

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Вятский государственный университет»**

На правах рукописи



ОЛЬКОВА АННА СЕРГЕЕВНА

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

03.02.08 – Экология (биология)

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор технических наук,
профессор Ашихмина Т. Я.

Киров – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. БИОТЕСТИРОВАНИЕ В ОХРАНЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	17
1.1. Теоретические основы биотестирования.....	17
1.1.1. Базовые понятия и принципы биотестирования.....	17
1.1.2. Использование методов биотестирования в экологических исследованиях.....	21
1.1.3. Анализ тенденций развития методологии биотестирования.....	25
1.2. Факторы, влияющие на результаты биотестирования.....	29
1.2.1. Свойства тестируемой среды и ее компонентов.....	30
1.2.1.1. Характеристики, влияющие на токсичность химических веществ	30
1.2.1.2. Физико-химические свойства тестируемой водной среды и биодоступность токсикантов.....	36
1.2.1.3. Поведение токсикантов при их совместном присутствии в водных средах	42
1.2.2. Свойства тест-организмов – мишеней действия токсикантов.....	46
1.2.2.1. Механизмы различной чувствительности организмов к токсикантам.....	46
1.2.2.2. <i>Daphnia magna</i> Straus – базовый тест-организм.....	50
1.2.2.3. <i>Ceriodaphnia affinis</i> Lilljeborg.....	60
1.2.2.4. <i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg.....	63
1.2.2.5. <i>Escherichia coli</i>	66
1.2.3. Условия проведения биотестирования.....	69
1.2.3.1. Стандартизация тест-культур и понятие здоровья тест-организмов.....	70
1.2.3.2. Стандартизация условий культивирования тест-организмов для получения воспроизводимых результатов	74

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	81
2.1. Материалы исследований.....	81
2.2. Методы исследования токсичности водных сред.....	85
2.2.1. Методика определения токсичности водных сред по гибели и плодovitости <i>D. magna</i>	85
2.2.2. Методика определения токсичности водных сред по смертности и плодovitости <i>C. affinis</i>	87
2.2.3. Методика определения токсичности водных сред по изменению хемотаксической реакции <i>P. caudatum</i>	88
2.2.4. Методика определения токсичности водных сред по изменению биолюминесценции <i>E. coli</i>	90
2.2.5. Обеспечение объективности и математической достоверности результатов работы.....	92
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКОЙ СТРАТЕГИИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С УЧЕТОМ МНОГОФАКТОРНОСТИ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ТЕСТ-ОРГАНИЗМОВ	93
3.1. Целевой выбор биотестов для диагностики установленного основного фактора токсичности.....	94
3.1.1. Алгоритм предварительного целевого выбора биотестов для экологических исследований.....	94
3.1.2. Разработка и апробация рядов чувствительности биотестов к минеральным веществам: соединениям тяжелых металлов, азота и фосфора.....	98
3.1.3. Разработка и апробация рядов чувствительности биотестов к водным средам, содержащим органические вещества: гербициды, нефтепродукты, фталаты.....	133
3.1.4. Применение алгоритма выбора целевых биотестов для оценки протекторного действия биологически активных веществ.....	161

3.1.4.1. Оценка протекторного действия восстановленного глутатиона.....	162
3.1.4.2. Оценка протекторного действия белковых биорегуляторов.....	167
3.1.5. Использование стратегии предварительного целевого выбора биотестов в исследовании нативных сред.....	171
3.2. Биотестирование водных сред в условиях неустановленного фактора токсичности по реакциям базового тест-организма <i>D. magna</i>	177
3.2.1. Экспресс-биотестирование по двигательной активности <i>D. magna</i>	178
3.2.1.1. Апробация экспресс-биотеста на модельных водных средах.....	181
3.2.1.2. Исследование нативных сред с использованием биотеста по двигательной активности <i>D. magna</i>	184
3.2.2. Системное биотестирование по спектру тест-функций <i>D. magna</i>	189
3.2.2.1. Спектр тест-функций <i>D. magna</i> для системного биотестирования.....	189
3.2.2.2. Разработка системного биотеста по последовательной оценке спектра тест-функций <i>D. magna</i>	200
3.2.2.3. Апробация системного биотеста по последовательной оценке спектра тест-функций <i>D. magna</i>	214

3.3. Контроль показателей здоровья тест-культур для стандартизации и определения пригодности к биоанализам.....	225
3.3.1. Анализ проблем культивирования и проведения биоанализов на примере <i>D. magna</i>	225
3.3.2. Экспериментальное определение количественных параметров здоровья тест-культуры на примере <i>D. magna</i>	229
3.3.3. Влияние химического состава культивационной воды на результат биотестирования.....	238
3.3.4. Влияние сезона года на чувствительность тест-организмов.....	241
3.3.5. Рекомендации по культивированию и контролю здоровья тест-культур на примере <i>D. magna</i>	243
3.3.6. Использование стратегии стандартизации тест-культуры и определения ее пригодности к биоанализам в лаборатории биотестирования.....	250
3.4. Оптимизация планирования и проведения биоанализов с использованием новой стратегии биотестирования.....	256
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	262
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	266
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	267
ПРИЛОЖЕНИЯ	331
Приложение 1. Протокол полного химического и микробиологического анализа культивационной воды для тест-культур, использованных в работе.....	331

Приложение 2. Протокол краткого ежемесячного химического и микробиологического анализа культивационной воды для тест-культур, использованных в работе.....	334
Приложение 3. Соотношение массовых концентраций и количества вещества фосфат-анионов и пиррофосфат-анионов в растворах для биотестирования с помощью низших ракообразных <i>D. magna</i> и <i>C. affinis</i>	336
Приложение 4. Соотношение массовых концентраций и количества вещества фосфат-анионов и пиррофосфат-анионов в растворах для биотестирования с помощью микроорганизмов <i>E. coli</i> и <i>P. caudatum</i>	337
Приложение 5. Внешний вид полевых опытных площадей и проб почв для анализа в эксперименте «Чувствительность биотестов к минеральным формам фосфора».....	338
Приложение 6. Опросные листы для сотрудников лабораторий биотестирования «Проблемы и особенности биотестирования».....	339
Приложение 7. Обобщение ответов на опросные листы для сотрудников лабораторий биотестирования.....	342
Приложение 8. Форма протокола регистрации результатов биотестирования по системе последовательной оценки спектра тест-функций <i>D. magna</i>	346
Приложение 9. Визуальная диагностика некоторых отклонений здоровья культуры <i>D. magna</i>	352
Приложение 10. Акты апробации и внедрения результатов работы.....	354

