения и определять наиболее чувствительный биомаркер, наблюдаемый при биоанализе (Morisseau et al., 2009).

Комплексных исследований, направленных на определение целевых биотестов для разнообразных веществ по единой схеме, на сегодняшний день недостаточно. В связи с этим задачами

нашей работы стали создание алгоритма выбора целевых методов биотестирования для разных токсикантов и его апробирование в лабораторных и полевых условиях.

Материалы и методы

Методы биотестирования

В «батарею биотестов», чувствительность элементов которой мы оценивали, были включены четыре метода (Табл. 1).

Представленная батарея содержит два классических теста на острую токсичность по летальности низших ракообразных и два экспресс-метода определения острой токсичности по сублетальным реакциям. Выбранные низшие ракообразные относятся к разным родам и отличаются неодинаковой чувствительностью к сапробности водоемов, поэтому их использование в едином комплексе можно считать оправданным.

Метод с использованием *P. caudatum* основан на отрицательном хемотаксисе микроорганизмов по отношению к вредному химическому веществу. Определение хемотаксической ответной реакции *P. caudatum* проводилось на приборе «Биотестер» (Россия), который относится к спектральным концентратомерам. Оптический сигнал проходит че-

Табл. 1. Характеристика оцениваемых биотестов.

Тест-организм	Тест-функция	Экспозиция	Прибор	Руководящий документ
<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	Смертность	96 часов	Не требуется (визуальная диагностика)	ФР 1.39.2007.03222 ⁴
<i>Ceriodaphnia</i> <i>affinis</i> Lilljeborg, 1900	Смертность	48 часов	Не требуется (визуальная диагностика)	ФР 1.39.2007.03221 ⁵
<i>Paramecium</i> <i>caudatum</i> Ehrenberg, 1838	Хемотаксическая реакция	30 минут	«Биотестер»	ФР 1.39.2015.19242 ⁶
<i>Escherichia coli</i> Migula, 1895, штамм M17	Биолюминесценция	30 минут	«Биотокс-10М»	ПНДФ Т 14.1:2:3:4.11-04 ⁷

⁴ ФР 1.39.2007.03222. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний.

⁵ ФР 1.39.2007.03221. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний.

⁶ ФР 1.39.2015.19242. Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер».

⁷ ПНДФ Т 14.1:2:3:4.11-04. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм».

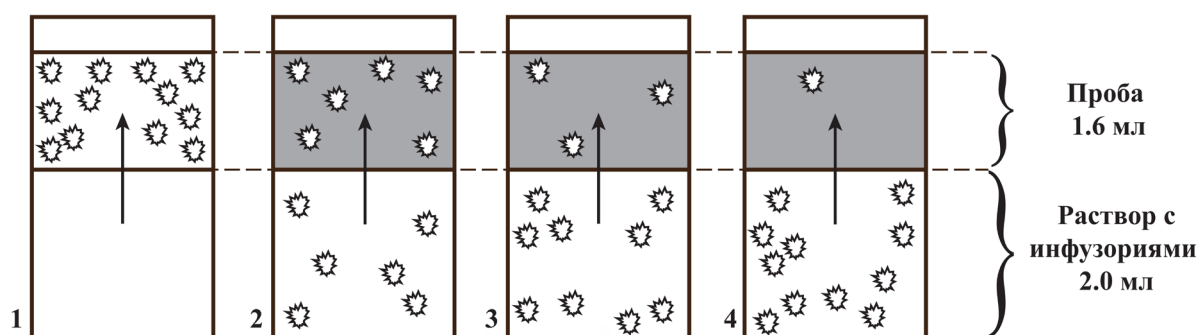


Рис. 1. Схема биотестирования по хемотаксической реакции инфузорий: 1 – безвредная проба; 2, 3 – среднетоксичная проба; 4 – токсичная проба.

рез верхнюю часть кюветы и поступает на приемное устройство, где происходит преобразование в электрический сигнал, пропорциональный количеству инфузорий в зоне измерения (Рис. 1). Расчет индекса токсичности осуществляется по отношению к контролю, которым служит хемотаксическая реакция организмов в чистой воде.

Биотест с использованием *E. coli* является биолюминесцентным методом определения уровня токсичности пробы. Количественное изменение люминесценции бактериальной взвеси в пробе проводилось на люминиметре «Биотокс-10М» (Россия), далее показатель сравнивался с контрольными данными.

Расчет индексов токсичности (Т) для двух экспресс-методов проводится по следующей формуле:

$$T = (X_k - X_{оп}) / X_k,$$

где X_k – количественное выражение ответной реакции тест-организмов на контрольную водную среду согласно используемой методике; $X_{оп}$ – количественное выражение ответной реакции тест-организмов на тестируемую в ходе опыта среду.

