

*На правах рукописи*



Олькова Анна Сергеевна

**РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ВОДНЫХ СРЕД  
С УЧЕТОМ МНОГОФАКТОРНОСТИ  
ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ТЕСТ-ОРГАНИЗМОВ**

**03.02.08 – Экология (биология)**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Киров – 2020 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Вятский государственный университет»

Научный консультант: доктор технических наук, профессор  
**Ашихмина Тамара Яковлевна**

Официальные оппоненты: **Тихомирова Елена Ивановна**  
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», заведующий кафедрой «Экология»

**Пономарев Всеволод Алексеевич**  
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия имени Д. К. Беляева», профессор кафедры агрохимии и землеустройства

**Степанова Надежда Юльевна**  
доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», профессор кафедры прикладной экологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_\_ ч. на заседании диссертационного совета Д 212.025.07 при ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых» по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, 87, ВлГУ, корп. 1, ауд. 335.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВлГУ и на сайте <http://diss.vlsu.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, можно присылать по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького, 87, ВлГУ, кафедра биологии и экологии.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Кулагина Екатерина Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В сложившейся антропогенной ситуации востребованы методы, направленные на оценку токсичности химических веществ, их обнаружения в окружающей среде, а также биоте, на оценку влияния поллютантов на живые системы разного уровня, разработку способов ремедиации загрязненных экосистем т. д. (Филенко, 2007; Degetto et al., 2014; Weissmannová, Pavlovský, 2017). Современные методы биотестирования позволяют решать эти и многие другие экологические задачи.

В области биотестирования главенствует позиция получения информативных и экологически значимых результатов за счет увеличения «батареи биотестов». При этом принципы «Effect-directed analysis (EDA)» – эффективно направленного анализа, декларируют не только использование набора биотестов, но и целевой выбор наиболее чувствительных из них (Brack et al., 2016). При регулярных экологических исследованиях в условиях установленного основного фактора токсичности такой подход необходим, однако алгоритмы его реализации до сих пор не описаны.

Обсуждается методологическая проблема биотестирования, сводящаяся к тому, что «редко, когда 2–3 суточные опыты адекватно характеризуют биологическую и экологическую угрозу конкретного загрязнения» (Филенко, Терехова, 2016). Следовательно, необходима стратегия биотестирования, сочетающая в себе оперативность диагностики загрязнения и информативность в части прогнозирования экологически значимых последствий эффектов действия токсикантов в окружающей среде. Эта задача особенно актуальна в случае контаминации и ассоциированном действии различных веществ.

Воспроизводимость и достоверность результатов биотестирования зависит от тест-организмов – «датчиков» уровня токсичности оцениваемой среды. Их современная стандартизация ограничивается точным определением биологического вида и калибровкой организмов по чувствительности к модельным токсикантам (Terekhova et al., 2018). Проблема более строгой стандартизации и контроля пригодности тест-культур для целей биотестирования не решена.

Кроме того, получение объективных и достоверных результатов биотестирования зависит от множества факторов реализации биотестов: свойств тестируемой среды, особенностей выбранных тест-организмов и оцениваемых тест-функций, условий и алгоритмов проведения экспериментов (Брагинский, 1975; Строганов, 1988; Animal Models in Toxicology, 2016; In Vitro Environmental Toxicology, 2017). Недостаточность внимания и учета этих аспектов, каждый из

которых в свою очередь крайне многогранен, могут привести к накоплению систематических ошибок, приводящих, как минимум, к получению малоинформативных данных и, в максимальном выражении, – к общему недоверию методам биотестирования из-за противоречивых результатов, полученных с использованием разных биотестов (Олькова, 2018; Olkova, 2018).

Таким образом, методология биотестирования требует дальнейшего развития. Под методологией биотестирования нами понимается совокупность научно обоснованных подходов к содержанию и стандартизации тест-организмов, выбору тест-организмов в аспекте особенностей тестируемой среды и специфики токсикантов, объективной оценке наблюдаемых тест-функций, интерпретации полученных ответных реакций.

**Цель работы:** теоретическое и экспериментальное обоснование стратегии биотестирования водных сред, направленной на получение экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи:**

1. Обосновать эффективность целевого выбора биотестов с использованием универсального алгоритма, для определения наиболее чувствительных и предпочтительных методов биотестирования водной среды, загрязненной минеральными и органическими токсикантами.

2. В целях диагностики загрязнения водных сред различными веществами, обосновать использование *D. magna* в качестве базового тест-организма по критериям оптимальных условий его культивирования и многообразия тест-функций.

3. Экспериментально определить ряды чувствительности четырех аттестованных методов биотестирования на основе реакций тест-организмов *Daphnia magna* Straus, *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, *Paramecium caudatum* Ehrenberg и *Escherichia coli* штамм М-17 применительно к различным токсикантам на примере солей тяжелых металлов, азота и фосфора, а также гербицидов, нефтепродуктов и фталатов.

4. Разработать стратегию биотестирования водных сред, сочетающую в себе получение оперативного ответа о токсичности тестируемой среды и определение экологически значимых эффектов загрязняющих веществ в условиях неустановленного фактора токсичности, в том числе при ассоциированном действии веществ.

5. На примере *D. magna* выявить условия стандартизации тест-культур для определения их пригодности к биоанализам по расширенному перечню критериев здоровья тест-организмов.

6. Экспериментально установить влияние факторов культивирования на основные параметры жизнедеятельности модельных групп *D. magna* и выявить среди них оперативные и пожизненные критерии благополучия тест-организмов.

7. Разработать функциональную модель научно-обоснованной стратегии для планирования и проведения биотестирования, как вспомогательного инструмента управления качеством биоанализов.

**Научная новизна работы.** Впервые предложена альтернатива «батареи биотестов» – главенствующему подходу в планировании и применении методов биотестирования, которая заключается в качественном переходе от увеличения числа биотестов к стратегии научно-обоснованного выбора методов биотестирования и использования надежных стандартизированных тест-культур.

На основе экспериментов, выполненных по унифицированному алгоритму, проведен сравнительный анализ чувствительности четырех аттестованных методик биотестирования к приоритетным по распространенности и опасности экотоксикантам минеральной и органической природы. Показано, что для периодической диагностики установленного фактора токсичности эффективен предварительный выбор максимально чувствительного биотеста, а не увеличение их числа.

Впервые предложена диагностика экологически значимых эффектов при неустановленном факторе токсичности по единому, базовому, тест-организму *Daphnia magna* Straus (1820). При исследовании спектра откликов *D. magna* установлено, что тест-функция двигательной активности сигнализирует о токсическом действии веществ в нелетальных дозах наиболее оперативно (от 1 часа экспозиции). Дальнейшая оценка реакций *D. magna* в течение жизненного цикла опытных особей, а также второго и третьего опытных поколений, позволяет выявлять летальные, сублетальные и отсроченные во времени эффекты токсикантов. Это определяет целесообразность и научную ценность использования стратегии сочетания экспресс-биотестирования и системного биотестирования.

На примере лабораторных культур *D. magna* впервые в экспериментах показано, что тест-организмы, удовлетворяющие требованиям чувствительности к эталонному токсиканту, могут значительно различаться по другим критериям благополучия, объединенных в понятие «здоровье тест-организмов». Таким образом, доказана необходимость новой стратегии стандартизации тест-культур и определения их пригодности к биоанализам.

Установлены оперативные и пожизненные критерии здоровья *D. magna*, выявлены их качественные и количественные ориентиры.

**Теоретическое значение работы.** Проведена систематизация современных научных данных в области биотестирования, раскрывающих влияние различных факторов на результаты биотестов. Предложено определение понятия «методология биотестирования», введены новые понятия – «базовый тест-организм» и «здоровье тест-организмов». Предложенная и апробированная стратегия планирования и проведения исследований с использованием биотестов вносит вклад в развитие современной методологии биотестирования.

**Практическая значимость результатов работы.** Предложенная в работе стратегия планирования и проведения биотестирования направлена на получение достоверных и экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред. Комплекс разработок является универсальным – может использоваться для всей группы методов, применяться для любых тест-систем и организмов.

Результаты работы используются при обучении студентов бакалавриата и магистратуры по направлению «Экология и природопользование».

**Соответствие паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют шифру специальности 03.02.08 – экология, конкретной области – прикладная экология – разработка принципов и практических мер, направленных на охрану живой природы как на видовом, так и на экосистемном уровне; разработка принципов создания искусственных экосистем (агроэкосистемы, объекты аквакультуры и т. п.) и управление их функционированием.

#### **Основные положения и результаты, выносимые на защиту:**

1. В целях получения экологически значимых оценок токсичности водных сред необходимо перейти от увеличения числа выполняемых биотестов к стратегии планирования и проведения биотестирования с учетом факторов, влияющих на ответные реакции тест-организмов.

2. Диагностику влияния установленного основного фактора токсичности более эффективно проводить не увеличением «батареи биотестов», а путем предварительного целевого выбора наиболее чувствительных методов биотестирования.

3. При неустановленном факторе токсичности, сформированном одним или несколькими веществами, экологически значимые эффекты токсикантов необходимо определять системным биотестированием, включающем оценку спектра откликов базового тест-организма.

4. Стандартизация тест-культуры и определения её пригодности к биоанализам должна включать контроль ключевых критериев здоровья культуры с учетом факторов химического состава культивационной воды и биоритмов тест-организмов.

5. Стратегия планирования и проведения биотестирования, включающая целевой выбор биотестов, системное биотестирование по спектру ответных реакций тест-организмов, стандартизацию тест-культур по научно обоснованным критериям, позволяет учитывать основные факторы, влияющие на результат оценки токсичности водной среды.

**Обоснованность и достоверность научных результатов** обеспечена результатами, полученными в аккредитованной лаборатории с подразделениями физико-химического анализа и биотестирования. Часть результатов апробирована и внедрена в других лабораториях и научных институтах, о чем имеются акты. Математическая обработка данных выполнялась стандартными методами, вычисляя среднее арифметическое ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $S$ ). Достоверность различий оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента с учетом уровня значимости ( $p$ ), рассчитанного для двух сравниваемых значений (в программном продукте Microsoft Excel).

**Апробация работы.** Основные положения и результаты исследований ежегодно докладывались научному сообществу на Всероссийских и Международных конференциях: Всероссийских научно-практических конференциях «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2006-2018 гг.), Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные достижения в почвоведении, экологии, сельском хозяйстве на пути к инновациям» (Москва, 2008), III Всероссийской конференции с международным участием «Химическое разоружение – 2009: итоги и аспекты технологических решений, экоаналитического контроля и медицинского мониторинга «СНЕМДЕТ-2009» (Ижевск, 2009), Всероссийской конференции «Экотоксикология-2009» (Пушино, 2009), Всероссийской конференции «Инновации в геоэкологии: теория, практика, образование» (Москва, 2010), II международной научно-практической конференции «Современные проблемы безопасности жизнедеятельности: теория и практика» (Казань, 2012), Всероссийских конференциях с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2011-2014), 17-й, 18-й и 19-й международных конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2013-2015), XIII международной научно-практической экологической конференции «Биоразнообразие и устойчивость живых систем» (Белгород, 2014), XXVI Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Казань, 2014), V всероссийской

конференции по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б. А. Флерова (Борок, 2014), Всероссийской научной конференции «Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам» (Киров, 2015), Международном симпозиуме и школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии» (Москва, 2016) и многих других конференциях.

**Личный вклад автора в решение проблемы** заключался в выявлении научно-прикладных проблем биотестирования на собственном опыте работы в сфере токсикологических анализов, в дальнейшем выборе и теоретическом обосновании направлений и тематики исследований, предложении и апробации новой стратегии биотестирования, планировании и выполнении основного объема эксперимента, обсуждении, интерпретации и обобщении полученных данных, подготовке публикаций по выполненной работе.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 95 работ, из них 3 учебно-методические работы, 9 статей, входящих в международные базы научного цитирования, 29 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, 1 патент, материалов конференций, тезисов – 53.

**Структура диссертационной работы.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и выводов, приложений. В списке литературы 419 источников, в том числе 147 на иностранных языках. Общий объем диссертации 358 страниц, из них 265 страниц основного текста, 60 таблиц и 23 рисунка.

## **КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ГЛАВА 1. БИОТЕСТИРОВАНИЕ В ОХРАНЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

В главе 1 обобщены и систематизированы современные научные данные о биотестировании, включая анализ тенденций развития методологии биотестирования. Рассмотрены факторы, влияющие на результат биотестирования. Даны характеристики тест-организмов, используемых в работе. Сформулированы понятия методологии биотестирования, здоровья тест-организмов и базового тест-организма. Показано, что в методологии биотестирования остаются не решенными следующие вопросы: не проводится целевой выбор биотестов; приближение результатов биотестирования к оценке экологически значимых эффектов токсикантов в окружающей среде; отсутствие строгой стандартизации тест-организмов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основе работы оригинальные материалы, собранные в результате многолетних (2006–2019 гг.) лабораторных и полевых экспериментальных исследований автора. Лабораторные опыты выполнены на базе аккредитованной Научно-исследовательской экоаналитической лаборатории Вятского государственного университета (г. Киров). Пробы нативных сред – природных вод и почв – отбирались на территориях воздействия объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» (Кировская обл.), комплекса химических предприятий г. Кирово-Чепецка (Кировская обл.), завода «Электроцинк» (г. Владикавказ). Пробы анализировались современными физико-химическими методами, аттестованными и предложенными в работе методами биотестирования.

## ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ СТРАТЕГИИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С УЧЕТОМ МНОГОФАКТОРНОСТИ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ТЕСТ-ОРГАНИЗМОВ

### 3.1. Целевой выбор биотестов для диагностики установленного основного фактора токсичности

#### 3.1.1. Алгоритм предварительного целевого выбора биотестов для экологических исследований

В ситуации, когда известен основной фактор токсичности – вещество, эффекты которого превалируют над действием других соединений, находящихся в тестируемой среде, нами предлагается проводить диагностику загрязнения по наиболее чувствительному биотесту, устанавливаемому в предварительных испытаниях по алгоритму:

1. Установление нелетальных и летальных доз исследуемого вещества для базового тест-организма *D. magna* в биотесте по смертности особей без определения среднелетальной концентрации токсиканта, что значительно сокращает объём работы.

2. Определение реакций не менее трех других тест-организмов на дозы вещества, оказывающие летальное и нелетальное действие на *D. magna*.

3. Сопоставление результатов разных биотестов и распределение по чувствительности к интересующему веществу.

4. Установление дополнительных токсических эффектов действия вещества у использованных организмов для разграничения близкой чувствительности биологических видов. Процедура является не обязательной.

На рисунке 1 представлена схема апробации алгоритма.



Рисунок 1 – Схема ранжирования чувствительности четырех биотестов

Алгоритм реализован на нескольких веществах (рис. 2).



Рисунок 2 – Группы токсикантов для апробации алгоритма выбора биотестов

Далее представлены результаты работы с выбранными веществами согласно предложенному алгоритму.

### 3.1.2. Разработка и апробация рядов чувствительности биотестов к минеральным веществам: соединениям тяжелых металлов, азота и фосфора

#### *Чувствительность биотестов к солям тяжелых металлов (ТМ).*

Модельные эксперименты проведены с использованием солей:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . В качестве исходной водной среды использовали воду питьевого качества, контроль – вода без добавок.

В биотесте по смертности *D. magna* установили, что летальные и нелетальные концентрации солей Cu, Cd, Pb и Zn в расчете на ионы металлов находятся в диапазоне концентраций соответствующих 1–10 ПДКр.х. При воздействии солей кадмия и цинка нарастание эффектов у дафний и цериодафний было одинаковым. Медь и свинец действовали на *C. affinis* сильнее, чем на *D. magna* (табл. 1).

В отношении трех солей металлов, – Cd, Pb, Zn, бактерии *E. coli* оказались значительно устойчивее, чем *P. caudatum*. При загрязнении среды медью наиболее предпочтительным тест-организмами признаны *E. coli* (табл. 1).

Ряды чувствительности биотестов к металлам в водной среде оказались следующими:

– к меди: биоллюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*;

– к кадмию: биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *D. magna* = биотест по гибели *C. affinis* > биоллюминесцентный тест на *E. coli*;

– к свинцу: биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биоллюминесцентный тест на *E. coli*;

– к цинку: биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *D. magna* = биотест по гибели *C. affinis* > биоллюминесцентный тест на *E. coli*.

Таким образом, при опасности загрязнения водных сред ТМ целесообразно ориентироваться на тест по *P. caudatum*. Биотесты по гибели низших ракообразных проявили среднюю чувствительность. Реакция бактерий *E. coli* на воздействие соединений Cd, Pb, Zn минимальна, при этом на Cu – максимальна.

Таблица 1 – Результаты биотестов при загрязнении водной среды ТМ

Оценка тест- реакции	Токсиканты и их концентрации (кратности превышения ПДКр.х.)											
	Cu <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>			Cd <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>			Pb <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>			Zn <sup>2+</sup> , мг/дм <sup>3</sup>		
	0,001 (1 ПДК)	0,005 (5 ПДК)	0,01 (10 ПДК)	0,005 (1 ПДК)	0,025 (5 ПДК)	0,05 (10 ПДК)	0,006 (1 ПДК)	0,03 (5 ПДК)	0,06 (10 ПДК)	0,01 (1 ПДК)	0,05 (5 ПДК)	0,1 (10 ПДК)
Смертность* <i>D. magna</i> , %	0	100	100	0	83,3	100	3,3	10	16,7	0	83,3	100
Смертность* <i>C. affinis</i> , %	40	70	100	0	80	100	30	40	100	0	80	100
Индекс Т по <i>E. coli</i> , у.е., группа токсичности	78,9±23,7 III	73,6±22,1 III	85,3±16,2 III	0 I	0 I	23,5±6,1 II	0 I	0 I	6,1±1,8 I	0 I	0 I	0 I
Индекс Т по <i>P. caudatum</i> , у.е., группа токсичности	0,58±0,05 II	0,82±0,04 III	0,94±0,05 III	0,93±0,04 III	0,95±0,03 III	0,97±0,02 III	0,45±0,04 II	0,47±0,02 II	0,58±0,05 II	0,22±0,04 I	0,43±0,08 II	0,72±0,1 III

Примечание: \* - погрешность в пределах норматива методик (ФР 1.39.2007.03221. 2007; ФР.1.39.2007.03222. 2007); группы токсичности для теста по *P. caudatum*: гр. I – допустимая степень токсичности, гр. II – умеренная степень токсичности, гр. III – высокая степень токсичности; группы токсичности для теста по *E. coli*: гр. I – проба не токсична, гр. II – проба средне токсична, гр. III – проба сильно токсична.

**Чувствительность тест-организмов к минеральным соединениям азота.** Моделировалось загрязнение природной воды нитратом натрия, нитритом натрия и хлоридом аммония. Концентрации веществ равные 5 и 10 ПДКр.х. оказались нелетальны для *D. magna* и *C. affinis*, при этом цериодафнии оказались чувствительнее дафний по тест-функции «плодовитость». Угнетение тест-функций *E. coli* и *P. caudatum* в указанных дозах вызвало только аммонийное загрязнение.

Биотестирование растворов с концентрациями соединений азота, соответствующих 25–100 ПДКр.х. по действующему иону показало, что для низших ракообразных такие дозы в большинстве случаев летальны. Анализ времени гибели рачков подтвердил большую чувствительность *C. affinis* по сравнению с *D. magna* (табл. 2).

Тест-организмы, используемые в экспресс-биотестах, оказались устойчивее к воздействию соединений азота. Например, в тесте на *E. coli* наблюдали стимуляцию тест-функции при увеличении концентрации нитрат-ионов до 200 ПДКр.х. У *P. caudatum* снижение хемотаксиса наблюдали, начиная с дозы равной 50 ПДКр.х. (табл. 2).

В условиях раздельного воздействия нитрат- и нитрит-ионов на организмы соблюдается ряд чувствительности биотестов: биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биолюминесцентный тест на *E. coli*. При загрязнении солями аммония: биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum*.

При совместном загрязнении водной среды нитрат-ионами и солями аммония соблюдается ряд: биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биолюминесцентный тест на *E. coli*. При комплексном загрязнении нитрит-ионами и солями аммония: биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum*.

**Таблица 2 – Результаты биотестирования природной воды с добавками соединений азота  
в дозах от 25 до 100 ПДКр.х. по действующему иону**

Вариант	Нитрат-ион, ПДК			Нитрит-ион, ПДК			Ион аммония, ПДК		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100
Смертность <i>D. magna</i> , %	66,7	100 (5 ч.)	100 (1 ч.)	100 (3 ч.)	100 (0,5 ч.)	100 (0,25 ч.)	100 (2 ч.)	100 (0,25 ч.)	100 (10 мин.)
Смертность <i>C. affinis</i> , %	100 (3 ч.)	100 (1 ч.)	100 (0,25 ч.)	100 (5 ч.)	100 (2 ч.)	100 (1 ч.)	100 (15 мин.)	100 (10 мин.)	100 (5 мин.)
Индекс Т по <i>E. coli</i> , у.е./ группа токсичности	0 (-44,5±8,4) I	0 (-112,9±12,8) I	0 (-113,9±10,3) I	7,8±1,6 I	8,6±1,7 I	13,1±1,5 I	60,4 ± 4,0 III	69,1 ± 5,3 III	60,7 ± 6,6 III
Индекс Т по <i>P. caudatum</i> , у.е./ группа токсичности	0 (-0,35±0,15) I	0,15±0,05 I	0,34±0,08 I	0 (-0,40±0,1) I	0,1±0,02 I	0,20±0,05 I	0,61±0,1 II	0,75±0,09 III	0,77±0,2 III

Примечание: \* - погрешность в пределах норматива методик (ФР 1.39.2007.03221. 2007; ФР.1.39.2007.03222. 2007); обозначение групп токсичности указано в примечании к табл. 1.

### Чувствительность биотестов к минеральным соединениям фосфора.

Модельными токсикантами были  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (пирофосфат натрия) и  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (фосфат натрия). Растворы содержали одинаковое количество фосфат- и пирофосфат-ионов (моль/дм<sup>3</sup>), поскольку параллельно с определением чувствительности биотестов, решалась задача сравнения токсичности фосфатов и пирофосфатов.

Острая токсичность для *D. magna* по показателю гибели более 50% особей наблюдалась при добавке фосфат-ионов в количестве  $5,3 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>, что соответствует дозе 2 г/дм<sup>3</sup> фосфата натрия. В опыте с пирофосфатами летальность достигалась при еще большей дозе. Установлено, что *C. affinis* чувствительнее *D. magna* к минеральным соединениям фосфора (табл. 3).

**Таблица 3 – Токсичность соединений фосфора в биотестах с низшими ракообразными**

Концентрация токсиканта, моль/дм <sup>3</sup>	Смертность* <i>D. magna</i> , %		Смертность* <i>C. affinis</i> , %	
	Фосфат натрия	Пирофосфат натрия	Фосфат натрия	Пирофосфат натрия
$1,1 \cdot 10^{-3}$	0	0	0	0
$1,3 \cdot 10^{-3}$	0	0	0	25
$2,6 \cdot 10^{-3}$	6,7	10	10	30
$4,0 \cdot 10^{-3}$	12	30	20	100
$5,3 \cdot 10^{-3}$	30	60	40	100
$10,0 \cdot 10^{-3}$	73,3	100	100	100

Примечание: \* - погрешность в пределах норматива методик (ФР 1.39.2007.03221. 2007; ФР.1.39.2007.03222. 2007).

Для опытов с микроорганизмами добавки солей уменьшали, так как была установлена их повышенная чувствительность к солям фосфора (табл. 4).

**Таблица 4 – Оценка токсичности соединений фосфора по экспресс-биотестам**

Концентрация действующих анионов, моль/дм <sup>3</sup>	Индексы токсичности растворов Т, у.е. / группа токсичности					
	Свежеприготовленные растворы		Через 48 часов		Через 96 часов	
	Фосфат натрия	Пирофосфат натрия	Фосфат натрия	Пирофосфат натрия	Фосфат натрия	Пирофосфат натрия
Тест на <i>P. caudatum</i>						
Минимальная $0,3 \cdot 10^{-3}$	0,29±0,04 I	0 I	0,16±0,01 I	0 I	0 I	0 I
Максимальная $1,1 \cdot 10^{-3}$	0,89±0,02 III	0,85±0,03 III	0,67±0,07 II	0,80±0,05 III	0,47±0,06 II	0,78±0,04 III
Тест на <i>E. coli</i>						
Минимальная $2,6 \cdot 10^{-5}$	13,8±2,7 I	6,1±1,2 I	0,0 I	0,0 I	0,0 I	0,0 I
Максимальная $5,3 \cdot 10^{-5}$	41,3±81 III	25,3±4,9 II	18,7±3,7 I	13,4±2,6 I	14,7±2,9 I	13,5±2,6 I

Примечание: 1 – фосфат натрия; 2 – пирофосфат натрия; обозначение групп токсичности указаны в примечании к табл. 1.

Также показано, что токсичность растворов снижается во времени в результате гидролиза солей: например, для пирофосфата натрия в биотесте с *P. caudatum* через 48 ч. в 1,3–1,8 раз, через 96 ч. тенденция сохраняется.

Выявленные закономерности подтверждены в условиях полевого опыта. Итоговый ряд чувствительности биотестов к минеральным соединениям фосфора: биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*.

### 3.1.3. Разработка и апробация рядов чувствительности биотестов к водным средам, содержащим органические вещества: гербициды, нефтепродукты, фталаты

**Чувствительность биотестов к гербицидам.** Чувствительность низших ракообразных к гербицидам на основе имазетапира, производных пиридина и имазамокса оказалась достаточно низкой, что характерно для современных гербицидов. *C. affinis* оказались чувствительнее *D. magna* (табл. 5). Определено, что опасность гербицидов для рачков возрастает в ряду: имазетапир < клопиралид + пикорам < имазамокс.