ВВЕДЕНИЕ

Экология как наука, решающая проблемы биосферы и человечества, грозящие их устойчивому существованию, насыщена современными прикладными направлениями, базирующимися на фундаментальных законах факториальной, популяционной и других разделах экологии, сформулированными в начале-середине XX века [214, 375]. Наиболее актуальны экологические исследования, посвященные решению глобальных экологических проблем – это общее название проблем, появившихся вследствие чрезмерного воздействия цивилизации на биосферу, в результате которого возникла угроза утраты окружающей средой свойств устойчивости, перехода ее к состоянию, несовместимому с существованием цивилизации или, во всяком случае, гораздо менее соответствующему потребностям человечества, чем современное [243, 387]. Это определение, предложенное В. И. Даниловым-Данильяном, – известным экологом-практиком и политиком, внедрившим многие принципы рационального природопользования на посту министра охраны окружающей среды и природных ресурсов РФ (1991-1996 гг.), подтверждает не только общенаучную, но и социальную важность экологических исследований.

Загрязнение компонентов окружающей среды – одна из глобальных экологических проблем, которая требует развития и применения методов, направленных на оценку опасности отдельных химических веществ и их смесей, обнаружения их в окружающей среде, оценку влияния спектра поллютантов на живые системы разного уровня и других прикладных природоохранных приемов [5, 246, 314, 377, 392, 417]. Развивающаяся в Европе концепция «Зеленой химии» требует использования биотестирования как одного из важнейших инструментов контроля качества продукции, выпускаемых сточных вод, принимающих их природных вод или грунтов [323, 419].

Необходимость перехода к оценкам загрязнения окружающей среды и его последствий по отклику живых организмов и экосистем на антропогенное воздействие обосновывается во введении к монографии А. М. Никанорова и Н. М. Трунова «Внутриводоемные процессы и контроль качества природных вод» [147]. Такая позиция связана со стремлением специалистов оценить безопасность исследуемого образца, отобранного из окружающей среды, и одновременной сложностью и высокой стоимостью определения в каждой пробе полного перечня химических веществ и продуктов их взаимодействия.

Важное значение биотестирования для реализации экологического подхода к оценке антропогенных воздействий декларируется в работах Н. С. Строганова – основоположника базовых принципов биотестирования в нашей стране [228, 229, 248]. Эту позицию поддерживают и доказывают работы его коллег и последователей, заложивших основы методологии биотестирования: Л. П. Брагинского, Л. А. Лесникова, Б. А. Флерова [59, 61, 126, 128, 254, 255, 256, 257].

Флагманами в области современного российского и мирового биотестирования являются ученые Московского государственного университета. В работах О. Ф. Филенко биотестирование рассматривается как инструмент для контроля качества окружающей среды и нормирования уровней загрязнения [247, 246, 249, 250]. Под руководством В. А. Тереховой разрабатываются инновационные методы биотестирования почв (37, 151, 227, 232, 233, 271). В работах Е. Ф. Исаковой с соавторами изучаются фундаментальные и прикладные аспекты использования низших ракообразных в биотестировании [74, 100, 101, 252].

Несмотря на распространенность и востребованность методов биотестирования в охране окружающей среды, у этой группы методов остаются нерешенные научно-методологические проблемы. В настоящее время в области биотестирования главенствует позиция получения информативных и достоверных результатов биотестов за счет увеличения их

количества. В «батарею биотестов» включают новые методы биотестирования, направленные на глубокий анализ влияния токсикантов на подопытных организмов, например, учет биохимических и генетических нарушений тест-организмов. Однако такие подходы не решают проблемы выбора наиболее информативных биотестов, строгой стандартизации тест-культур и учета тест-функций, сигнализирующих об экологически значимых воздействиях токсикантов. Эта научная проблема многогранна, и от ее успешного решения зависит принятие многих природоохранных решений.

Принципы «Effect-directed analysis (EDA)» – эффективно направленного анализа – декларируют не только необходимость биотестирования и использование «батареи биотестов», но и целевой выбор наиболее чувствительных биотестов [323]. Однако процедура данного выбора в условиях многообразия биотестов, используемых тест-организмов и их тест-функций не описана.

Ученые во всем мире работают над повышением достоверности, воспроизводимости и чувствительности биотестов [286, 342]. При этом отмечают, что «редко, когда 2–3 суточные опыты адекватно характеризуют биологическую и экологическую угрозу конкретного загрязнения» [253]. Следовательно, продолжается поиск тест-систем, сочетающих в себе оперативность диагностики загрязнения и информативность в части прогнозирования экологически значимых последствий эффектов токсикантов в окружающей среде.

Воспроизводимость результатов биотестирования напрямую зависит от используемых тест-организмов – «датчиков» уровня токсичности оцениваемой среды [58]. Их современная стандартизация ограничивается точным определением биологического вида и калибровкой организмов по чувствительности к модельному токсиканту. Проблема более строгой стандартизации и контроля пригодности тест-культур для целей биотестирования не решена.

Отсутствие унификации в процессах биотестирования остается проблемой не только при использовании разных тест-организмов, но также одних и тех биологических видов [408]. Не достигнуто консенсуса и по таким вопросам стандартизации в области биотестирования как регламентация химического состава культивационных вод для аквакультур и выбор модельного токсиканта для установления чувствительности организмов [294].

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. 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 [376, 408].

Обозначенные методологические проблемы биотестирования требуют перехода от количественных подходов в биотестировании к интеллектуально-качественным стратегиям, направленным на получение достоверных и экологически значимых результатов.

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.

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 системы научно-обоснованной стратегии для планирования и проведения биотестирования, как вспомогательного инструмента управления качеством биоанализов.