Для биотеста по *P. caudatum* результат расчета умножается на 100%; для метода с использованием препарата *E. coli* этого не предусмотрено. Единицы измерения – условные единицы (у.е.).

Испытания проводили в научно-исследовательской лаборатории Вятского государственного университета, лицензированной Федеральной службой по аккредитации России на право проведения подобных работ.

Вещества для модельных испытаний

Вещества, использованные для сравнения чувствительности четырех биотестов, условно можно разделить на минеральные и органические

(Табл. 2). Основным критерием для их выбора послужило частое присутствие в спектре выбросов и сбросов антропогенных объектов и, как следствие, повсеместное увеличение уровня загрязнения данными веществами. Диапазон тестируемых концентраций для всех исследуемых токсикантов был разным; он определялся в предварительных испытаниях на *D. magna*. В дальнейшем дозы для других организмов могли быть скорректированы, если воздействия не наблюдалось или оно было летальным во всем диапазоне концентраций.

Вещества вносили в артезианскую воду питьевого качества. Вода без добавок служила контролем для каждого из биотестов; предварительно в ней была определена концентрация основных катионов и анионов, а также некоторых загрязняющих веществ. Содержание всех природных соединений находилось в допустимых интервалах⁸; количество пестицидов и продуктов их деструкции, а также ТМ не достигало предела обнаружения используемых методов. Некоторые физико-химические характеристики данной воды представлены в Табл. 3.

Статистический анализ и достоверность результатов

Испытания проводились в контролируемых лабораторных условиях, в ходе работы использовалась одинаковая вода для моделирования загрязнения. Эксперименты проведены в трех-четырёх повторностях. Полученные исходные данные обрабатывались стандартными математическими методами. Наличие достоверных различий между результатами биотестирования определялось по критерию Стьюдента, $p < 0.05$.

⁸ СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества.

Табл. 2. Перечень исследованных веществ и их концентрации, использовавшиеся при определении целевых биотестов. Расчетные концентрации и соответствие ПДК приведены для токсичного иона (кроме гербицидов и нефтепродуктов).

Группа веществ	Вещество	Токсичный ион / вещество	Диапазон тестируемых концентраций, мг/л	Соответствие ПДК (при наличии)
Тяжелые металлы (ТМ)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cu^{2+}	0.001–0.1	1–10 (Cu^{2+})
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Zn^{2+}	0.01–0.1	1–10 (Zn^{2+})
	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Pb^{2+}	0.006–0.06	1–10 (Pb^{2+})
	$\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cd^{2+}	0.05–0.5	1–10 (Cd^{2+})
Минеральные формы азота	NaNO_3	NO_3^-	200–4000	5–100
	NaNO_2	NO_2^-	0.4–8.0	5–100
	NH_4Cl	NH_4^+	0.5–50	1–100
	$\text{NaNO}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	40–400 (NO_3^-); 0.5–5.0 (NH_4^+)	1–10
	$\text{NaNO}_2 + \text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$	0.08–0.8 (NO_2^-); 5–5.0 (NH_4^+)	1–10
Минеральные формы фосфора	$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	PO_4^{3-}	20–400	100–2000
	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	13–550	3.7–157
Гербициды	Имазетапир	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$	0.01–3.0	1–300
	Имазамокс	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$	0.01–3.0	1–300
Нефтепродукты	Бензин	C_8H_{15}	10–100	–

Табл. 3. Результаты анализов природной воды для моделирования загрязнения.

№	Показатель	Единицы измерения	Результат измерения	Допустимый уровень
1	рН	Единицы рН	7.4 ± 0.2	6.5–8.5
2	Нитраты	мг/л	10.2 ± 2.0	Не более 20
3	Нитриты	мг/л	Менее 0.016	Не более 0.5
4	Аммиак	мг/л	Менее 0.05	Не более 0.1
5	Фосфаты	мг/л	Менее 0.05	Не более 3.5
6	Жесткость общая	мг-экв/л	2.43 ± 0.36	Не более 7.0
7	Нефтепродукты (суммарно)	мг/л	Менее 0.005	Не более 0.05
8	Органический углерод	мг/л	Менее 1.2	Не более 10

Результаты

Алгоритм выбора наиболее чувствительного метода биотестирования

Предлагаемый алгоритм основан на ранжировании чувствительности нескольких методов биотестирования к приоритетному токсиканту, который создает основной фактор токсичности окружающей среды в районе наблюдения за естественными или трансформированными экосистемами. Под основным фактором токсичности понимаются эффекты вещества, действие которых превалирует над влиянием других веществ в пробе. Предварительные испытания методов биотестирования на чувствительность к приоритетному загрязнителю позволяют в ходе дальнейших мониторинговых работ применять целевой метод биотестирования, а не всю «батарею биотестов».