Таблица 5 – Результаты действия гербицидов на *D. magna* и *C. affinis*

Вариант		Смертность ракообразных, %	
		<i>D. magna</i>	<i>C. affinis</i>
Имазетапир («Гольф ВК»)	50	0	25±10
	150	0	100
	300	100	100
Клопиралид + пикорам («Актеон»)	50	0	40±16
	150	46,6±18,4	100
	300	100	100
Имазамокс («Родимич»)	50	0	65±26
	150	63,3±25,3	100
	300	100	100

В целом инфузории *P. caudatum* оказались более чувствительными тест-организмами к гербицидному загрязнению, чем бактерии *E. coli*, хотя ряд эффектов имел нелинейный характер (Erofeeva, 2014) (табл. 6).

Таблица 6 – Реакции *P. caudatum* и *E. coli* на загрязнение водной среды гербицидами

Гербицид / кратность превышения ПДК		Индекс токсичности, у.е. / Группа токсичности			
		по <i>P. caudatum</i>		по <i>E. coli</i>	
Имазетапир («Гольф ВК»)	1	0,24±0,02	I	6,5±1,5	I
	10	0,68±0,06	II	8,4±1,6	I
	50	0,94±0,01	III	32,5±0,9	II
Клопиралид + пикорам («Актеон»)	1	0,52±0,05	II	0 (-56,9±13,7)	I
	10	0,60±0,07	II	0 (-23,2±6,0)	I
	50	0,94±0,02	III	41,2±3,1	III
Имазамокс («Родимич»)	1	0,29±0,05	I	0 (-19,9±4,5)	
	10	0,04±0,01	I	0 (-12,7±6,5)	I
	50	0,92±0,02	III	20,4±6,5	II

Примечание: обозначение групп токсичности указано в примечании к табл. 1.

Для *P. caudatum* и *E. coli* справедлив ряд возрастания опасности веществ: имазамокс < имазетапир < клопиралид + пикорам.

В результате чувствительность биотестов к гербицидам на основе производных пиридина (клопиралид + пикорам) и имидазолинонов можно представить следующим рядом: биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > билюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*.

**Чувствительность биотестов к нефтепродуктам (НП).** Добавка токсиканта (бензина) проводилась в дерново-подзолистую почву, поскольку водные модели не позволяют получить истинный раствор НП. Параллельно оценивались свойства торфа и торфогеля для ремедиации почвы после ее загрязнения бензином.

В почву добавляли бензин марки АИ-95 в дозировках: 1%, 5%, 10%, торф и торфогель в различных сочетаниях в расчете на сухую массу (см. рис. 4, 5). Контрольные и опытные образцы почвы закладывались в химически инертные контейнеры объёмом 2 дм<sup>3</sup> на 30 дней. Далее оценивали остаточное содержание НП методом ИК-спектрофотометрии и токсичность водных почвенных вытяжек.

Биотесты по смертности *D. magna* и *C. affinis* оказались не чувствительны к внесенным дозам НП: гибели в водных вытяжках из образцов не наблюдалось. Однако минимальная добавка токсиканта (1%) угнетала моторную активность цериодафний в 1,8 раз ( $p < 0,05$ ), тогда как у *D. magna* эффекта не наблюдали во всех вариантах.

Биотест по оценке хемотаксиса инфузорий *P. caudatum* оказался наиболее чувствительным как к специфическому загрязнению НП, так и к оценке защитного действия торфа и торфогеля. Показано, что добавки торфа и торфогеля снижали токсичность загрязненных образцов (рис. 3).

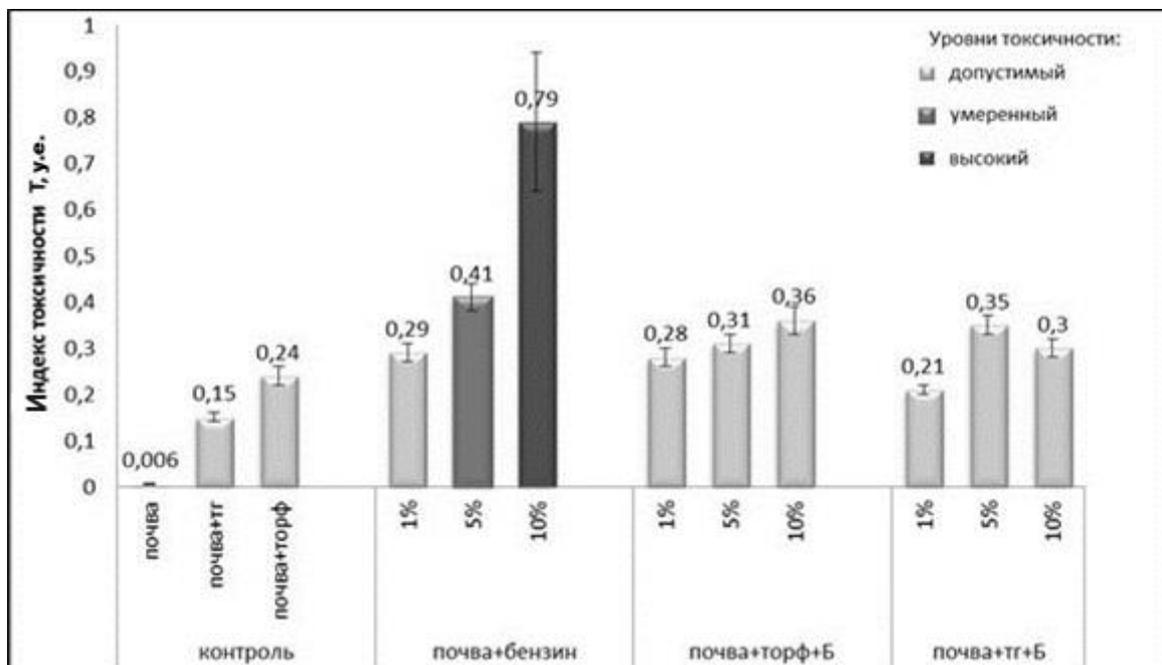


Рисунок 3 – Результаты биотестирования почв по изменению хемотаксиса инфузорий *P. caudatum*

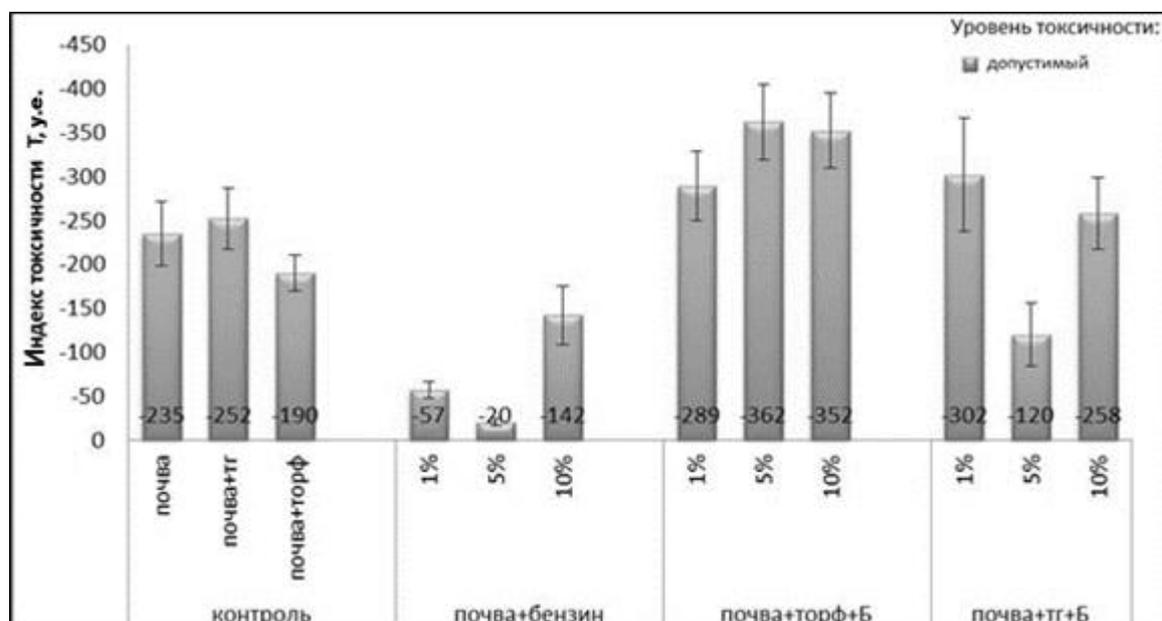


Рисунок 4 – Результаты биотестирования по изменению биолуминесценции *E. coli*

Угнетения биолуминесценции *E. coli* при тестировании водных вытяжек из загрязненных образцов обнаружено не было, наблюдали стимуляцию тест-

функции. Добавки испытуемых сорбентов приводили оцениваемый показатель к контрольному уровню (различия недостоверны,  $p > 0,05$ ), что позволило подтвердить их эффективность (рис. 4).

В итоге ряд снижения чувствительности биотестов к нефтепродуктам оказался следующим: биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биоллюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по гибели *C. affinis* = биотест по гибели *D. magna*. Кроме того, показана эффективность применения торфа и торфогеля для ремедиации почв, загрязненных бензином.

**Чувствительность биотестов в оценке безопасности поливинилхлоридных (ПВХ) пластикатов.** В эксперименте, предваряющем основные исследования, было показано, что из ПВХ пластикатов возможна миграция вредных веществ в контактирующую среду, прежде всего фталатов (солей ортофталевой кислоты), выполняющих роль пластификаторов (Олькова, Будина, Ярмоленко, 2015). Методами биотестирования изучили воздействие водных вытяжек из ПВХ пластикатов трех рецептур, содержащих фталаты, и ранжировали чувствительность биотестов к данным средам.

В исходных экстрактах, приготовленных в соотношении «твердая фаза-вода» 1:10, все особи *D. magna* и *C. affinis* погибали за период острого эксперимента. Чувствительность низших ракообразных сравнили по безвредной кратности разбавления: показатель выше для *C. affinis*, следовательно, *D. magna* наиболее устойчивы к исследуемому органическому загрязнению (табл. 7).

**Таблица 7 – Результаты биотестирования водных экстрактов из проб ПВХ пластикатов**

Вариант / степень разбавления исходной вытяжки, %		Оценка тест-реакций			
		Смертность* <i>D. magna</i> , %	Смертность* <i>C. affinis</i> , %	Индекс Т по <i>P. caudatum</i> , у.е.	Индекс Т по <i>E. coli</i> , у.е.
Контроль		0	0	0	0
НПЛ	100	100	100	0,98±0,04	95,3±1,3
	50	100	100	0,97±0,06	92,4±2,0
	25	0	60	0,88±0,02	90,5±2,5
	10	0	0	0,80±0,02	80,6±2,7
СПЛ	100	100	100	0,98±0,03	82,7±5,1
	50	0	90	0,98±0,07	86,2±6,1
	25	0	0	0,85±0,01	80,9±3,7
	10	0	0	0,72±0,1	85,2±3,8
ВПЛ	100	0	0	0,85±0,09	83,6±4,1
	50	0	0	0,77±0,05	85,2±5,6
	25	0	0	0,76±0,08	79,7±3,8
	10	0	0	0,71±0,04	81,4±5,2

Примечание: НПЛ – низкопластифицированный образец ПВХ; СПЛ – среднепластифицированный образец ПВХ; ВПЛ – высокопластифицированный образец ПВХ; \* - погрешность в пределах норматива методик (ФР 1.39.2007.03221. 2007; ФР 1.39.2007.03222. 2007); все индексы Т относятся к III группе токсичности.

Бактерии *E. coli* наиболее остро реагировали на присутствие фталатов в воде: разбавление исходной вытяжки не снижало индексы токсичности. Угнетение хемотаксиса *P. caudatum* во всех вариантах также было значительным (III группа токсичности), однако отмечена тенденция уменьшения индексов токсичности при разбавлении проб (табл. 7).

Таким образом, ряд чувствительности биотестов к фталатам, присутствующим в водных вытяжках из ПВХ пластикутов следующий: биоллюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*.

Результаты блока исследований объединены в таблице 8.