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.

Научная новизна. 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 распространенным 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 единственному – базовому – тест-организму *Daphnia magna*. 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 тестируемой среды. 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 понятии «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.

Практическая значимость. 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».

Основные положения, 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.

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, 2006-2017 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 «CHEMDET-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.

Разработка и апробация результатов работы осуществлялась также в процессе выполнения автором технических заданий грантов:

– грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-3326.2012.5 «Поиск и разработка информативных методов и критериев геоэкологической оценки состояния природно-техногенных комплексов» (2012, 2013 гг.), руководитель;

– грант Российского фонда фундаментальных исследований 14-34-50224 «Развитие методологии оценки безопасности минеральных и органических соединений с помощью химических и токсикологических методов» (2014 г.), исполнитель;

– грант Российского фонда фундаментальных исследований 15-34-5038715 «Оценка протекторных свойств пептидных биорегуляторов для гидробионтов методами биотестирования» (2015 г.), исполнитель;

– грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-3964.2015.5 «Разработка и использование биологических методов в комплексной геоэкологической оценке природных и антропогенно трансформированных экосистем» (2015, 2016 гг.), исполнитель.

Материалы исследований и личный вклад автора в решение проблемы. В основе диссертационной работы оригинальные материалы, собранные в результате многолетних (2006–2020 гг.) лабораторных и полевых экспериментальных исследований автора. Лабораторные эксперименты выполнены на базе Научно-исследовательской экоаналитической лаборатории Вятского государственного университета (г. Киров), регулярно подтверждающей свою компетентность при аккредитации и процедурах проверки специалистами Росаккредитации РФ. Пробы компонентов окружающей среды для апробации разрабатываемых подходов отбирались в Кировской области: в зоне влияния объекта хранения и уничтожения химического оружия (ОХУХО) «Марадыковский», в районе химических предприятий г. Кирово-Чепецка и Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов, а также на территориях различных урбоэкосистем.

Личное участие автора заключалось в выявлении научно-прикладных проблем в сфере биотестирования на собственном опыте работы в сфере токсикологических анализов, в дальнейшем выборе и теоретическом обосновании направлений и тематики исследований, планировании и выполнении основного объема эксперимента, обсуждении, интерпретации и обобщении полученных данных, апробации результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 97 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 – 55.

ГЛАВА 1. БИОТЕСТИРОВАНИЕ В ОХРАНЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

1.1. Теоретические основы биотестирования

1.1.1. Базовые понятия и принципы биотестирования

В настоящее время на биотестирование, как практический прием определения степени опасности сред, веществ и материалов с помощью экспериментов с подопытными организмами, опираются в своих закономерностях и выводах многие научные направления: прежде всего различные отрасли токсикологии, экологии, фармацевтики, ветеринария, химия пищевых продуктов и т. д. В представленной работе биотестирование рассматривается с точки зрения использования в экологических, природоохранных целях. Поэтому из множества определений, данных биотестированию, приводим вариант научной школы Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, работающей в области биодиагностики состояния окружающей среды. Биотестирование – это оценка качества компонента окружающей среды по ответным реакциям стандартизированных тест-организмов, содержащихся в лабораторных условиях [234].

В России научная и методическая основа биотестирования создавалась Н. С. Строгановым, который уделял большое внимание разработке критериев токсичности, принципов разработки методик токсикологического анализа [120]. Под руководством Н. С. Строганова вышел первый масштабный сборник методик биотестирования [136]. Его работы внесли вклад в развитие нормирования загрязнения водных сред [142], в изучение действия ряда токсикантов на гидробионтов [212, 230, 231].

Далее выходят в свет работы Л. А. Лесникова, который разрабатывал биотесты по ответным реакциям низших ракообразных [126, 127]. Его многолетняя работа с рачками *D. magna* отражена в актуальных и ценных до

сих пор методических указаниях [209]. Затем получили признание, как в России, так и за рубежом, работы основателей научных школ в области биодиагностики Б. А. Флёрва [254, 257], О. Ф. Филенко [247, 247], Л. П. Брагинского [59, 60, 61]. Эти ученые, по словам О. Ф. Филенко и Г. М. Чуйко, «первопроходцы» в области биотестирования и водной токсикологии [248], чьи труды сформировали основные понятия и принципы биотестирования.

Биотестирование направлено на оценку суммарного токсического действия всего комплекса загрязняющих веществ (ЗВ), содержащихся в исследуемой среде (пробе). В результате лабораторного исследования с помощью тест-организмов устанавливается токсичность среды как интегральный показатель ее загрязнения. Основная задача биотестирования – установить наличие или отсутствие интегральной токсичности (острого или хронического действия) [44].

В этой части биотестирование опирается на закономерности и принципы токсикологии, в том числе и экологической токсикологии. Основные понятия этих наук используются как в научной литературе, так и закреплены в нормативных документах. Токсичность – свойство (способность) химических веществ, действуя на биологические системы немеханическим путем, вызывать их повреждение или гибель, а применительно к организму человека – вызывать нарушение работоспособности, заболевание или гибель [125]. Острое токсическое действие – воздействие, вызывающее быструю ответную реакцию тест-объекта. Хроническое токсическое действие (хроническая токсичность) – воздействие, вызывающее ответную реакцию тест-объекта, проявляющуюся в течение относительно длительного периода времени [231].

Основной принцип биотестирования заключается в одновременном проведении токсикологического эксперимента по определению воздействия на тест-организмы исследуемой пробы и контрольной среды, не содержащей токсических веществ, и последующем сравнении полученных результатов

[258]. В процессе эксперимента подопытную группу организмов помещают в определенный объем тестируемой среды. При этом проводится одновременное тестирование серии разбавлений исходной среды. Это позволяет установить безвредную кратность разбавления пробы (БКР), при которой токсическое воздействие не обнаруживается. Данный принцип лежит в основе установления класса опасности отходов [11].

При биотестировании главным «инструментом» исследователя являются живые тест-организмы – это особи определенного вида, благодаря ответным реакциям которых характеризуют качество тестируемой среды. Тест-объекты (тест-организмы), по определению Л. П. Брагинского – «датчики» сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) среды, независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ [58].