Биотест по смертности *D. magna* предлагается использовать как базовый, то есть первый и обязательный элемент «батареи биотестов». Это обусловлено рядом причин:

- данный тест является одним из наиболее широко распространенных методов биотестирования в мире, его вариации описаны в международных и национальных протоколах определения токсичности проб^{9, 10, 11, 12};

- по реакциям *D. magna* можно определять как подострые и острые, так и хронические эффекты (при необходимости);

- *D. magna* обладает оптимальным сочетанием биологических особенностей, важных для процесса биотестирования: клональное размножение, наличие большинства органов и их систем, характерных для высокоорганизованных организмов, относительно короткий жизненный цикл и др.

Алгоритм выбора целевого биотеста в случае известного приоритетного загрязнения включает 5 этапов.

1. Установление нелетальных и летальных доз исследуемого вещества для базового тест-организма *D. magna* по международному¹² или национальному¹¹ протоколу определения смертности. Выявление среднелетальной концентрации токсиканта при этом необязательно, если это не явля-

ется задачей исследования. Такой подход значительно сокращает объем работы.

Ориентиром для выбора тестируемых концентраций могут быть следующие факторы:

- национальные нормативы вредного воздействия веществ, если они разработаны;
- результаты опубликованных научных работ, если токсикант ранее изучался;
- действующие дозы гомологичных веществ (для органических соединений) или наиболее близких по генезису веществ (для неорганических), если токсикант не изучен.

Запланированные дозы, предназначенные для тестирования, необходимо вводить в природную воду, характерную для района экологического мониторинга (использование дистиллированной воды не рекомендуется). Это позволит получить данные, адекватные естественному химическому фону природных вод территории изучения.

2. Выбор иных методов биотестирования, доступных для дальнейшего использования в процессе экологического мониторинга. Критериями для формирования первоначальной «батареи биотестов» являются следующие:

- использование тест-организмов разных трофических групп в соответствии с Водной рамочной директивой Европейского Союза¹³;
- включение в «батарею биотестов» экспресс-методов;
- использование биотестов, позволяющих определять хронические эффекты (при необходимости).

3. Тестирование летальных и нелетальных доз приоритетного токсиканта, установленных в ходе первого этапа на *D. magna*, с помощью остальных выбранных биотестов. При наличии определенных условий оцениваются эффекты дополнительных доз веществ:

- если тест-организмы проявляют низкую или чрезмерно высокую чувствительность к тестируемым концентрациям токсиканта;
- если необходимо разграничить чувствительность биотестов, с помощью которых получены близкие результаты.

Контрольная среда, используемая для моделирования, остается той же – природной водой, выбранной изначально.

4. Установление дополнительных эффектов приоритетного токсиканта: например, хронических и отсроченных последствий, мутагенных воздействий и др. Данная процедура выполняется в том случае, если это входит в задачи исследования или приоритетное загрязняющее вещество может потенциально оказывать специфическое действие.

⁹ EPS 1/RM/11. Biological test method: Acute lethality test using *Daphnia* spp.

¹⁰ EPA 821/R-02/012. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.

¹¹ ФР 1.39.2007.03222. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний.

¹² ISO 6341:2012. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.

¹³ Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy

5. Сопоставление полученных результатов и их распределение в порядке возрастания чувствительности к приоритетному загрязняющему веществу.

Схема наших исследований с указанием используемых тест-организмов представлена на Рис. 2. Согласно приведенному алгоритму, были реализованы экспериментальные блоки исследования и аналитический блок. Далее выстраивались ряды чувствительности биотестов и проводилось обобщение информации.

Анализ чувствительности различных методов биотестирования к минеральным и органическим токсикантам

В настоящей работе мы не приводим промежуточных результатов биотестирования каждой пробы, так как нашей задачей было описание алгоритма целевого выбора биотестов и аналитическое обобщение многих серий экспериментов. Большая часть итогов отдельных опытов опубликована, в том числе сравнение чувствительности биотестов к минеральным формам азота (Олькова и Маханова, 2018), минеральным формам фосфора (Кондакова и др., 2014), нефтепродуктам (Олькова и др., 2017), гербицидам (Олькова

и Березин, 2018), тяжелым металлам (Олькова, 2020).

Результаты экспериментальных и аналитических блоков данной работы представлены в информационно-аналитической Табл. 4, где наглядно показаны методы, не чувствительные к определенному загрязнению, и биотесты, сигнализирующие о загрязнении при наименьших дозах. Чувствительность биотестов распределена по 4 категориям согласно числу сравниваемых методов; основными критериями при этом служили степень реакции организма на испытываемые дозы токсикантов и время её проявления. При увеличении «батареи биотестов» количество уровней чувствительности также будет возрастать.