**Таблица 8 – Ранжирование чувствительности биотестов к минеральным и органическим токсикантам**

Токсикант		Уровень чувствительности биотестов				
		Смертность <i>D. magna</i>	Смертность <i>C. affinis</i>	Биоллюминесценция <i>E. coli</i>	Изменение хемотаксиса <i>P. caudatum</i>	
Минеральные вещества	Cu <sup>2+</sup>	Тяжелые металлы	+	++	++++	+++
	Cd <sup>2+</sup>		+++	++	+	++++
	Pb <sup>2+</sup>		++	+++	+	++++
	Zn <sup>2+</sup>		+++	++	+	++++
	NO <sup>3-</sup>	Минеральные формы азота	+++	++++	+	++
	NO <sup>2-</sup>		+++	++++	+	++
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		+++	++++	++	+
	NO <sup>3-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		+++	++++	+	++
	NO <sup>2-</sup> + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+++	++++	++	+	
(P <sub>x</sub> O <sub>y</sub> ) <sup>z-</sup>	Фосфаты и пирофосфаты	+	++	++++	+++	
Органические вещества	Клопиралид + пикорам	Гербициды	+	++	+++	++++
	Имазетапир C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		+	++	+++	++++
	Имазамокс C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		+	++	+++	++++
	Нефтепродукты		+	++	+++	++++
	Ортофталаты		+	++	++++	+++

Примечание: \* - уровень чувствительности биотестов показан знаками и цветом: «+» – минимальная, «++» – средняя, «+++» – «высокая», «++++» – максимальная чувствительность.

Представленные в таблице данные могут служить опорным материалом при планировании экологических исследований на территориях, подверженных действию указанных веществ.

### **3.1.4. Применение алгоритма выбора целевых биотестов для оценки протекторного действия биологически активных веществ**

Целевой выбор биотестов применили для оценки действия веществ с потенциальным протекторным действием в отношении токсикантов. С помощью четырех биотестов было показано протекторное действие восстановленного глутатиона (GSH) и мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ) в условиях загрязнения сульфатом меди. Выявлено, что глутатион оказывает протекторное действие при высоком уровне загрязнения водной среды медью – 1 мг/дм<sup>3</sup> (1000 ПДКр.х.), которое в наибольшей степени проявилось при мольном соотношении Cu:GSH, равном 1:4. Биорегуляторы, выделенные из сыворотки крови КРС, и из чистотела также снижали токсический эффект меди, однако предотвратить летальный эффект с их помощью для дафний удалось только в варианте с добавкой токсиканта, равной 10 ПДКр.х. (по Cu<sup>2+</sup>). В биотестах с микроорганизмами защитный эффект установлен и при более высокой дозе – 100 ПДКр.х. (0,1 мг/дм<sup>3</sup>).

### **3.1.5. Использование стратегии предварительного целевого выбора биотестов в исследовании нативных сред**

Показано, что выявленные в модельных экспериментах ряды чувствительности биотестов соблюдаются при оценке токсичности нативных сред – природных вод и водных вытяжек из почв.

Таким образом, обоснована эффективность целевого выбора биотестов с использованием универсального алгоритма, для определения наиболее предпочтительных методов биотестирования водной среды, загрязненной минеральными и органическими токсикантами.

## **3.2. Биотестирование водных сред в условиях неустановленного фактора токсичности по реакциям базового тест-организма *D. magna***

### **3.2.1. Экспресс-биотестирование по двигательной активности *D. magna***

При неустановленном факторе токсичности важно сочетание оперативных оценок токсичности исследуемых сред и подробное изучение токсических эффектов для прогноза экологических последствий загрязнения. В качестве экспресс-биотеста с использованием базового организма *D. magna* использовали модифицированный нами метод биотестирования по двигательной активности дафний (Олькова и др., 2017).

Для подтверждения экспрессности и информативности биотеста проводили три серии экспериментов:

- оценку токсичности модельных растворов с витальными и летальными дозами ТМ (Cu, Zn),
- оценку токсичности водных вытяжек из урбаноземов, антропогенно загрязненных ТМ;
- оценку токсичности природных вод, пробы которых характеризовались высоким содержанием минеральных соединений азота.

Пример данных о чувствительности биотеста приведен в таблице 9.

**Таблица 9 – Сравнение смертности и двигательной активности *D. magna* в водных вытяжках из почв, загрязненных соединениями ТМ**

Вариант	Смертность <i>D. magna</i> , %	Первая регистрация угнетения движения	Суммарный показатель загрязнения ТМ*
Контроль	0	-	-
Проба №1	6,7±1,5	через 3 часа	57,6 (опасное загрязнение)
Проба №2	0	через 2 суток	16,1 (умеренно опасное загрязнение)
Проба №3	0	через 3 суток	1,1 (допустимое загрязнение)

Примечание: \* - суммарный показатель загрязнения, вычисленный с учетом концентраций ТМ, превышающих установленные нормативы (Саев, Ревич, Янин, 1990).

Полученные данные свидетельствуют о том, что с помощью тест-функции смертности *D. magna* часто не удается диагностировать токсичность даже в случае высоких уровней загрязнения, что связано с физико-химическими процессами, происходящими в нативных средах. В случае опасного уровня загрязнения эффект угнетения двигательной активности *D. magna* наступает в течение нескольких часов экспозиции.

### **3.2.2. Системное биотестирование по спектру тест-функций *D. magna***

Оценка отдельных тест-функций не дает полной картины воздействия пробы или конкретного вещества на живой организм. Неоправданное сокращение длительности испытаний увеличивает риск упустить экологически значимые последствия загрязнения среды. Для оценки предлетальных, летальных и отсроченных эффектов действия веществ нами предлагается использование системного биотестирования, включающего оценку спектра откликов базового тест-организма *D. magna* (рис. 5).

Проведение биотестирования в течение всего жизненного цикла условного первого поколения *D. magna* и 25 дней жизни рачков второго и третьего поколений позволяет отслеживать нелетальные, летальные и отсроченные эффекты веществ, давать подробную характеристику исследуемых водных сред, новых веществ и материалов, прогнозировать их экотоксическое действие при попадании в окружающую среду.

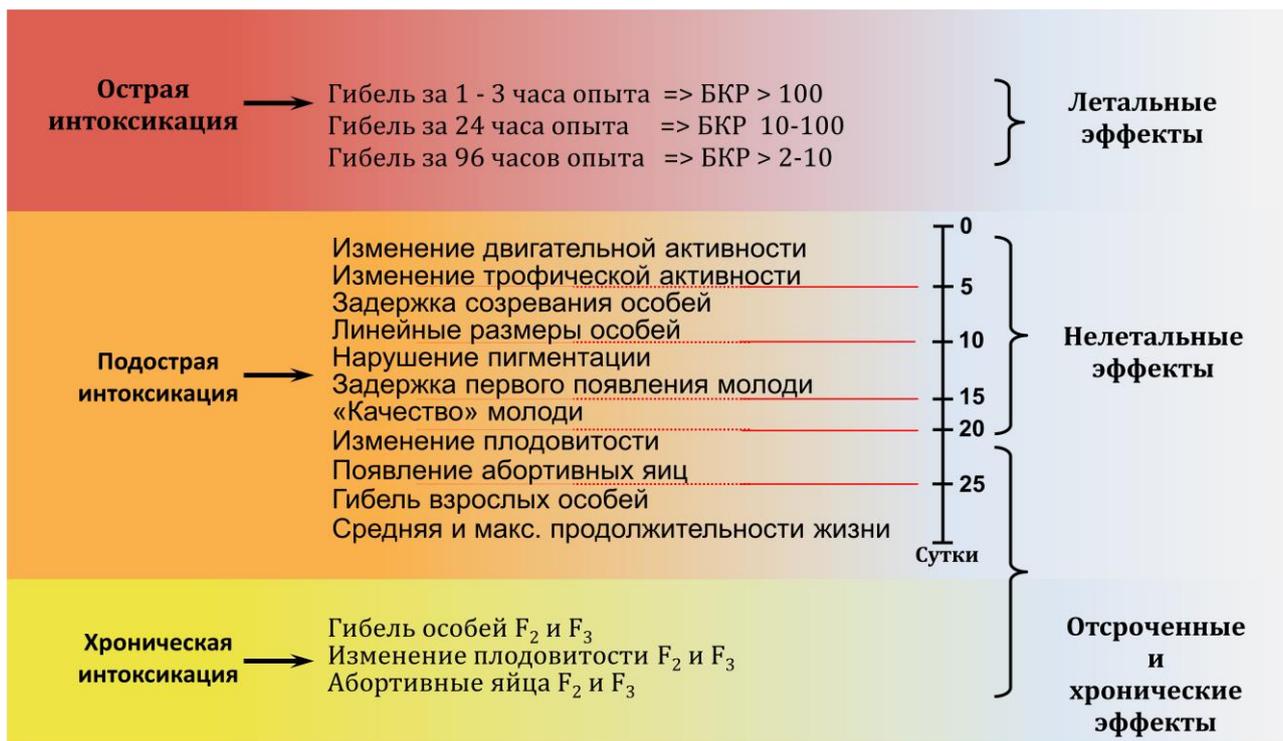


Рисунок 5 – Спектр тест-функций *D. magna* и оцениваемые эффекты для системного биотестирования

Стратегия сочетания экспресс-биотестирования с системной оценкой спектра тест-функций *D. magna* апробирована в работе. Описан подробный порядок проведения исследований, включающий ранжирование степени проявления ответных реакций, а также разработана форма протокола регистрации результатов системного биотеста по спектру тест-функций *D. magna*.

### 3.3. Контроль показателей здоровья тест-культур для стандартизации и определения пригодности к биоанализам

Критерий пригодности тест-организмов к биотестированию по чувствительности к модельному токсиканту предложено дополнить периодическим определением показателей здоровья тест-культуры: продолжительности жизни, способности особей к размножению и связанных с ними параметров. Под здоровьем культуры тест-организмов мы предлагаем понимать её способность длительно существовать в качестве модельной популяции со стабильной продолжительностью жизни особей и сохранением способности к самовоспроизводству при условии создания оптимальных абиотических и биотических факторов ее существования.

### 3.3.1. Анализ проблем культивирования и проведения биоанализов на примере *D. magna*

Методом анкетирования выявлялись проблемы, возникающие при реализации биотестов. Респонденты согласны, что *D. magna* можно считать базовым тест-организмом. На примере 10 лабораторий показана частота возникновения проблем при биотестировании на *D. magna*.

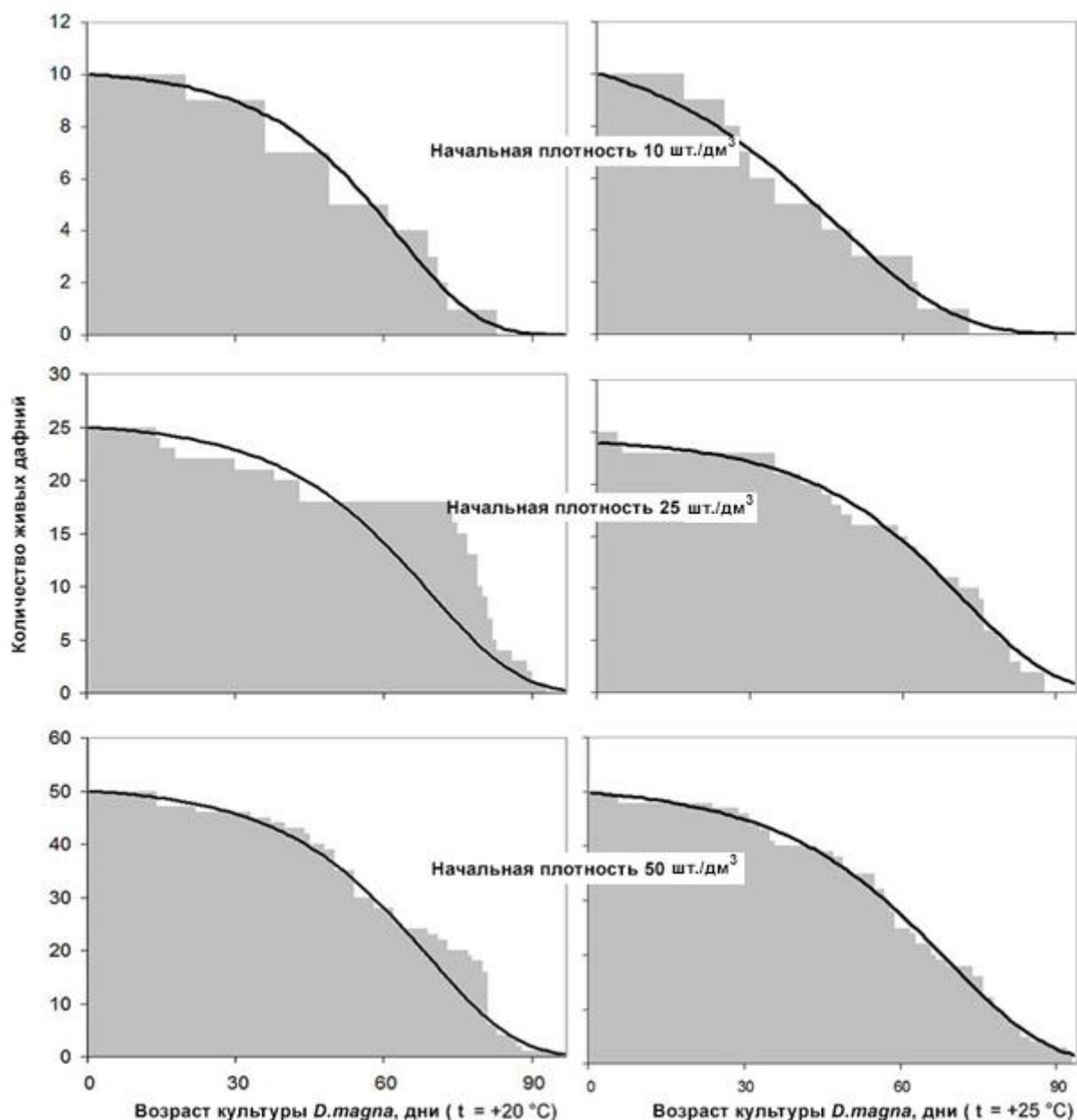
### 3.3.2. Экспериментальное определение количественных параметров здоровья тест-культуры на примере *D. magna*

Для выявления показателей здоровья тест-культуры *D. magna* проведены эксперименты с вариациями условий культивирования дафний. Сформированы 6 опытных вариантов с разной плотностью групп (10, 25 и 50 особей на 1 дм<sup>3</sup>) и двумя температурными условиями (+20°C, +25°C). Ежедневно вели подсчет основных особей группы, после созревания которых также подсчитывали молодь. Опыт продолжался до конца жизни последней особи в группе.