Тест-организмы для биотестирования культивируются в лабораторных условиях. Вся совокупность особей определенного вида, предназначенная для целей биотестирования, называется культурой тест-организмов. Часть культуры, используемая в конкретном эксперименте, называется модельной группой. Также допустимо понятие модельная популяция, если группа особей поддерживает свою жизнеспособность и может давать потомство в течение длительного времени при поддержании необходимых условий. Количество особей в модельной группе должно быть минимально необходимым для того, чтобы получать достоверные результаты [169, 258].

В процессе биотестирования у тест-организмов наблюдают и оценивают их тест-функции. Тест-функция (тест-реакция) – реакция тест-организма, используемая для определения токсичности тестируемой среды [234]. Оцениваемые реакции могут относиться к морфологическим,

физиологическим, биохимическим, поведенческим реакциям организмов. В острых токсикологических экспериментах распространенной и удобной в силу своей однозначности является тест-функция гибели. Однако, все чаще в ходе исследований предлагаются новые методики биотестирования, направленные на оценку сублетальных эффектов, то есть происходящих с живым организмом до наступления крайнего токсического эффекта, гибели. Такие методики позволяют проводить диагностику начальных стадий загрязнения [152, 156].

Современные методы биотестирования позволяют исследовать следующие компоненты окружающей среды: различные поверхностные и подземные природные воды, почву, грунты, донные отложения, и даже воздух. Для экологического контроля важно биотестирование сточных вод, бытовых и промышленных отходов [77]. При этом контакт тест-организмов чаще всего происходит с водной средой: природной или сточной водой, прошедшей пробоподготовку, или с экстрактом (водной вытяжкой) из образца твердого агрегатного состояния [161, 169, 258].

На сегодняшний день методы биотестирования, наряду с методами количественного химического анализа, для использования в государственном экологическом контроле и мониторинге проходят процедуру аттестации. Аттестация методик измерений в соответствии с Федеральным законом от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» – это подтверждение соответствия методик установленным метрологическим требованиям. Внедрение в научные исследования аттестованных методов позволило при условии использования одной и той же методики прийти к определенной степени унификации в процедурах культивирования организмов, проведения биотестов, расчетов и представлении полученных результатов [156].

Таким образом, биотестирование – это междисциплинарная группа методов, выполняющая задачи многих научных направлений. В охране окружающей среды ориентация на ответные реакции живых организмов

является залогом объективной биодиагностики состояния среды и возможных изменений в функционировании биоты, а также оценки иных экологических рисков. Такие важные функции методов биотестирования требуют непрерывного совершенствования методологии проводимых исследований для приближения лабораторных оценок токсичности к диагностике эффектов, производимых токсикантам в окружающей среде.

1.1.2. Использование методов биотестирования в экологических исследованиях

Компоненты окружающей среды часто загрязняются сложными смесями химических веществ, которые могут представлять угрозу для экосистем и здоровья человека. На мировом уровне признано, что химический анализ необходимо совмещать с биотестированием. В последнее время это положение формулировалось в принципах «Effect-directed analysis (EDA)» – эффективно направленного анализа. В работе [323] декларируются положения EDA: тщательное планирование мониторинговых работ, важность условий пробоотбора и пробоподготовки, необходимость стремления к автоматизации процедур анализа для сокращения внутрилабораторных ошибок, аналитическая идентификация токсикантов и целевой выбор наиболее чувствительных биотестов.

В некоторых случаях применять биотестирование для оценки эффективности очистки сточных вод, ремедиации почв, обезвреживания отходов предпочтительнее, чем химические анализы по причине более низкой стоимости и экологической значимости получаемых ответов [300, 394]. Распространяется практика сочетания химического анализа, биосенсорного анализа и биотестирования [328].

Принцип «батареи биотестов» на сегодняшний день является основным при планировании экологических исследований, включающих биотестирование различных сред. Он заключается в использовании

нескольких тест-организмов различной систематической принадлежности, что позволяет выявлять наиболее уязвимое звено биоты. За рубежом обычно используют не менее трех тест-организмов, например низших ракообразных *D. magna*, культуру одноклеточной водоросли *Desmodesmus subspicatus* и высшие водные растения *Lemna minor* [288]. Часто в «батарею биотестов» включают более трех методов [277, 396]. Современные европейские протоколы рекомендуют включать в набор биотестов так называемый FET-test (Fish embryo toxicity) на эмбриотоксичность, оцениваемую по ответным реакциям икры рыбок данио *Danio rerio* [318, 325, 344, 415].

Ученые стремятся установить наиболее чувствительные виды организмов для дальнейшего использования в текущих мониторинговых работах [49, 327], однако универсального алгоритма для этого не выработано. Кроме того, увеличивается разнообразие специфических токсикантов, эффекты действия которых остаются не изученными. Неустановленный фактор токсичности также формируется за счет сочетанного действия веществ, явлений их сорбции, цепных реакций, деструкции первоначально поступивших в среду токсикантов, образования комплексных соединений [284].

В связи с такими специфическими эффектами, разрабатываются масштабные биомониторинговые программы, решающие указанные проблемы увеличением «батареи биотестов». В 2017 году впервые была проведена европейская демонстрационная программа (EDP), нацеленная на совместный мониторинг поллютантов, присутствующих в поверхностных водах в микродозах, и выявлении их специфических эффектов. После твердофазной экстракции органических загрязнителей, пробы биотестировались с оценкой токсичности для водорослей, эмбрионов рыб, выявлением нейротоксичности, анти- и эстрогенности, анти- и андрогенности, активности глюкокортикоидов и веществ, действующих на щитовидную железу млекопитающих. Наиболее выраженными оказались эффекты эстрогенности, токсичности для водорослей и эмбрионов рыб.