Результаты, обобщенные в Табл. 4, показывают, что в зависимости от характера загрязнения методы биотестирования могут оказаться как максимально чувствительными, так и не чувствительными к воздействию. Данное условие распространяется в том числе на воздействие токсикантов, имеющих сходные механизмы токсического действия. Так, биотест по биолюминесценции *E. coli* отличался минимальной чувствительностью к солям Cd, Pb, Zn, но в то же время продемонстрировал наибольшую чувствительность к соли Cu по сравнению с другими методами.

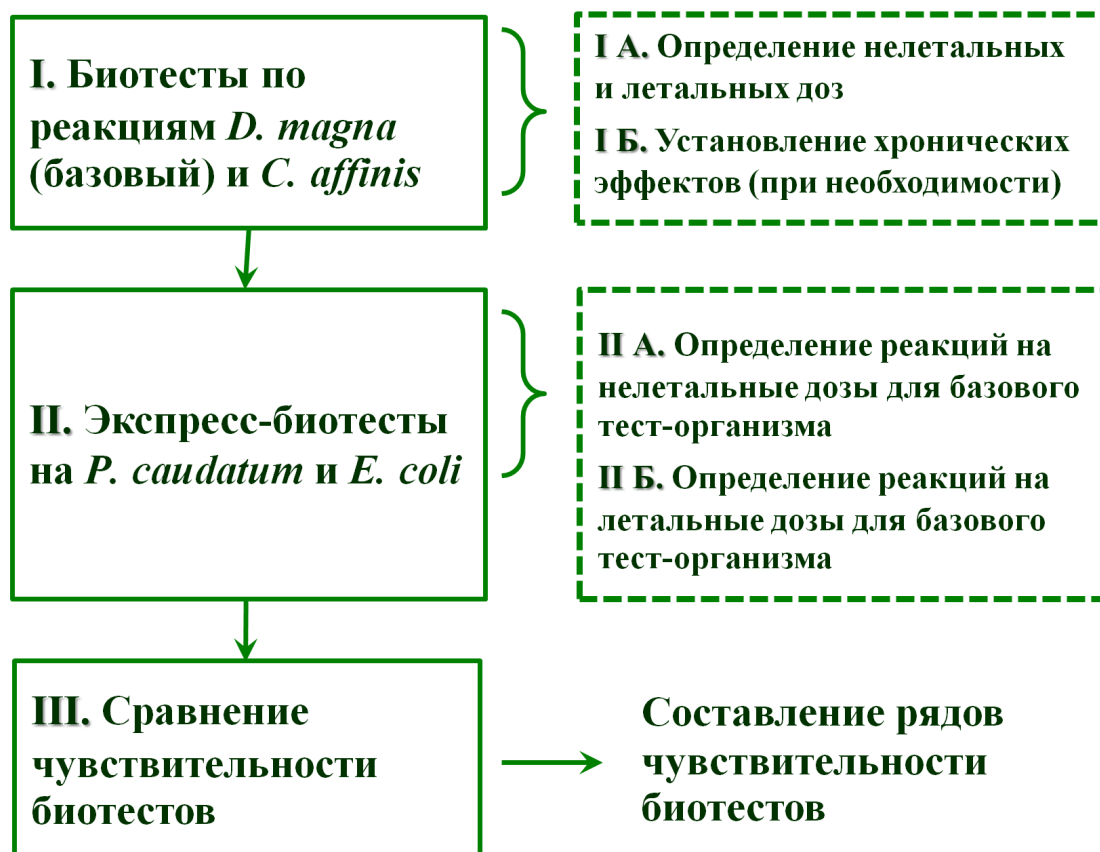


Рис. 2. Блок-схема алгоритма выбора целевого биотеста.

Отметим, что систематически близкие виды низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis* различны по степени проявления чувствительности к испытанным токсикантам. Согласно результатам, обобщенным в данной работе, биотест по смертности *C. affinis* чаще оказывается более предпочтительным, чем использование *D. magna*. В то же время при воздействии Cd и Zn тест по *D. magna* был чувствительнее, чем метод с *C. affinis*.

Полученные сведения еще раз подчеркивают необходимость реализации принципа «батареи биотестов» на этапе предварительных испытаний и обуславливают возможность дальнейшего перехода к использованию целевого метода биотестирования.

Материалы, представленные в Табл. 4, могут служить основой планирования экологических исследований на территориях, подверженных воздействию указанных веществ.

Применение целевого выбора биотестов на реальных пробах

Известно, что современное загрязнение окружающей среды отличается совместным действием нескольких токсикантов, однако каждое промышленное предприятие характеризуется определенным специфическим воздействием – маркером химического следа в окружающей среде (Blais et al., 2015). Проверка «работоспособности» целевых биотестов проводилась нами на территориях, которым свойственны именно такие связи («предприятие (территория исследования) – химический след»).