В таблице 10 представлены рассчитанные по результатам опыта количественные параметры модельных групп. На рисунке 6 показана динамика естественной смертности в модельных группах. Установлено, что результаты эксперимента согласуются с уравнением Гомпертца, описывающим смертность в популяциях многоплодных животных (Gompertz, 1825). Описание уравнения приведено в диссертации и работе (Olkova et al., 2018).

Таблица 10 – Влияние условий культивирования *D. magna* на демографические параметры модельных групп рачков

Вариант/ показатели	Начальная плотность особей и температура культивирования					
	10/дм <sup>3</sup>		25/дм <sup>3</sup>		50/дм <sup>3</sup>	
	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C
Постоянная составляющая естественной смертности ( $S_0$ )	1,1·10 <sup>-5</sup> –2,6·10 <sup>-3</sup>		4,7·10 <sup>-5</sup> –3,9·10 <sup>-4</sup>		1,9·10 <sup>-4</sup> –2,0·10 <sup>-3</sup>	
Коэффициент суточного прироста смертности ( $k$ )	1,12±0,09	1,04±0,08	1,07±0,02	1,06±0,02	1,06±0,02	1,05±0,02
Средний срок жизни особей, дни	52,6±5,9	41,7±4,7	79,7±1,0	58,8±0,7	66,5±6,5	58,9±5,7
Максимальный срок жизни особей, дни	68,3±9,3	72±9,8	114±1,7	87,0±1,3	100,7±10,2	92±9,1



Обозначения: серая область представляет уменьшающееся количество живых дафний, черная кривая представляет собой график уравнения Гомпертца

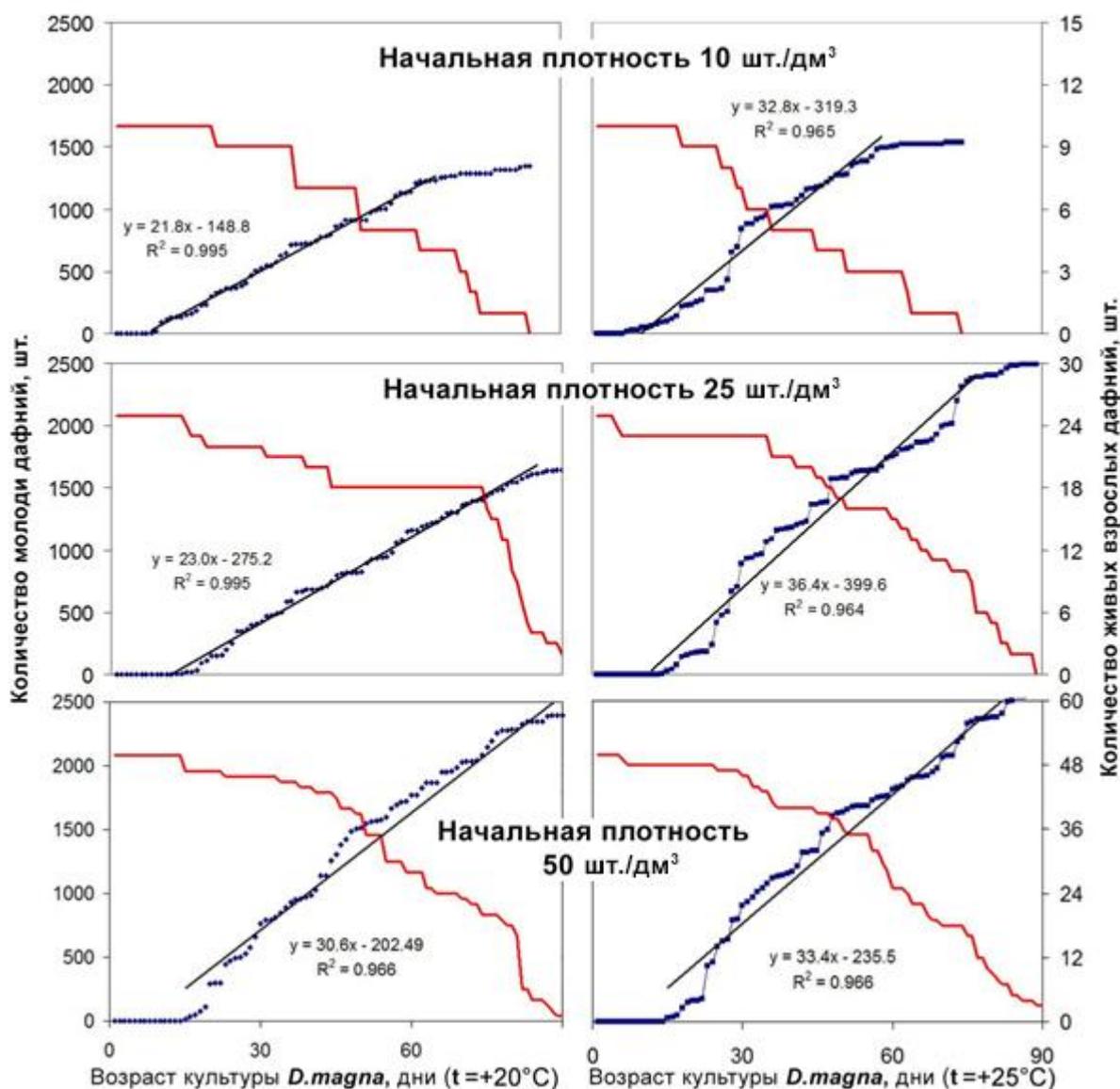
**Рисунок 6 – Сравнение экспериментальных данных естественной смертности *D. magna* с расчетом по уравнению Гомпертца**

По показателям средней и максимальной продолжительности жизни выделена наиболее благополучная группа *D. magna*: начальная плотность посадки 25 особей на 1 дм<sup>3</sup> при 20°C. Параметры этой группы приняты за условно эталонные критерии здоровья дафний.

Дальнейший анализ показал, что параметр «постоянная составляющая естественной смертности» ( $S_0$ ) варьирует в широких пределах. Напротив, второй параметр «коэффициент суточного прироста смертности» ( $k$ ) очень стабилен: от 1,04 до 1,12% с коэффициентом вариации от 1,5% до 8%. Поэтому данный параметр предлагаем считать важной характеристикой культуры *D. magna*,

который может использоваться для контроля стабильности поддерживаемой популяции и периодической оценки ее здоровья.

Несмотря на близкие коэффициенты суточной естественной смертности, динамика смертности в модельных группах различна (рис. 6). Средняя и максимальные продолжительности жизни особей в группах из 10 рачков достоверно меньше, чем в группах с большей плотностью ( $p < 0,05$ ). Эти факты объяснимы высокой плодовитостью *D. magna* при низкой плотности посадки (рис. 7, табл. 11). Такое стимулирование размножения истощает ракообразных, что нежелательно при лабораторном культивировании.



Обозначения: красная линия представляет уменьшающееся количество живых дафний (правая шкала), синие точки – суммарное количество молоди (левая шкала). Начальной точкой линии тренда считался день первого появления потомства

**Рисунок 7 – Суммарная плодовитость *D. magna* в зависимости от начальной плотности группы особей и температуры культивирования**

Постепенное снижение численности модельных групп, вследствие естественной смертности, влечет за собой компенсаторное увеличение плодовитости оставшихся самок. На графиках этот эффект выражается линейной зависимостью увеличения общего числа молодежи во времени от уменьшения числа взрослых рачков (рис. 9). Такие эффекты известны в экологии популяций (Rees, Oldfather, 1980).

Показано (табл. 11), что «день появления первой молодежи и день появления первого массового приплода» проявляются первыми, следовательно, не требуют наблюдения за полным жизненным циклом особей, поэтому предлагаем считать их оперативными критериями оценки здоровья культуры *D. magna*. Удельная плодовитость – важный пожизненный показатель здоровья, который необходимо контролировать 1 раз в полугодие.

**Таблица 11 – Влияние условий культивирования *D. magna* на их размножение**

Вариант/ параметры	Начальная плотность особей и температура культивирования					
	10/дм <sup>3</sup>		25/дм <sup>3</sup>		50/дм <sup>3</sup>	
	20 °С	25 °С	20 °С	25 °С	20 °С	25 °С
День появления первой молодежи	8±1	7±1	10±2	12±2	17±3	15±2
День первого массового приплода	10±2	7±1	18±2	15±1	20±2	18±2
Удельная плодовитость, особей/самку	134,6±29,6	153,6±33,7	74,3±2,4	99,7±3,2	48,7±1,0	51,2±1,0

Таким образом, на примере *D. magna* экспериментально выявлены оперативные критерии здоровья тест-культуры для контроля у каждой новой синхронизированной культуры *D. magna*: день появления первой молодежи и массового приплода. К расширенному набору критериев здоровья культуры *D. magna* относим: среднюю и максимальную продолжительность жизни особей, удельную плодовитость за полный жизненный цикл рачков, коэффициент суточного прироста смертности.

### **3.3.3. Влияние химического состава культивационной воды на результат биотестирования**

Длительное культивирование *D. magna* в водах разного химического состава показало, что под влиянием данного фактора происходит изменение чувствительности синхронизированной молодежи тест-культуры. Использование воды с повышенным содержанием природных солей (в рамках нормативов) по сравнению с более опресненной водой приводит к снижению чувствительности *D. magna*.

### **3.3.4. Влияние сезона года на чувствительность тест-организмов**

В четырехлетнем эксперименте показано, что максимальные различия между показателями  $LD_{50}(K_2Cr_2O_4)$  у *D. magna* наблюдаются зимой и весной ( $p=0,02$ ) с ослаблением культуры в зимний период и нормализацией параметра весной.

### **3.3.5. Рекомендации по контролю здоровья тест-культуры на примере *D. magna***

На основе проведенных экспериментов разработаны научно обоснованные рекомендации по контролю здоровья тест-культуры на примере *D. magna*, учитывающие факторы влияния культивационной воды и сезона года. Кроме количественных параметров, описанных выше, предложена схема визуальных признаков здоровых и угнетенных особей *D. magna* (рис. 8).

### **3.3.5. Использование стратегии стандартизации тест-культуры и определения ее пригодности к биоанализам в лаборатории биотестирования**

В разделе описаны результаты апробации предложенной стратегии стандартизации тест-культур в лаборатории биотестирования, не являющейся базой наших основных исследований. Показано, что определение чувствительности *D. magna* к модельному токсиканту не обеспечивало контроля пригодности культуры к биотестированию.

### **3.4. Оптимизация планирования и проведения биоанализов с использованием новой стратегии биотестирования**

Для внедрения предложенных мероприятий в менеджмент качества результатов биотестирования разработана функциональная модель научно-обоснованной стратегии единого процесса планирования и проведения биотестирования (рис. 9).