Эстрон и фенилуксусная кислота были идентифицированы как наиболее сильные вкладчики в эстрогенность, тогда как гербициды с незначительным вкладом от других микрозагрязнителей были связаны токсичностью для водорослей [327]. Эта коллективная работа показывает, что классические тесты по выживаемости тест-организмов постепенно утрачивают свою актуальность. Их следует рекомендовать для выявления степени токсичности сточных вод, водных экстрактов из отходов и других, насыщенных токсикантами сред. На смену таким методам постепенно приходят биотесты по учету различных предлетальных эффектов, как известных, так и новых тест-организмов.

Разрабатываются новые формы биотестов. Например, Liu с соавторами для использования во множественных («поточных») анализах, а также биотестирования в полевых условиях, предлагает биолуминесцентную нанобумагу «bioluminescent nanopaper (BLN)» [297]. Это интересная разработка заключается в нанесении на целлюлозу с наноструктурой культуры люминесцентных бактерий *Aliivibrio fischeri*. Тест-бумага меняет цвет при воздействии водных сред в зависимости от концентрации токсичных веществ, угнетающих люминесценцию [297].

Продолжают появляться методы биотестирования, основанные на анализе внутриклеточных и генетических изменений в клетках подопытных организмов [284, 410]. Наиболее доступным для реализации является аллиум-тест – биотестирование по изменению митотического индекса клеток корневой меристемы лука *Allium cepa* [52]. Авторы в качестве достоинства отмечают чувствительность этого метода к дозам радиоактивного воздействия в диапазоне доз от 0,1 до 2 Гр [221]. Проведение аллиум-теста выявило цитотоксический эффект воздействия 2,3,7,8- тетрахлордибензо-п-диоксина в концентрациях от 0,05 до 50 нг/кг, который увеличивался при повышении концентрации загрязнителей [54].

Китайские ученые в оценке генотоксичности и мутагенности водных сред используют траскриптомику отдельных клеток человека, что,

безусловно, является сверхновым направлением в биодиагностике. В работе [291] описан биотест по оценке транскрипционной экспрессии 1200 отобранных генов человека в двух клеточных линиях HepG2 и MCF7. Показана зависимость количества нарушений при экспрессии генов от микродоз органических загрязнителей в тестируемых водах. Авторы характеризуют предлагаемый метод как экономически выгодный, однако пока это вызывает сомнения. Тем не менее, перспектива в области оценки безопасности водных сред для человека очевидна: при использовании других тест-организмов приходится полагаться на экстраполяцию данных.

Потребность в автоматизации некоторых процедур биотестирования обсуждалась давно. В России это привело к разработке и внесению в Федеральный реестр оборудования приборов «Спектр-М», «Флуориметр», «Измеритель плотности суспензии», «БиоЛат» и некоторых других [80]. Гораздо реже можно встретить разработки, направленные на непрерывный мониторинг качества воды биологическими методами. В нашей стране впервые такой подход внедрен в практику по мониторингу качества сбрасываемых в Невскую губу биологически очищенных сточных вод в филиале «Водоотведение Санкт-Петербурга» ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга». Биоэлектронная система контроля токсикологической безопасности биологически очищенных сточных вод основана на изменении частоты сердечных сокращений высших ракообразных *Cherax quadricarinatus* в ответ на изменение качества пропускаемых через их аквариумы вод [55]. Такие методы важны для развития системы раннего предупреждения о качестве воды, которые пытаются внедрять во многих странах мира [289, 378].

Рассмотренные новые методы биотестирования в основном отражают современные требования по ранней диагностике загрязнения, однако при этом часто упускаются отсроченные во времени эффекты, способные проявиться в последующих поколениях организмов. В настоящее время

ощущается недостаток методов биотестирования, направленных на учет таких экологически значимых последствий загрязнения окружающей среды.

Таким образом, методы биотестирования в современных экологических исследованиях уже носят не вспомогательный характер, а применяются как основные для получения объективной информации о процессах, происходящих в экосистемах вследствие антропогенных воздействий. На сегодняшний день это достигается увеличением «батареи биотестов» с вовлечением дополнительных тест-организмов и использованием новейших методов, позволяющих фиксировать начальные стадии токсического процесса. Однако, современной антропогенной ситуации требуется не только увеличения числа выполняемых биотестов, но и поиска наиболее чувствительных методов биотестирования в условиях установленного характера загрязнения, а также разработки стратегии исследования при неустановленном факторе токсичности.

1.1.3. Анализ тенденций развития методологии биотестирования

Под методологией биотестирования нами понимается совокупность научно обоснованных подходов к разработке, планированию и реализации методов и приемов биотестирования, в том числе к содержанию и стандартизации тест-организмов, выбору тест-организмов в аспекте особенностей тестируемой среды, объективной оценке наблюдаемых тест-функций, интерпретации полученных ответных реакций.

При решении задач, стоящих перед биотестированием, продолжает формироваться и развиваться методология этой группы методов. Выше было показано, что методы биотестирования становятся все более разнообразными. Одним из основных методологических принципов их разработки является стремление применить тест-функции для ранней диагностики загрязнения окружающей среды. Срез других тенденций современного развития биотестирования, в том числе в части актуальных

методологических разработок, можно получить при анализе научных публикаций, посвященных этой научно-прикладной отрасли.

Общее количество ответов на запрос «bioassay*» за период 2013-2019 гг. в базе данных «Web of Science Core Collection» (WoS) – 55805. Конечно, в эту подборку вошли исследования из области медицины, фармакологии, биохимии и других наук, в которых применяются методы, основанные на изучении реакций организмов в ответ на разнообразные факторы. Конкретизация темы работы позволяет выделить интересы ученых в сфере биотестирования применительно к изучению окружающей среды и ее охране. (рис. 1).