В данной работе мы описываем отдельный случай перехода от «батареи биотестов» к использованию наиболее чувствительного целевого биотеста на примере исследования урбаноземов, отобранных вблизи предприятия «Электроцинк» (Россия, г. Владикавказ).

Табл. 4. Сравнение чувствительности биотестов к минеральным и органическим токсикантам. Уровень чувствительности биотестов показан знаками и цветом: «+» – минимальная (белый), «++» – средняя (красный), «+++» – высокая (желтый), «++++» – максимальная чувствительность (зеленый).

Токсикант		Биотест / оцениваемая реакция				
		Смертность <i>D. magna</i>	Смертность <i>C. affinis</i>	Биолюминесценция <i>E. coli</i>	Хемотаксис <i>P. caudatum</i>	
Минеральные вещества	Cu	Тяжелые металлы	+	++	++++	+++
	Cd		+++	++	+	++++
	Pb		++	+++	+	++++
	Zn		+++	++	+	++++
	NO ₃ ⁻	Минеральные формы азота	+++	++++	+	++
	NO ₂ ⁻		+++	++++	+	++
	NH ₄ ⁺		+++	++++	++	+
	NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺		+++	++++	+	++
	NO ₂ ⁻ + NH ₄ ⁺		+++	++++	++	+
	(P _x O _y) ^{z-}	Пирофосфаты и фосфаты	+	++	++++	+++
Органические вещества	Имазетапир	Гербициды	+	++	+++	++++
	Имазамокс		+	++	+++	++++
	Нефтепродукты (бензин)		+	++	+++	++++

При помощи атомно-абсорбционной спектроскопии было установлено, что основной особенностью урбаноземов вблизи металлургического предприятия «Электроцинк» является высокий уровень загрязнения тяжелыми металлами (Табл. 5) (Фокина и др., 2016).

Максимальные превышения предельно допустимой концентрации (ПДК) тяжелых металлов в почве наблюдались для цинка и свинца: на разных участках норматив был превышен в 92 и 37.5 раз соответственно. В половине исследуемых проб установлено превышение содержания меди и железа по сравнению с допустимыми нормами.

На основании данных, приведенных в Табл. 4 и 5, была выдвинута гипотеза о том, что результаты биотеста по изменению хемотаксиса *P. caudatum* будут наиболее информативны, а биотест по биолюминесценции *E. coli* можно исключить как нечувствительный к основному фактору токсичности.

В ходе экспериментальной проверки гипотезы водные вытяжки из проб урбаноземов были протестированы с помощью всех четырех испытываемых методик биотестирования. Полученные результаты представлены в Табл. 6.

Пробы оказались токсичны только для инфузорий: в биотесте по изменению их хемотаксиса были получены высокие индексы токсичности. Показателей смертности *D. magna* и *C. affinis*, значимо отличающихся от контрольных значений, установлено не было. Биотест с использованием *E. coli* продемонстрировал стимуляцию биолюминесценции бактериального препарата. Следовательно, выдвинутая гипотеза и данные о разных уровнях чувствительности биотестов верны.

Аналогичным образом при тестировании реальных проб были подтверждены остальные ряды чувствительности биотестов. Следовательно, при необходимости многократного исследования уровня токсичности научный подход выбора целевого метода биотестирования, максимально чувствительного к приоритетному загрязнению, вполне оправдан.

Обсуждение результатов

Любая тестируемая среда – это многокомпонентная система, в которой невозможно исключить контаминацию множества природных веществ и соединений антропогенного происхождения (Altenburger et al., 2018). Однако гипотеза данной работы состояла в том, что для многих территорий, испытывающих антропогенную нагрузку, во-первых, можно установить приоритетное загрязняющее вещество, во-вторых, среди методов, составляющих «батарею биотестов», можно выделить анализ, отличающийся наибольшей чувствительностью к этому загрязнению.

Использование «батареи биотестов» является известным подходом в области биотестирования (Wieczorzak et al., 2016). «Батарея» часто выбирается таким образом, чтобы определять риски, связанные с широким спектром химических загрязнителей и продуктов их трансформации, одновременно позволяя целенаправленно идентифицировать группы соединений, способные вызывать конкретный эффект (De Baat et al., 2019). Указанное исследование поддерживает идею о необходимости установления целевых биотестов.

Табл. 5. Характеристика проб урбаноземов г. Владикавказа (Фокина и др., 2016). «–» – норматив отсутствует; жирным шрифтом выделены значения, превышающие российские нормативы содержания ТМ в почве^{14, 15}.