## Признаки здоровья *D. magna*

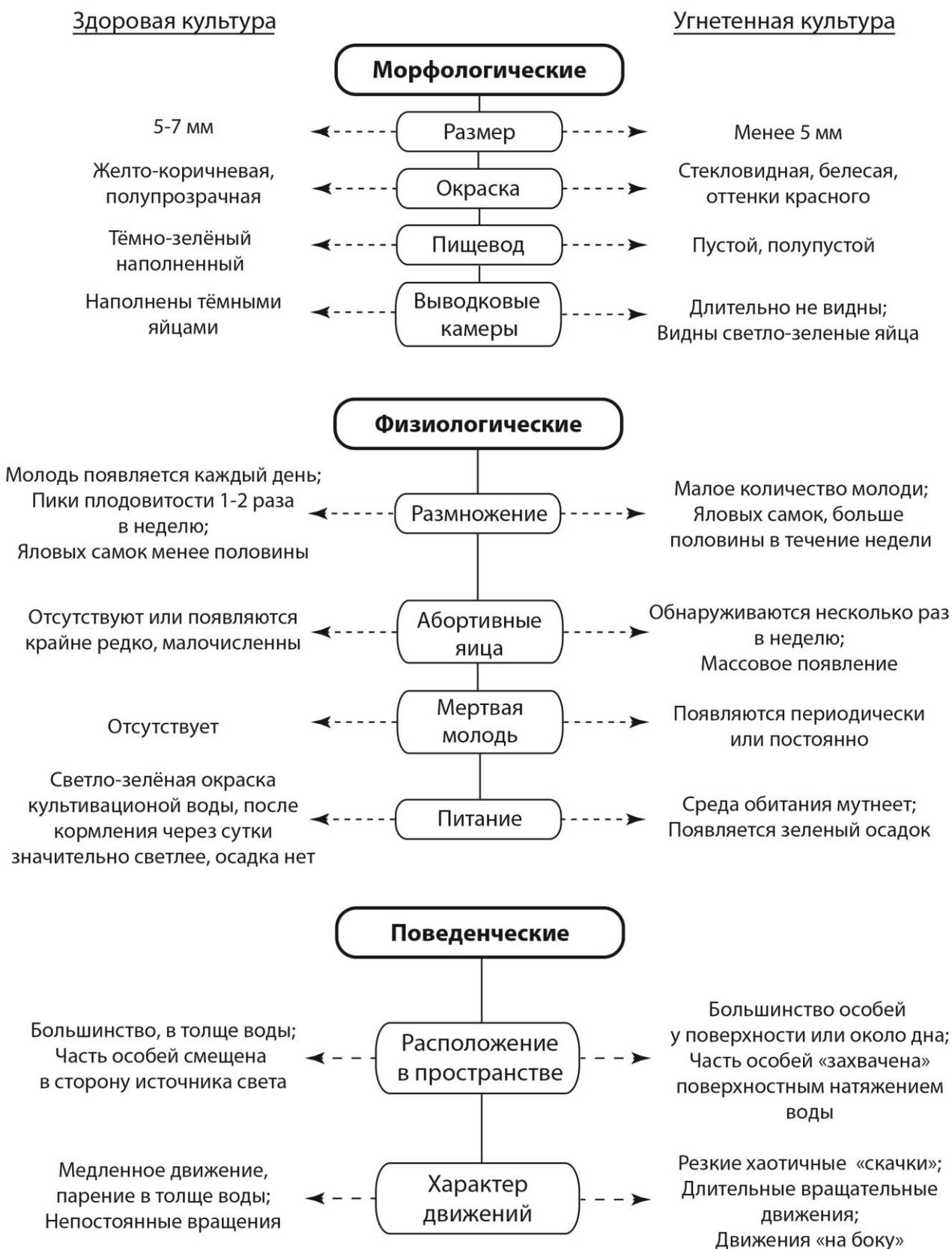
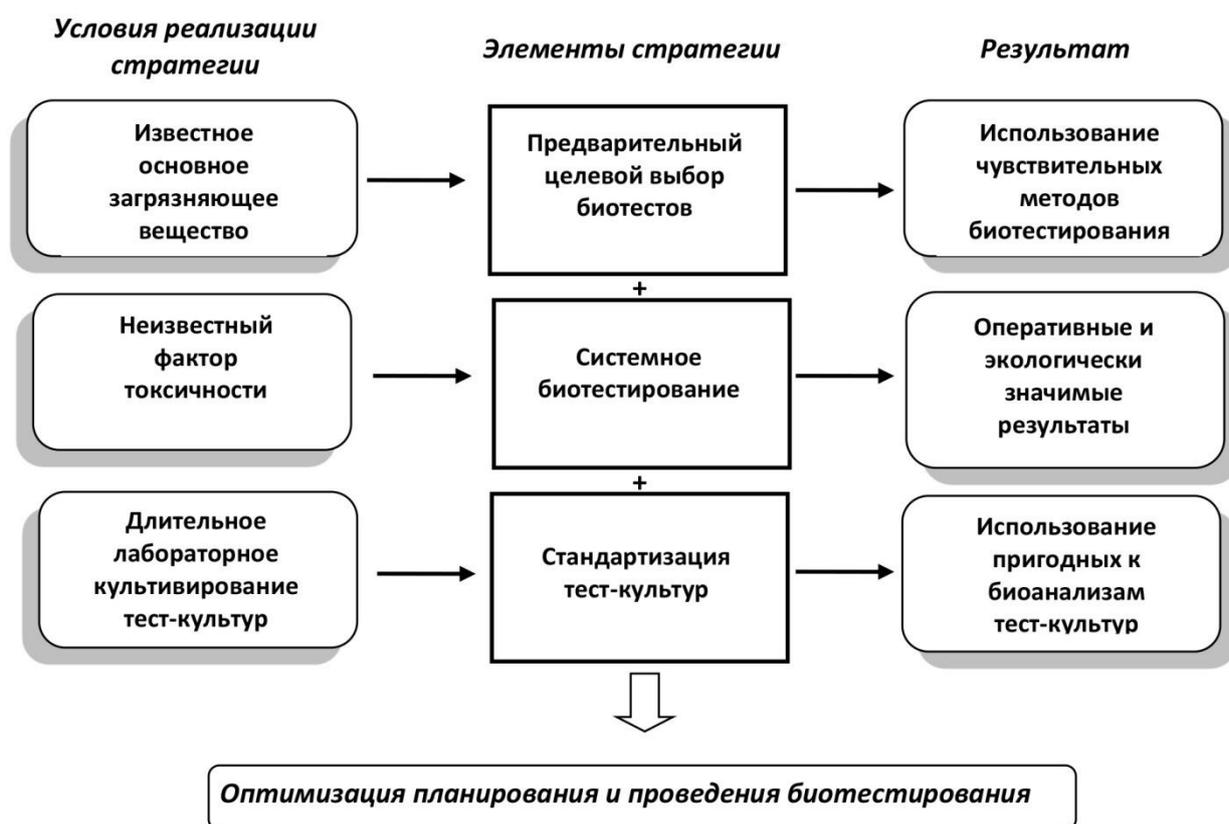


Рисунок 8 – Опорная схема для визуальных наблюдений за здоровьем *D. magna*



**Рисунок 9 – Функциональная модель научно-обоснованной стратегии планирования и проведения биотестирования**

Согласно новой стратегии биотестирования необходимо определить сложившиеся условия, включить в план работ реализацию соответствующего элемента стратегии, получить искомый результат.

## ВЫВОДЫ

1. На основе проведенных исследований показано, что реализация стратегии планирования и проведения токсикологических анализов, включающая в себя комплекс действий по целевому выбору биотестов, сочетанию экспрессных оценок токсичности с системным биотестированием и использованию тест-культур, стандартизированных по критериям здоровья тест-организмов, позволяет получать экологически значимые результаты оценок токсичности водных сред.

2. Установлено, что тесты по смертности *D. magna* и *C. affinis* наиболее чувствительны при загрязнении водной среды минеральными соединениями азота. Показано, что тест по снижению биолюминесценции *E. coli* предпочтителен при загрязнении минеральными солями Cd, фосфатами и пирофосфатами, органическими стабилизаторами ортофталатами. При загрязнении водной среды минеральными солями Cd, Pb, Zn, нефтепродуктами, органическими гербицидами клопиралидом, пикорамом, имазетапиром,

имазамоксом следует использовать тест по снижению хемотаксической реакции *P. caudatum*.

3. Показано, что предложенная стратегия биотестирования, включающая экспресс-биотест и системное биотестирование с оценкой спектра откликов базового тест-организма, позволяет выявлять предлетальные, летальные и отсроченные эффекты загрязняющих веществ и ранжировать их по степени проявления, тогда как при оценке единичной тест-функции снижается эффективность диагностики экологически значимых последствий загрязнения.

4. Установлено, что изменение двигательной активности *D. magna* является предпочтительной оперативной тест-функцией, прогнозирующей летальные и хронические эффекты токсикантов. Достоверное угнетение тест-функции при экспозиции 1-24 часа сигнализирует о потенциальной токсичности пробы в остром 96-часовом эксперименте. Значимая реакция в течение 96 часов позволяет прогнозировать наличие хронических токсических эффектов.

5. Экспериментально обоснована эффективность стратегии биотестирования с учетом стандартизации тест-культур на примере *D. magna*, заключающейся в определении ее пригодности для биотестирования по критериям здоровья, зависящим от абиотических и биотических факторов содержания организмов: плотности модельных групп, биоритмов организмов, химического состава культивационной воды, температуры культивирования

6. Показан механизм потери пригодности культуры *D. magna* для биотестирования при отклонении условий ее культивирования от оптимальных параметров: 20°C и 25 особей/дм<sup>3</sup>. В партеногенетических группах *D. magna* при естественной смертности особей наблюдается компенсаторный линейный эффект увеличения плодовитости оставшихся самок ( $r=0,98\pm 0,02$ ), что приводит к снижению продолжительности жизни в 1,7 раза в группах с низкой плотностью 10 особей/дм<sup>3</sup> за счет стимуляции размножения избытком жизненного пространства. Снижение удельной плодовитости особей в 1,5 раза в группах с плотностью посадки, увеличенной до 50 особей/дм<sup>3</sup>, обусловлено торможением процессов созревания и дальнейшего размножения дафний.

7. Установлено, что при оптимальных условиях культивирования: температуре 20°C и плотности посадки 25 особей/дм<sup>3</sup>, оперативным критерием здоровья тест-организмов *D. magna* является «день первого появления молодежи» – 10±3 дня. Критериями, определяемыми за полный цикл жизни особей *D. magna*, являются средняя продолжительность жизни, составляющая 79,7±1,0 дней, максимальный срок жизни особи в группе, достигающий 114,0±1,7 дней при удельной плодовитости особей – 74,3±2,4 дня.

8. Основой комплексного менеджмента качества анализов с использованием методов биотестирования, учитывающего многофакторность получения достоверных результатов биотестов, является стратегия биотестирования, основанная на целевом выборе биотестов при установленном факторе токсичности, использовании системного биотестирования с оценкой спектра откликов тест-организма при неустановленном характере загрязнения и применении надежных стандартизированных тест-культур.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в журналах, входящих в международные базы данных*

1. **Олькова, А. С.** Условия культивирования и многообразие тест-функций *Daphnia magna* Straus при биотестировании / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Вода и экология: проблемы и решения, 2017. – № 1 (69). – С. 63-82.
2. Диагностика локального загрязнения урбанозёмов в районах автозаправочных станций / **А. С. Олькова**, Н. М. Зимонина, Е. И. Лялина, В. Р. Бобрецова. – Текст : непосредств. // Теоретическая и прикладная экология. – 2017. – № 1. – С. 56-62.
3. Comprehensive chemical-toxicological research of copper (II) sulfate solutions containing reduced glutathione / E. I. Lyalina, A. I. Fokina, T. Ya. Ashikhmina, **A. S. Olkova** [et al.]. – Text : unmediated // Theoretical and Applied Ecology. – 2018. – I. 2. – P. 101-107.
4. **Olkova, A. S.** Modern trends in the development of the methodology of bioassay aquatic environments / A. S. Olkova. – Text : unmediated // Theoretical and Applied Ecology. – 2018. – I. 3. – P. 19-26.
5. The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis / **A. S. Olkova**, G. Y. Kantor, T. I. Kutyavina, T. Y. Ashikhmina. – DOI: 10.1002/etc.3956. – Text : electronic // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2018. – Vol. 37, I. 2. – P. 376-384. – URL: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.3956> (accessed: 12.03.2020).
6. **Олькова, А. С.** Актуальные направления развития методологии биотестирования водных сред / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Вода и экология: проблемы и решения. – 2018. – № 2 (74). – С. 40-50.
7. **Олькова, А. С.** Выбор биотестов для экологических исследований вод, загрязненных минеральными формами азота / А. С. Олькова, Е. В. Маханова. – Текст : непосредств. // Вода и экология. – 2018. – № 4 (76). – С. 70-81.
8. **Олькова, А. С.**, Исследование чувствительности аттестованных биотестов к загрязнению вод современными гербицидами: модельные эксперименты / А. С. Олькова, Г. И. Березин. – Текст : непосредств. // Вода и экология: проблемы и решения. – 2019. – Т. 24, №2 (78). – С. 111–119.
9. **Олькова, А. С.** Контроль здоровья тест-культуры *Daphnia Magna* Straus / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Вода и экология: проблемы и решения. – 2019. – Т. 24, №3 (79). – С. 59-63.