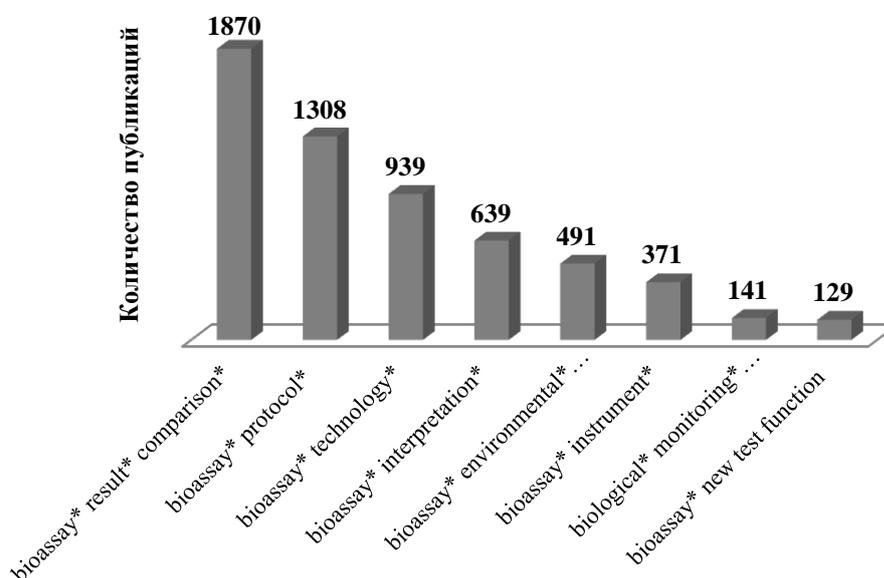


Рисунок 1 – Соотношение различных тем публикаций из области биотестирования (WoS, 2013-2019 гг.)

Запросы с ключевыми словами «bioassay* environmental* pollution*» и «biological* monitoring* bioassay*» в сумме дают 632 – здесь объединились работы, в которых показаны результаты научных исследований с использованием методов биотестирования, проводится сравнение их информативности. Разработка методик биотестирования и их применение оказалась на втором месте среди запросов. Велико разнообразие работ, где авторы пытаются найти подходы к интерпретации результатов биотестирования («bioassay* result* comparison*» – 1870; «bioassay*

interpretation*» – 639). На рисунке 1 представлены и другие актуальные направления исследований в анализируемой сфере.

Благодаря такому анализу баз научных публикаций, диссертационных исследований, методических работ, материалов специализированных конференций «кристаллизовались» тенденции развития методологии биотестирования, представленные ниже:

– накопление банка методик биотестирования. Известны сотни методик биотестирования, десятки из них допущены для целей государственного экологического контроля и мониторинга или аналогичных процедур во многих странах мира [153, 275]. Отметим, что эта позитивная тенденция имеет и недостатки. Многообразие методик ставит перед исследователями вопрос их выбора в условиях конкретных практических задач. При этом многими разработчиками апробируются и внедряются биотесты с использованием новых организмов, порой не всегда доступных широкому кругу исследователей [291, 317, 389, 404];

– разработка специализированного оборудования для биотестирования. Действительно, автоматизация биотестирования крайне важна и открывает новые возможности биотестирования [80, 264, 265, 278]. Однако современные приборы дорогостоящие и должны пройти сложную процедуру включения в федеральный реестр оборудования, иначе они чаще всего остаются инструментом для исследований в руках разработчика. В условиях возрастающей стоимости оборудования, остаются популярными простейшие методы биотестирования с использованием общедоступных средств и распространенных тест-организмов;

– третье направление развития группы методов – поиск новых тест-функций «классических» тест-организмов. На пике популярности биотесты по оценке генетических нарушений. Однако и их внедрение связано со многими сложностями: от недостатка квалифицированных специалистов до упомянутого дорогостоящего оборудования;

– одно из важных направлений развития методологии биотестирования – интерпретация результатов токсикологического анализа компонентов окружающей среды. Это направление является смежным с анализом комплексного загрязнения компонентов окружающей среды и их геохимическими особенностями, поэтому характеризуется повышенной сложностью в поиске закономерностей «доза-эффект» и «время-эффект» в условиях реальных экосистем [412]. Ориентиром для многих в этом направлении стали работы Никанорова, Жулидова и их соавторов и последователей [140, 146, 147, 148].

Выделенные тенденции современного развития биотестирования поддерживают главенствующий методологический подход в получении информативных результатов биотестирования – увеличение «батареи биотестов». Такая «количественная» стратегия биодиагностики состояния компонентов окружающей среды не предлагает целостной концепции планирования и проведения биоанализов, направленных на получение достоверных и экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред. Выше было показано, что не решены научно-методологические вопросы целевого выбора биотестов, создания тест-систем, способных сигнализировать об экологически значимых изменениях в окружающей среде, а также не разработаны принципы и приемы усиления контроля пригодности тест-культур к биоанализам.

При решении этих вопросов необходимо учитывать факторы, влияющие на результаты биотестирования. Обзор и анализ результатов исследований в этой сфере представлен ниже.

1.2. Факторы, влияющие на результаты биотестирования

Условия экспериментов по биотестированию различных сред задаются так, чтобы исключить влияние на тест-организмы факторов окружающей среды или регламентировать их. Такой подход позволяет утверждать, что спустя определенное время состояние подопытных организмов в контрольной и опытной средах будет различаться только вследствие действия химического фактора, то есть совокупности веществ, присутствующих в пробе. Следовательно, оценивая физиологические, морфологические или поведенческие показатели у подопытных организмов, находящихся в опытной пробе и контрольной, условно чистой, среде можно судить о том, что стало причиной их разного состояния в конце опыта. Однако даже при соблюдении выше обозначенного подхода, на результат биотестирования будут влиять множество факторов, которые нужно регламентировать и/или учитывать при интерпретации данных.

Условно эти факторы можно разделить на:

- зависящие от тестируемой среды, ее качественного и количественного химического состава, стабильности химического состава, наличия в среде биогенных и потенциально токсичных веществ, возможного взаимодействия химических веществ в исследуемой среде;

- зависящие от выбранного тест-организма и метода биотестирования, оцениваемой реакции и ее уровня (биохимический, физиологический, морфологический, поведенческий), чувствительности биологического вида тест-организмов к различным токсикантам, внутривидовых различий в восприимчивости к химическим веществам, зависящих в свою очередь от генетической разнородности популяции тест-организмов и генетически необусловленных факторов (возраст, здоровье, биологические ритмы и т. д.);

- факторы, формируемые исследователем – исполнителем процедур, необходимые для реализации биотестирования: условия содержания тест-культуры, состояние тест-культуры на момент проведения эксперимента,

соблюдение требований к лабораторной базе, соблюдение техники эксперимента и т. д.