№ пробы	pH _{вод}	pH _{KCl}	Содержание органического вещества, %	Валовое содержание ТМ, мг/кг				
				Fe	Cu	Ni	Zn	Pb
1	7.02	5.93	2.7 ± 0.5	31000 ± 170	14.5 ± 0.7	28.57 ± 0.24	59 ± 4	35.51 ± 0.10
2	6.55	5.53	7.3 ± 0.7	31800 ± 1000	44.4 ± 0.6	30.1 ± 0.8	1165 ± 12	325.5 ± 11
3	7.31	6.46	11.5 ± 1.1	29660 ± 320	62.5 ± 0.7	31.1 ± 1.5	1468 ± 18	405 ± 7
4	7.60	6.93	11.0 ± 1.1	17080 ± 210	100.5 ± 0.8	28.4 ± 0.9	1985 ± 21	1240 ± 110
5	6.60	6.06	5.0 ± 0.7	35070 ± 360	383.8 ± 1.8	31.6 ± 0.4	3750 ± 90	2760 ± 230
ПДК/ОДК	–	–	–	25000	55	85	100	30

¹⁴ ГН 2.1.7.2041-06. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве.

¹⁵ ГН 2.1.7.2042-06. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве.

Табл. 6. Токсичность проб урбаноземов г. Владикавказа. «*» – стимуляция биолюминесценции; жирным шрифтом выделены значения, соответствующие заключению «проба токсична»; результаты биотестирования по смертности *D. magna* и *C. affinis* являются приемлемыми согласно метрологическим рекомендациям используемых методик.

№ пробы	Биолюминесценция <i>E. coli</i> , Т (y.e.)	Изменение хемотаксиса <i>P. caudatum</i> , Т (y.e.)	Смертность <i>D. magna</i> , %	Смертность <i>C. affinis</i> , %
1	(-39.9 ± 3.0)*	0.45 ± 0.09	3.3	10
2	(-41 ± 9)*	0.43 ± 0.09	0	0
3	(-39.9 ± 3.0)*	0.51 ± 0.01	0	0
4	(-63 ± 5)*	0.32 ± 0.05	0	0
5	(-37.6 ± 1.1)*	0.40 ± 0.05	0	0

Также набирает популярность “Effect-directed analysis” (EDA), направленный на фракционирование пробы и выявление конкретных эффектов каждой фракции (Brennan et al., 2020). Исследователи противопоставляют подходы EDA и «батарею биотестов», называя классические методы биотестирования «нецелевыми» (Oberleitner et al., 2020). Однако мы установили, что возможен переход от «батареи биотестов» к использованию одного наиболее чувствительного метода биотестирования, который будет являться целевым методом лабораторной биодиагностики, направленной на длительное наблюдение за ситуацией. О важности таких разработок сообщается в работе S.J.P. van den Berg с соавторами (2021): оценка рисков может в наибольшей степени выиграть от описания чувствительности на основе экологически значимых и надежных эффектов.

Выбор целевого биотеста не может быть основан только на теории или данных для близкородственных видов. Например, согласно принципам общей (Gupta, 2016) и водной токсикологии (Nikinmaa, 2014) можно было бы предположить, что одноклеточные организмы всегда окажутся чувствительнее многоклеточных, и устойчивость организмов будет увеличиваться по мере их усложнения. Однако обсуждаемые результаты свидетельствуют об обратном: *C. affinis* и *D. magna* проявили максимальную и высокую чувствительность к загрязнению воды минеральными формами азота, а одноклеточные *P. caudatum* и *E. coli* обнаружили ответные реакции средней и минимальной степени соответственно. Такая инверсия общей токсикологической закономерности не редкость. В исследовании детоксикации фосфорорганических и N-метилкарбаматных пестицидов показано, что печень крысы *in vitro* обладает большим детоксикационным потенциалом, чем образцы клеток печени человека (Animal models in toxicology, 2016). В ходе опыта по

оценке острой токсичности ионных жидкостей на основе нитрата 1-алкил-3-метилимидазолия рачки *D. magna* оказались чувствительнее зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer (Zhang et al., 2017). В случае диагностики загрязнения нитратами, нитритами и ионами аммония значение низших ракообразных еще больше увеличивается, если учесть, что у них оценивалась смертность, а для одноклеточных учитывались сублетальные реакции.

В представленной работе предложено выбрать целевой биотест по алгоритму, основанному на определении концентраций токсиканта, являющихся летальными и нелетальными для базового тест-организма *D. magna*. Далее «батарея биотестов» должна увеличиваться в соответствии с возможностями и задачами исследования. По итогам предварительных лабораторных испытаний устанавливается ряд, отражающий рост чувствительности биотестов к приоритетному загрязняющему веществу. Этап подтверждения высокой чувствительности целевого биотеста по сравнению с другими методами при тестировании реальных проб также является обязательным.