## Статьи в научных журналах, включенных в перечень ВАК РФ

10. **Олькова, А. С.** Оценка устойчивости почв и прогноз их состояния в районе уничтожения химического оружия / А.С. Олькова, Е.В. Дабах. – Текст : непосредств. // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – № 1. – С. 73-76.
11. Изменение структурной организации альго-микологических почвенных комплексов при загрязнении пирофосфатом натрия / Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, **А. С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Проблемы региональной экологии. – 2010. – № 1. – С. 50-54.
12. Изучение воздействия фосфорсодержащих поллютанов на почвенные микроорганизмы / Т. Я. Ашихмина, Л. И. Домрачева, С. Ю. Огородникова, **А. С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Российский химический журнал. – 2010. – Т. 54, № 4. – С. 183-186.
13. Оценка состояния водных объектов методами биотестирования в зоне влияния промышленных предприятий (на примере Кирово-Чепецкого химического комбината) / **А. С. Олькова**, С. Г. Скугорева, Т. А. Адамович [и др.]. – Текст : непосредств. // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 3. – С. 46-51.
14. Кондакова, Л. В. Влияние пирофосфата натрия на альгоценозы почв Кировской области / Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Ботанический журнал. – 2011. – Т. 96, № 4. – С. 494-502.
15. Вараксина, Н. В. Изучение влияния соединений алюминия на тест-организмы в условиях модельного эксперимента / Н. В. Вараксина, Т. Я. Ашихмина, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Теоретическая и прикладная экология. – 2012. – № 3 – С. 65-70.
16. Оценка состояния поверхностных водных объектов техногенных территорий методами биотестирования и биоиндикации / **А. С. Олькова**, С. Г. Скугорева, Н. В. Вараксина [и др.]. – Текст : непосредств. // Вода: химия и экология. – 2012. – № 6. – С. 21-28.
17. **Олькова, А. С.** Влияние выбросов пирофосфата натрия при уничтожении химического оружия на состояние почвы / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Поволжский экологический журнал. – 2014. – № 2. – С. 246-252.
18. **Олькова, А. С.** Опыт интерпретации результатов биотестирования поверхностных вод при химическом и радиоактивном загрязнении / А. С. Олькова, Е. В. Дабах. – Текст : непосредств. // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – № 3. – С. 21-28.
19. Биоиндикационные и биотестовые реакции организмов на действие метилфосфонатов и пирофосфата натрия / Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, С. Ю. Огородникова, **А.С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – № 4. – С. 63-69.
20. **Олькова, А. С.** Биотестирование в научно-исследовательской и природоохранной практике России / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Успехи современной биологии. – 2014. – Т. 134, № 6. – С. 614-622.
21. **Олькова, А. С.** Особенности и проблемы биотестирования водных сред по аттестованным методикам / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Вода: химия и экология. – 2014. – № 10. – С. 87-94.
22. Некрасова, Ю. Н. Влияние комплексообразования на токсичность водных растворов, содержащих ионы железа, алюминия и фтора / Ю. Н. Некрасова, Е. В. Дабах, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Вода: химия и экология. – 2015. – № 5. – С. 69-75.
23. **Олькова, А. С.** *Daphnia magna* Straus в биотестировании природных и техногенных сред / А. С. Олькова, А. И. Фокина. – Текст : непосредств. // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135, № 4. – С. 380-389.
24. **Олькова, А. С.** Анализ результатов биотестирования: особенности, проблемы, подходы / А. С. Олькова, Д. В. Будина, Л. В. Даровских. – Текст : электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – URL : <http://www.science-education.ru/128-22432> (дата обращения: 12.03.2020).
25. Влияние новых пептидных биорегуляторов на активность *Daphnia magna* в чистых и загрязненных тяжелыми металлами водах / **А. С. Олькова**, М. С. Краснов, В. П.

Ямскова, И. А. Ямсков. – Текст : электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – URL : <http://www.science-education.ru/128-21927> (дата обращения: 12.03.2020).

26. **Олькова, А. С.** Оценка токсичности поливинилхлоридных пластикатов методами биотестирования / А. С. Олькова, Д. В. Будина, А. С. Ярмоленко. – Текст : непосредств. // Токсикологический вестник. – 2015. – № 5 (134). – С. 46-51.

27. Исследование закономерностей биоаккумуляции меди представителями автотрофных и гетеротрофных организмов / А. И. Фокина, **А. С. Олькова**, Е. И. Лялина, Л. В. Даровских. – Текст : непосредств. // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2015. – № 6 (151). – С. 50-55.

28. **Олькова, А. С.** Сравнение чувствительности тест-организмов *Daphnia magna* и *Ceriodaphnia affinis* к соединениям алюминия / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 11-2. – С. 203-205.

29. Определение ди-(2-этилгексил)фталата в поливинилхлоридных пластикатах масс-спектрометрическим и биосенсорным методами / Т. Н. Кувичкина, Д. В. Будина, **А. С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Теоретическая и прикладная экология. – 2015. – № 4. – С. 11-15.

30. Исследование протекторных свойств восстановленного глутатиона для тест-организмов в растворах, содержащих медь / А. И. Фокина, Е. И. Лялина, **А. С. Олькова**, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредств. // Вода: химия и экология. – 2016. – № 2. – С. 64-70.

31. Исследование токсичности проб урбаноземов, загрязненных тяжелыми металлами / А. И. Фокина, Л. И. Домрачева, **А. С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Известия Самарского научного центра академии наук. – 2016. – Т. 18, № 2 (2). – С. 544-550.

32. **Олькова, А. С.** Оценка состояния почв городских территорий химическими и эколого-токсикологическими методами / А. С. Олькова, Г. И. Березин, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредств. // Поволжский экологический журнал. – 2016. – № 4. – С. 411-423.

33. Кутявина, Т. И. Проблемы эксплуатации и экологического состояния Омутнинского водохранилища Кировской области / Т. И. Кутявина, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2016. – № 8 (161). – С. 66-73.

34. **Олькова, А. С.** Биотестирование с использованием *Daphnia magna*: особенности культивирования и многообразие ответных реакций / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Вода и экология: проблемы и решения. – 2017 – № 1. – С. 64-82.

35. Изучение потенциала торфа как сорбента ионов Cu (II) и Pb (II) из водных растворов / А. И. Фокина, **А. С. Олькова**, Д. В. Будина [и др.]. – Текст : непосредств. // Вода и экология: проблемы и решения. – 2017 – № 3. – С. 67-82.

36. Оценка токсичности природных и техногенных сред по двигательной активности *Daphnia magna* / **А. С. Олькова**, Е. А. Санникова, Д. В. Будина [и др.]. – Текст : электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 3. – URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26428> (дата обращения: 12.03.2020).

37. Будина, Д. В. Исследование токсических эффектов водных вытяжек из поливинилхлоридных пластикатов / Д. В. Будина, Т. Я. Ашихмина, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Бутлеровские сообщения. – 2017. – Т. 50, № 6. – С. 112-118.

38. **Олькова, А. С.** Чувствительность тест-организмов к минеральным формам азота / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2017. – № 6 (167). – С. 103-108.

### Патент

39. Патент №156546 РФ, МПК G01N 27/327 (2006.01), C12Q 1/02 (2006.01), C12N 11/12 (2006.01) Биосенсор для определения динатриевой соли орто-фталата в водной среде : 2015125211/04 : заявл. 26.06.2015 : опубл. 10.11.2015 / Т. Н. Кувичкина, Д. В. Будина, **А. С. Олькова** [и др.]. – 11 с. – Текст : непосредств.

## **Методические рекомендации и учебно-методические пособия**

40. **Олькова, А. С.** Оценка состояния и устойчивости природно-техногенных систем : метод. рекомендации / А. С. Олькова. – Киров : Изд-во ВятГГУ, 2012. – 44 с. – Текст : непосредств.

41. Геоэкологическая оценка природно-техногенных систем: подходы, критерии, методы : учеб.-метод. пособие / **А. С. Олькова**, А. И. Фокина, Т. А. Адамович, А. Н. Васильева ; ВятГГУ. – Киров : Радуга-ПРЕСС, 2013. – 170 с. – ISBN 978-5-906013-85-9. – Текст : непосредств.

42. Химические основы экотоксикологии : учеб. пособие / А. И. Фокина, С. Ю. Огородникова, **А. С. Олькова** [и др.] ; ВятГГУ, Ин-т биологии Коми НЦ УрО РАН. – Киров : Веси, 2015. – 266 с. – ISBN 978-5-4338-0236. – Текст : непосредств.

## **Прочие статьи, тезисы и материалы конференций**

43. Использование методов биотестирования в оценке состояния поверхностных вод в зоне влияния Кирово-Чепецкого химического комбината / Т. О. Смирнова, Т. А. Адамович, **А. С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Современные проблемы безопасности жизнедеятельности: теория и практика : мат. II Междунар. науч.-практ. конф., Казань, 28-29 февраля 2012 г. Ч. 2 / ред. Р. Н. Минниханов. – Казань : НЦ безопасности жизнедеятельности ДЕТЕЙ, 2012. – С. 342-347.

44. **Олькова, А. С.** Определение качества питьевых вод по показателю хронической токсичности с помощью тест-объекта *Daphnia magna* Straus / А. С. Олькова, К. К. Ситникова. – Текст : непосредств. // Экология родного края: проблемы и пути решения : мат. Всерос. молодежной науч.-практ. конф. с междунар. участием, 23-25 апреля 2012 г. : кн. 1. – Киров : Изд-во ВятГГУ, 2012. – С. 67-70.

45. **Олькова, А. С.** Особенности и проблемы интерпретации результатов биотестирования / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки : сб. работ III междунар. науч.-практ. конф., г. Владикавказ, 18-20 мая 2012 г. – Владикавказ : [б.и.], 2012. – С. 84-87.

46. **Олькова, А. С.** Проблемы биотестирования почв по аттестованным методикам / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред : тез. докл. Междунар. конф., г. Москва, 4-6 февраля 2013 г. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013 – С. 158.

47. **Олькова, А. С.** Исследование влияние алюминия на *Daphnia magna* в модельных экспериментах / А. С. Олькова, Н. В. Вараксина, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредств. // Окружающая среда: эффективное природопользование и здоровье человека : мат. всерос. науч.-практ. конф., 11-12 апреля 2013 г. – Сибай : Сибайская городская типография, 2013 – С. 132-134.

48. **Олькова, А. С.** Оценка информативности показателя трофической активности *Daphnia magna* при определении интегральной токсичности водных сред / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Окружающая среда: эффективное природопользование и здоровье человека : мат. всерос. науч.-практ. конф., 11-12 апреля 2013 г. – Сибай : Сибайская городская типография, 2013. – С. 165-168.

49. **Олькова, А. С.** Информативность тест-функций низших ракообразных / А. С. Олькова, К. К. Ситникова. – Текст : непосредств. // Бизнес. Наука. Экология родного края: проблемы и пути их решения : мат. Всерос. науч.-практ. конф.-выставки эколог. проектов с междунар. участием, г. Киров, 18-20 апреля 2013 г. – Киров : Веси, 2013 – С. 188-191.

50. **Олькова, А. С.** Диагностика состояния почв г. Кирова различными методами / А. С. Олькова, Ю. С. Шабалина. – Текст : непосредств. // Бизнес. Наука. Экология родного края: проблемы и пути их решения : мат. Всерос. науч.-практ. конф.-выставки эколог. проектов с международ. участием, г. Киров, 18-20 апреля 2013 г. – Киров : Веси, 2013 – С. 176-179.
51. **Олькова, А. С.** Влияние комплексообразования на токсичность для простейших (*Paramecium caudatum*) модельных растворов / А. С. Олькова, Ю. Н. Некрасова, Е. В. Дабах. – Текст : непосредств. // Бизнес. Наука. Экология родного края: проблемы и пути их решения : мат. Всерос. науч.-практ. конф.-выставки эколог. проектов с международ. участием, г. Киров, 18-20 апреля 2013 г. – Киров : Веси, 2013 – С. 174-176.
52. **Олькова, А. С.** Трофическая активность *Daphnia magna* как тест-функция при определении интегральной токсичности / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Биология - наука XXI века : сб. тез. 17-ой Международ. Пушин. шк.-конф. молодых ученых, г. Пушкино, 21-26 апреля 2013 г. – Пушкино : [б. и.], 2013. – С. 558.
53. **Олькова, А. С.** Поиск информативных тест-функций *Daphnia magna* при биотестировании компонентов окружающей среды / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Биосистема: от теории к практике : сб. тез. – Пушкино : [б. и.], 2013. – С. 92-94.
54. **Олькова, А. С.** Опыт исследования природно-техногенных систем биосферы методами биотестирования: особенности проблемы, пути решения / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. наук. пр. : т. 12. – Киев : Логос, 2013. – С. 22-27.
55. **Олькова, А. С.** Особенности биотестирования компонентов окружающей среды / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : мат. XI Всерос. науч.-практ. конф.-выставки эколог. проектов с международ. участием, г. Киров, 26-28 ноября 2013 г. – Киров : Веси, 2013 – С. 96-98.
56. **Олькова, А. С.** Проблемы биотестирования почв по аттестованным методикам / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Доклады по экологическому почвоведению. – 2013. – Т. 1, № 18. – С. 165-175.
57. **Олькова, А. С.** Изучение многообразия ответных реакций *Daphnia magna* в экспериментах по установлению хронической токсичности / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование : тр. III международ. науч.-практ. конф. молодых ученых, г. Москва, 17-19 апреля 2014 г. – Москва : Буки-Веди, 2014. – С. 33-35.
58. **Олькова, А. С.** Оценка токсичности пластизолей на основе разных пластификаторов с помощью *Daphnia magna* / А. С. Олькова, К. А. Жилин, Е. В. Уткина. – Текст : непосредств. // Экология родного края: проблемы и пути их решения : мат. Всерос. конф. с международ. участием, г. Киров 22-24 апреля 2014 г. – Киров : веси, 2014. – С. 177-179.
59. **Олькова, А. С.** Исследование влияния сезонной динамики двигательной активности низших ракообразных / А. С. Олькова, К. К. Ситникова. – Текст : непосредств. // Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем : мат. Всерос. науч. конф., г. Киров, 22-23 апреля 2014 г. – Киров : [б. и.], 2014. – С. 299-302.