Основные факторы, влияющие на результат биотестирования, рассмотрены в следующих разделах.

1.2.1. Свойства тестируемой среды и ее компонентов

1.2.1.1. Характеристики, влияющие на токсичность химических веществ

Базовый токсикологический принцип гласит: любая реакция живого организма на внешнее химическое воздействие начинается с молекулярного взаимодействия токсиканта и молекулы биомишени. Поэтому если при биотестировании известно действующее (-щие) вещество (-а), то следует учитывать химическую природу токсиканта при последующем обсуждении получаемых результатов. В таблице 1 обобщены основные свойства химических веществ, влияющие на их опасность для организмов [125, 286, 295, 342].

Таблица 1 – Влияние химической природы вещества на его токсикологические свойства

Характеристика вещества	Механизм взаимодействия молекул Т и БМ*	Влияние на проявление токсичности	Примеры
<p>Размер молекулы и молекулярная масса</p>	<p>От размера молекулы Т зависит способ его проникновения через токсикологические барьеры живого организма: от простой диффузии для наименьших молекул и частиц (ионы неорганических веществ) до активного белкового транспорта (высокомолекулярные соединения) или невозможности проникновения и распространения в организме</p>	<p>Низкомолекулярные соединения обычно легче проникают в организм и быстрее в нем распределяются, чем высокомолекулярные соединения с большим размером молекулы;</p>	<p>Газы (например, CO, CO₂, NH₃) проникают в организм путем диффузии</p>
		<p>Ограничением для проникновения в организм и ткани относительно небольших молекул (50-100 Да) является их высокая гидрофильность и малая липофильность, поскольку большинство токсикологических барьеров «построены» с помощью липидов;</p>	<p>Металлы, сера</p>
		<p>Крупные липофильные молекулы токсичнее, чем гидрофильные высокомолекулярные вещества</p>	<p>Молекулы полимеров не растворимы в жирах – их токсичность до деструкции минимальна</p>
		<p>Увеличение молекулярной массы приводит к возрастанию возможных изомерных форм, каждая из которых обладает уникальной токсичностью</p>	<p>Тетрахлорпарадибензодиоксин может существовать в более чем 100 изомерах, самый токсичный из которых 2,3,7,8-тетрахлор-парадибензодиоксин</p>

Продолжение таблицы 1

<p>Пространственная организация изомеров вещества, изменение взаиморасположения радикалов</p>	<p>Пространственная организация играет важную роль в выполнении БМ их функций. Токсиканты могут либо нарушать координацию БМ либо быть комплементарными им, то есть образовывать комплексы Т-БМ с последующими эффектами, зависящими от концентрации Т, прочности комплекса Т-БМ, важности БМ для жизнедеятельности организма и других факторов</p>	<p>Неорганические вещества, имеющие изомеры, и изомеры низкомолекулярных органических веществ обычно обладают общетоксическим, – неспецифическим действием, поэтому их изомеры не имеют различий в токсичности</p>	<p>Фосфорные кислоты, дихлоэтан</p>
		<p>Изомеры высокомолекулярных токсикантов чаще действуют специфически, то есть имеют высокое химическое сродство к определенному типу биомолекул в организме, которые пространственно строго организованы</p>	<p>Лекарственные препараты, например, действие синтетического инсулина на обмен углеводов; влияние наркотических, фосфорорганических веществ на нейромедиаторы</p>
		<p>Если механизм токсического процесса лежит во взаимодействии радикала или атома, ответственного за изомерию, то токсичность разных изомеров будет существенно различаться, и наоборот – реакционно не активная изомерная часть молекулы слабо влияет на токсичность</p>	<p>В галогенированных бензопиренах с метильными радикалами положение галогенов будет значительно влиять на токсичность, чем метил-радикал</p>

Продолжение таблицы 1

<p>Растворимость в воде и жирах</p>	<p>В основе внутриклеточной и межклеточной жидкости вода, но клеточные мембраны состоят из двойного фосфолипидного слоя. Также и в структуре большинства органов можно встретить чередование водных и липидных барьеров. Кроме того, растворимость в разных средах модифицируется в зависимости от значений pH. Это универсальные механизмы защиты живого организма от проникновения и распространения в них токсикантов</p>	<p>- Чем выше константа диссоциации вещества в воде, тем опаснее оно для организма, так как увеличивает скорость распространения токсиканта в организме; - Плохо растворимые в жирах молекулы практически не проникают в клетки организмов, следовательно, малотоксичны. Исключение – вещества с малой молекулярной массой, проходящие через поры биологических мембран; - Наиболее опасными являются вещества способные растворяться как в воде, так и в липидах</p>	<p>- Хлорид и нитрат бария хорошо растворяются в воде и являются более токсичными по сравнению с малорастворимым сульфатом бария; - Многие соли тяжелых металлов хорошо растворяются в воде и их ионы способны проникнуть сквозь поры биологических мембран, что делает их средне- и высокотоксичными соединениями; - Растворимость спиртов в жирах увеличивается в ответ на возрастание молекулярной массы, что приводит к увеличению токсичности в ряду от метанола к октанолу</p>
<p>Стабильность и химическая активность веществ</p>	<p>Стабильность вещества в окружающей среде способствует его пространственному распространению, что опасно загрязнением большой площади. Химически активные вещества обычно действуют как сильные окислители или восстановители</p>	<p>- Опасность нестабильных веществ оценивается по токсичности их метаболитов. - Химически активные вещества максимально опасны для покровных тканей, слизистых, а также одноклеточных организмов.</p>	<p>- Металлическая ртуть в окружающей среде быстро трансформируется в более токсичную форму – метилртуть; современные пестициды не стабильны в среде: подвергаются фотолизу и гидролизу, разрушаясь на менее токсичные составляющие - Кислоты и щелочи опасны своей химической активностью, они изменяют pH сред живых организмов и приводят к денатурации макромолекул</p>