Предлагаемый подход выбора целевого биотеста имеет важное ограничение: территория исследования должна характеризоваться наличием приоритетного загрязняющего вещества, эффекты которого значительно больше, чем влияние на живые организмы других токсикантов.

Заключение

В результате проведения серии экспериментов нами была обоснована эффективность целевого выбора биотестов с использованием универсального алгоритма для определения наиболее чувствительных и предпочтительных методов биотестирования природных и антропогенных сред, загрязненных минеральными и органическими токсикантами.

Апробация алгоритма проведена на модельных и естественных средах, загрязненных минеральными соединениями азота и фосфора, солями тяжелых металлов (Cu, Zn, Pb, Cd), нефтепродуктами (бензином), гербицидами имазетапиром и имазамоксом. Экспериментально определены ряды чувствительности биотестов, основанные на реакциях *D. magna*, *C. affinis*, *P. caudatum* и *E. coli*. В итоге установлено, что тесты по смертности *D. magna* и *C. affinis* наиболее чувствительны к загрязнению минеральными соединениями азота. Тест по снижению биолюминесценции *E. coli* оказался предпочтителен при действии минеральных солей Cu, фосфатов и пиродифосфатов. В условиях загрязнения водной среды минеральными солями Cd, Pb, Zn, нефтепродуктами, органическими гербицидами имазетапиром и имазамоксом следует использовать тест по снижению хемотаксической реакции *P. caudatum*.

Для удобства реализации алгоритма выбора биотестов составлена таблица, которая может служить опорным материалом при планировании экологических исследований на территориях, подверженных действию испытанных веществ.

Предложенная стратегия биотестирования, включающая предварительный целевой выбор биотестов, предназначена для использования непосредственно перед масштабными и/или долгосрочными экологическими исследованиями, в том числе при выполнении биодиагностической части программ экологического мониторинга. Процедура позволяет выбирать методы биотестирования, максимально чувствительные к наиболее распространенным и опасным загрязняющим веществам в районе исследования и ориентироваться на них при интерпретации результатов.

ORCID

А.С. Олькова  [0000-0002-5798-8211](https://orcid.org/0000-0002-5798-8211)

Список литературы

- Кондакова, Л.В., Домрачева, Л.И., Огородникова, С.Ю., Кудряшов, Н.А., Олькова, А.С., Ашихмина, Т.Я., 2014. Биоиндикационные и биотестовые реакции организмов на действие метилфосфонатов и пиродифосфата натрия. *Теоретическая и прикладная экология* 4, 63–69.
- Олькова, А.С., 2020. Разработка стратегии биотестирования водных сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Владимир, Россия, 358 с.
- Олькова, А.С., Березин, Г.И., 2019. Исследование чувствительности аттестованных биотестов к загрязнению вод современными гербицидами: модельные эксперименты. *Вода и экология: проблемы и решения* 2 (78), 111–119. <http://www.doi.org/10.23968/2305-3488.2019.24.2.111-119>
- Олькова, А.С., Маханова, Е.В., 2018. Выбор биотестов для экологических исследований вод, загрязненных минеральными формами азота. *Вода и экология: проблемы и решения* 4 (76), 70–81. <http://www.doi.org/10.23968/2305-3488.2018.23.4.70-81>
- Олькова, А.С., Зимонина, Н.М., Лялина, Е.И., Бобрецова, В.Р., 2017. Диагностика локального загрязнения урбаноземов в районах автозаправочных станций. *Теоретическая и прикладная экология* 1, 56–62.
- Фокина, А.И., Домрачева, Л.И., Олькова, А.С., Скугорева, С.Г., Лялина, Е.И., Березин, Г.И., Даровских, Л.В., 2016. Исследование токсичности проб урбаноземов, загрязненных тяжелыми металлами. *Известия Самарского научного центра академии наук* 18 (2 (2)), 544–550.
- Altenburger, R., Scholze, M., Busch, W., Escher, B., Jakobs, G. et al., 2018. Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays. *Environment International* 114, 95–106. <http://www.doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.013>
- Animal models in toxicology, 2016. Gad, S.C. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1152 p.
- Blais, J.M., Rosen, M.R., Smol, J.P. (eds.), 2015. Environmental contaminants: using natural archives to track sources and long-term trends of pollution (Developments in Paleoenvironmental Research. Vol. 18). Springer, Netherlands, 509 p. <http://www.doi.org/10.1007/978-94-017-9541-8>
- Brennan, J.C., Gale, R.W., Alvarez, D.A., Berninger, J.P., Leet, J.K. et al., 2020. Factors affecting sampling strategies for design of an effects-directed analysis for endocrine-active chemicals. *Environmental toxicology and chemistry* 39 (7), 1309–1324. <http://www.doi.org/10.1002/etc.4739>
- Castillo, G., Schafer, L., 2000. Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: A