60. Шабалина, Ю. С. Оценка состояния почв г. Кирова по содержанию тяжелых металлов и интегральной токсичности / Ю. С. Шабалина, **А. С. Олькова**, Г. И. Березин. – Текст : непосредств. // Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем : мат. Всерос. науч. конф., г. Киров, 22-23 апреля 2014 г. – Киров : [б. и.], 2014. – С. 125-129.
61. **Олькова, А. С.** Обеспеченность природоохранной практики методиками биотестирования / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем : мат. Всерос. науч. конф., г. Киров, 22-23 апреля 2014 г. – Киров : [б. и.], 2014. – С. 289-295.
62. Синтез и изучение свойств медьсодержащих соединений глутатиона / Е. И. Лялина, А. И. Фокина, Т. Я. Ашихмина, **А.С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем : мат. Всерос. науч. конф., г. Киров, 22-23 апреля 2014 г. – Киров : Веси, 2014. – С. 316-319.
63. **Олькова, А. С.** Сравнительная оценка аттестованных методик биотестирования / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Биология - наука XXI века : сб. тез. 18-ой Международ. Пушин. шк.-конф. молодых ученых, г. Пушкино, 21-25 апреля 2014 г. – Пушкино : [б. и.], 2014. – С. 434-435.
64. **Олькова, А. С.** Токсичность хлорида стронция в ряду поколений *Daphnia magna* / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Техногенные системы и экологический риск : тез. докл. XI Регион. науч. конф. г. Обнинск, 24-25 апреля 2014 г. – Обнинск : ИАТЭ, 2014. – С.111-113.
65. **Олькова, А. С.** Влияние сверхнормативного содержания бора в подземных водах на их хроническую токсичность / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Устойчивое развитие территорий: теория и практика : материалы VI Всерос. науч.-практ. конф. (16-17 мая 2014 г.), г. Сибай. – Сибай : Изд-во ГУП РБ «СГТ», 2014. – С. 240-242.
66. **Олькова, А. С.** Оценка трофической активности *Daphnia magna* как тест-функции при биотестировании / А. С. Олькова, О. В. Скрябина. – Текст : непосредств. // Экспериментальная и теоретическая биофизика-2014 : сб. тез. Международ. конф. молодых ученых. – Пушкино : Fix-Print, 2014. – С. 182-183.
67. **Олькова, А. С.** Анализ информативности тест-функций *Daphnia magna* / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Экотоксикология-2014 : мат. и докл. Всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи. – Тула : Изд-во ТулГУ, 2014. – С. 23.
68. Бабина, А. Г. Чувствительность низших ракообразных к загрязнению минеральными формами азота / А. Г. Бабина, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Техногенные системы и экологический риск : тез. докл. XI Регион. науч. конф., г. Обнинск, 24-25 апреля 2014 г. – Обнинск : ИАТЭ, 2014 – С. 82-83.
69. Влияние глутатиона на токсичность растворов сульфата меди (II) / Е. И. Лялина, А. И. Фокина, **А. С. Олькова**, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредств. // XXVI Международная Чугаевская конференция по координационной химии : тез. докл. – Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2014. – С. 684.
70. **Олькова, А. С.** Токсикологическая оценка поливинилхлоридных пластикатов / А. С. Олькова, Д. В. Будина, М. С. Краснов. – Текст : непосредств. // Экотоксикология-2014 : докл. Всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи. – Тула : Изд-во ТулГУ, 2014. – С. 24.

71. **Олькова, А. С.** Влияние сезонных ритмов на тест-функции *Daphnia magna* / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Биоразнообразие и устойчивость живых систем : мат. XIII Международ. науч.-практ. эколог. конф., г. Белгород, 6-11 октября 2014 г. – Белгород : Белгород, 2014. – С. 150-151.
72. **Олькова, А. С.** Многообразие тест-функций *Daphnia magna*: возможности и особенности их использования / А. С. Олькова. – Текст : непосредств. // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы : материалы V всерос. конф. по водной экотоксикологии, г. Ярославль, 28 окт. – 1 нояб. 2014 г. : т. 2. – Ярославль : Филигрань, 2014. – С. 104-108.
73. Исследование токсичности водных вытяжек из поливинилхлоридных пластикутов / **А. С. Олькова**, Д. В. Будина, К. А. Жилин, М. Н. Черемухин. – Текст : непосредств. // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : мат. XII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 2–3 декабря 2014 г. : кн. 1. – Киров : Веси, 2014. – С. 259-263.
74. **Олькова, А. С.** Сравнение ответных реакций дафний и цериодафний к загрязняющим веществам / А. С. Олькова, И. Л. Галимова. – Текст : непосредств. // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : мат. XII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 2–3 декабря 2014 г. : кн. 1. – Киров : Веси, 2014. – С. 230-235.
75. Отклик тест-организмов различной систематической принадлежности на действие ионов меди (II) в присутствии глутатиона / Е. И. Лялина, А. И. Фокина, **А. С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : мат. XII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 2–3 декабря 2014 г. : кн. 1. – Киров : Веси, 2014. – С. 210-215.
76. Влияние органических веществ на результаты биотестирования почв, загрязнённых тяжёлыми металлами / А. И. Фокина, **А. С. Олькова**, Е. И. Лялина, З. В. Кабалоев. – Текст : непосредств. // Биология – наука XXI века : сб. тез. 19-ой международ. Пушин. шк.-конф. молодых учёных, 20–24 апр. 2015 г. – Пушкино : [б. и.], 2015. – С. 447–448.
77. Исследование водных экстрактов поливинилхлоридных пластикутов методами биотестирования / **А. С. Олькова**, В. С. Крюков, Д. В. Будина [и др.]. – Текст : непосредств. // Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам : сб. мат. Всерос. науч. конф. г. Киров, 22-25 апреля 2015 г. – Киров : ВЕСИ, 2015. – С. 24-27.
78. Исследование мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ) в качестве биопротекторов для гидробионтов (на примере *Daphnia magna*) / **А. С. Олькова**, М. С. Краснов, В. П. Ямскова, И. А. Ямсков. – Текст : непосредств. // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины : материалы VI Международ. науч.-практ. конф., г. Ростов-на-Дону, 1-3 октября 2015г. – Ростов-на-Дону : [б. и.], 2015. – С. 32-36.
79. Новые подходы к оценке безопасности и корректировке рецептуры поливинилхлоридных пластикутов с помощью биотестирования и биосенсорного анализа / Д. В. Будина, **А. С. Олькова**, Т. Н. Кувичкина, А. Н. Решетилов. – Текст : непосредств. // Экотоксикология-2015 : мат. Всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи. – Тула : Изд-во Тул. гос. ун-та, 2015. – С. 11.

80. **Олькова, А. С.** Влияние специфических органических соединений на степень токсичности тяжелых металлов / А. С. Олькова, А. И. Фокина, Е. И. Лялина. – Текст : непосредств. // Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование : сб. ст. IV-ой междунаро. науч.-практ. конф. молодых ученых, 16-18 апреля 2015 г. – Москва : Буки-Веди, 2015. – С. 38-40.
81. **Олькова, А. С.** Корректировка чувствительности лабораторных тест-культур / А. С. Олькова, А. И. Фокина. – Текст : непосредств. // Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам : сб. мат. Всерос. науч. конф. г. Киров, 22-25 апреля 2015 г. – Киров : Веси, 2015. – С. 55-57.
82. **Олькова, А. С.** Исследование влияния условий культивирования на состояние модельных популяций *Daphnia magna* / А. С. Олькова, А. К. Тарабрина. – Текст : непосредств. // Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам : сб. мат. Всерос. науч. конф. г. Киров, 22-25 апреля 2015 г. – Киров : Веси, 2015. – С. 57-59.
83. Определение качества воды Омутнинского водохранилища по данным химического и токсикологического анализов / Т. И. Кутявина, **А. С. Олькова**, Е. А. Домнина, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредств. // Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам : сб. мат. Всерос. науч. конф. г. Киров, 22-25 апреля 2015 г. – Киров : ВЕСИ, 2015. – С. 342-345.
84. Оценка протекторных свойств пептидных биорегуляторов методами биотестирования / **А. С. Олькова**, Д. В. Будина, М. С. Краснов [и др.]. – Текст : непосредств. // Естественные и математические науки в современном мире : сб. науч. трудов по итогам междунаро. науч.-практ. конф. г. Уфа, 10 сентября 2015 г. Вып. 2. – Уфа : Инновационный центр развития образования и науки, 2015. – С. 22-25.
85. **Олькова, А. С.** Оценка безопасности ПВХ пластикатов с помощью биотестирования и биосенсорного анализа / А. С. Олькова, Д. В. Будина, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредств. // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : мат. XIII всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 1-2 дек. 2015 г. : кн. 2. – Киров : Веси, 2015. – С. 284-287.
86. Дабах, Е. В. Сравнительная оценка качества воды пойменных озер методами биотестирования / Е. В. Дабах, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : мат. XIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (г. Киров, 1–2 декабря 2015) : кн. 2. – Киров : Веси, 2015. – С. 268-270.
87. Протекторное действие биорегулятора, выделенного из сыворотки крови быка, при воздействии меди на простейших *Paramecium caudatum* / **А. С. Олькова**, М. С. Краснов, В. П. Ямскова, И. А. Ямсков. – Текст : непосредств. // VII Международный конгресс «Слабые и сверхмалые поля и излучения в биологии и медицине» : науч. тр. конгресса. – Санкт-Петербург : Оккервиль, 2015. – С. 76.
88. Оценка экологического состояния Омутнинского водохранилища методами биоиндикации и биотестирования / Т. И. Кутявина, М. Л. Цепелева, **А. С. Олькова**, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредств. // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : мат. XIII всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 1-2 дек. 2015 г. : кн. 2. – Киров : Веси, 2015. – С. 57-61.

89. **Олькова, А. С.** Экспресс оценка токсичности водных сред по двигательной активности *Daphnia magna* Straus / А. С. Олькова, Е. В. Бармина, А. И. Фокина. – Текст : непосредств. // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : мат. XIII всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 1-2 дек. 2015 г. : кн. 2. – Киров : Веси, 2015. – С. 266-268.
90. Различные подходы в исследовании токсичности почв, загрязненных соединениями тяжелых металлов / А. И. Фокина, Л. И. Домрачева, С. Г. Скугорева, **А.С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Экология родного края: проблемы и пути решения : сб. мат. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (28–29 апреля 2016 г.) : кн. 2. – Киров : Радуга-ПРЕСС, 2016. – С. 64-67.
91. **Олькова, А. С.** Разработка и апробация метода оценки токсичности водных сред по двигательной активности *Daphnia magna* Straus / А. С. Олькова, Е. А. Санникова. – Текст : непосредств. // Экология родного края: проблемы и пути решения : сб. мат. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (28–29 апреля 2016, г. Киров) : кн. 1. – Киров : Радуга-ПРЕСС, 2016. – С. 386-390.
92. **Олькова, А. С.** Оценка токсических эффектов в ряду поколений *Daphnia magna* как подход биотестирования / А. С. Олькова, Г. Я. Кантор. – Текст : непосредств. // Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии : мат. международ. симпозиума и школы, г. Москва, 25-28 октября 2016 г. – Москва : ГЕОС, 2016. – С. 174-177.
93. **Олькова, А. С.** Применение метода биотестирования по изменению двигателей активности *Daphnia magna* Straus для поверхностных вод / А. С. Олькова, Е. А. Санникова, Т. И. Кутявина. – Текст : непосредств. // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : мат. XIV Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (5-8 декабря 2016 г.) : кн. 1. – Киров : Радуга-Пресс, 2016. – С. 207-209.
94. Сопоставление результатов биодиагностики и химического анализа проб урбаноземов / А. И. Фокина, Л. И. Домрачева, Е. И. Лялина, **А.С. Олькова** [и др.]. – Текст : непосредств. // Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии : материалы международ. симпозиума и школы, г. Москва, 25-28 октября 2016 г. – Москва : ГЕОС, 2016. – С. 239-241.
95. Маркина, Е. О. Исследование протекторных свойств торфогеля / Е. О. Маркина, Н. В. Сырчина, **А. С. Олькова**. – Текст : непосредств. // Экология родного края: проблемы и пути их решения : мат. XII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 13-14 апреля 2017 г. : кн. 1. – Киров : Изд-во ВятГУ, 2017. – С. 227-230.