- Chilean experience. *Environmental toxicology* **15** (4), 331–337. [http://www.doi.org/10.1002/1522-7278\(2000\)15:4<331::AID-TOX9>3.0.CO;2-E](http://www.doi.org/10.1002/1522-7278(2000)15:4<331::AID-TOX9>3.0.CO;2-E)
- Chapman, E.E.V., Hemer, S.H., Dave, G., Murimboh, J.D., 2012. Utility of bioassays (lettuce, red clover, red fescue, Microtox, MetSTICK, Hyalella, bait lamina) in ecological risk screening of acid metal (Zn) contaminated soil. *Ecotoxicology and environmental safety* **80**, 161–171. <http://www.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.025>
- De Baat, M.L., Kraak, M.H.S., Van der Oost, R., De Voogt, P., Verdonshot, P.F.M., 2019. Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. *Water research* **159**, 434–443. <http://www.doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.040>
- Gupta, P.K., 2016. Fundamentals of toxicology: essential concepts and applications. Academic Press, London, UK, 398 p.
- Morisseau, C., Merzlikin, O., Lin, A., He, G.C., Feng, W. et al., 2009. Toxicology in the fast lane: application of high-throughput bioassays to detect modulation of key enzymes and receptors. *Environmental health perspectives* **117** (12), 1867–1872. <http://www.doi.org/10.1289/ehp.0900834>
- Nikinmaa, M., 2014. An introduction to aquatic toxicology. Academic Press, London, UK, 252 p.
- Oberleitner, D., Stutz, L., Schulz, W.G., Bergmann, A., Achten, C., 2020. Seasonal performance assessment of four riverbank filtration sites by combined non-target and effect-directed analysis. *Chemosphere* **261**, 127706. <http://www.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127706>
- Pandey, L.K., Lavoie, I., Morin, S., Depuydt, S., Lyu, J. et al., 2019. Towards a multi-bioassay-based index for toxicity assessment of fluvial waters. *Environmental Monitoring and Assessment* **191** (2), 112. <http://www.doi.org/10.1007/s10661-019-7234-5>
- Ramezanpoor, M., Salehian, H., Babanezhad, E., Rezvani, M., 2021. The leaching of atrazine and plant species sensitivity to atrazine using bioassays and chemical analyses. *Soil and Sediment Contamination* **31** (4), 456–467. <http://www.doi.org/10.1080/15320383.2021.1963667>
- Schuijt, L.M., Peng, F.J., van den Berg, S.J.P., Dingemans, M.M.L., Van den Brink, P.J., 2021. (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. *Science of the Total Environment* **795**, 148776. <http://www.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>
- Van den Berg, S.J.P., Maltby, L., Sinclair, T., Liang, R.Y., van den Brink, P.J., 2021. Cross-species extrapolation of chemical sensitivity. *Science of the Total Environment* **753**, 141800. <http://www.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141800>
- Wieczorzak, M., Namiesnik, J., Kudlak, B., 2016. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. *Environment International* **94**, 341–361. <http://www.doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.017>
- Zhang, C., Zhang, S., Zhu, L.S., Wang, J.H., Wang, J., Zhou, T., 2017. The acute toxic effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium nitrate ionic liquids on *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* **229**, 887–895. <http://www.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.055>

Article

The procedure for selecting bioassays for different types of pollution

Anna S. Olkova 

Vyatka State University, ul. Moskovskaya 36, Kirov, 610000 Russia

morgan-abend@mail.ru

Annotation. The algorithm is suggested for selecting most appropriate and sensitive bioassay method to a particular type of pollution prevailing in the study area. The algorithm bases on a battery of bioassays, which necessarily includes mortality test for *Daphnia magna* Straus, 1820. Other approaches for comparing sensitivity of methods are selected for particular aim. The algorithm has been tested in model and for in situ samples. According to the proposed algorithm, the mortality tests for *D. magna* and *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, 1900 are enough informative to assess the pollution by mineral nitrogen compounds. When prevailing contamination are mineral salts of Cu, phosphates, and pyrophosphates, a bioluminescent test with *Escherichia coli* Migula, 1895 has the maximum sensitivity. If the aquatic environment is polluted by Cd, Pb, Zn, oil products, organic herbicides imazetapir and imazamox, chemotactic response reduction test with *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838 is the most sensitive. The proposed algorithm is general, but it should only be used when the prevailing contaminant is known, and its effects predominate over the effects of other compounds in the sample.

Keywords: bioassay methodology, selection of bioassays, test organism, pollution sensitivity, prevailing pollution, environmental monitoring