Продолжение таблицы 1

Тип химической связи Т-БМ	Ионная связь: взаимодействие происходит между разноименно заряженными ионами токсиканта и биомолекулы	Ионная связь опасна образованием прочных нерастворимых продуктов реакции; -	Фториды реагируют с эндогенным кальцием по ионному типу, выводя его из обмена и вызывая гипокальциемию
	Ковалентная связь образуется, если на внешней электронной орбитали двух атомов образуется общая пара электронов	Ковалентная связь «токсикант-биомолекула» приводит к образованию наиболее трудно разрушаемых соединений (энергия связи до 200 кДж/мол), поэтому детоксикация возможна только через выведение из организма молекулы Т-БМ и синтез новых биомолекул, восполняющих утерянную функцию	Воздействие фосфорорганических веществ приводит к длительному блокированию ацетилхолинэстеразы, ответственной за разрушение нейромедиатора ацетилхолина
	Донорно-акцепторная (координационная связь): взаимодействие происходит через предоставление электронной пары одним атомом (донором) другому (акцептору)	Образовавшиеся молекулы Т-БМ могут быть биотрансформированы силами организма, поэтому, летальные дозы таких токсикантов гораздо выше, чем у веществ, взаимодействующих с БМ по ионному и ковалентному типу	Образование карбоксигемоглобина при отравлении монооксидом углерода, который реагирует с ионами железа в составе гемоглобина по донорно-акцепторному типу

Продолжение таблицы 1		
<p>Водородная связь: атом водорода, располагаясь в молекуле в паре с кислородом поляризуется приобретает незначительный положительный заряд, за счет которого возможно слабое притяжение (20 кДж/мол) электроотрицательной частицы</p>	<p>Токсический процесс могут вызвать вещества разрушающие водородные связи в биологических макромолекулах (белках, полисахаридах), нарушая их пространственную организованность</p>	<p>Фториды могут конкурировать с кислородом за взаимодействие с атомом водорода, разрушая связь О-Н, так как электроотрицательность фтора больше, чем кислорода</p>
<p>Силы Ван-дер-Ваальса: неполярная молекула может временно поляризоваться за счет электростатических сил, возникающих, например, от полярных молекул. В том случае возникающий слабый заряд способен «притянуть» разноименно заряженную частицу</p>	<p>Токсичность проявляется, когда во внутреннюю среду организма проникло высокое содержание токсиканта, формирующего с БМ связи Ван-дер-Ваальса, так как сил притяжения временного диполя не хватает, чтобы притянуть небольшое количество молекул Т</p>	<p>Поляризация изначально неполярных участков аминокислот (аланин, лейцин и др.) и взаимодействие с молекулами Т при интоксикации организмов веществами с алкильными и циклическими радикалами</p>

Примечание: * Т – токсикант, БМ – биомишень (здесь: имеем в виду молекулу – биомишень действия токсикантов).

Рассмотренные характеристики веществ проявляются в совокупности с другими факторами: их дозой, продолжительностью контакта с организмами. Известно и логично, что чем выше доза вещества и чем дольше контакт организма с токсикантом, тем больший вред он может нанести. Подробно эти закономерности и их реализация в разных ситуациях рассматриваются в токсикометрии. К наиболее важным, для методологии биотестирования, в частности, для разработки токсикологических методов и интерпретации полученных результатов, относятся химические свойства потенциально токсичных веществ, модифицирующиеся под влиянием компонентов окружающей среды, в которую они поступают.

1.2.1.2. Физико-химические свойства тестируемой водной среды и биодоступность токсикантов

В естественных экосистемах на живые организмы кроме токсичных соединений действует множество абиотических и биотических факторов. Диагностическим преимуществом биотестирования является то, что часть факторов устраняется благодаря постановке эксперимента в контролируемых условиях. Например, такие важные параметры как освещенность, температура, суточные и сезонные колебания физических и физико-химических свойств среды обитания, внутри- и межвидовые конкурентные отношения и другие факторы, вносящие весомый вклад в отклик биоты на загрязнение в естественных условиях, при биотестировании не проявляются. Однако ряд параметров тестируемой среды, представляющий ее химические и физико-химические свойства, продолжает влиять на результат биотестирования. К важнейшим химическим и физико-химическим факторам тестируемых водных сред относятся: количество взвешенных веществ, жесткость воды, значение ее рН, концентрация растворенного кислорода, присутствие в природном растворе таких комплексообразователей как

гуминовые, фульвокислоты, полисахариды, а также присутствие других природных и антропогенно привнесенных веществ, модифицирующих влияние отдельно взятого токсиканта на тест-организм.

Общие закономерности действия факторов тестируемой среды, влияющие на результат биотестирования, кратко обобщены по литературным данным [102, 125, 251, 366, 372, 384] и представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние химических и физико-химических свойств водной тестируемой среды на биодоступность и проявление токсических эффектов загрязняющих веществ

Параметр водной среды	Влияние на биодоступность и токсичность ЗВ	Исключения / примечания
Взвешенное вещество	Снижение токсичности за счет адсорбции и абсорбции растворенных ЗВ	Гидробионты с фильтрующим типом питания поглощают ЗВ вместе со взвесями
Вещества комплексообразователи	Снижение токсичности коррелирует со степенью химического сродства ЗВ и комплексообразователя и константой стабильности образующихся комплексов	Имеются данные о повышении токсичности некоторых хелатных комплексов металлов, например, фульватных комплексов ртути – см. ниже
Жесткость воды	Ионы кальция и магния, обуславливающие жесткость, снижают токсичность, уменьшая проницаемость биологических мембран для других веществ. Дополнительное снижение токсичности, если ЗВ образует карбонатные комплексы или плохо растворимые соединения	Многие органические ЗВ не взаимодействуют с ионами в жесткой воде и/или проникают в организм путем активного транспорта
Уровень pH среды	Количество лабильных токсичных форм большинства неорганических веществ растет в условиях снижения уровня pH	Активная реакция среды сама может выступать как фактор токсичности. Критические уровни видоспецифичны
Растворенный кислород	Увеличение токсичности ЗВ за счет дыхательного стресса гидробионтов, а также увеличение концентрации более токсичных восстановленных форм потенциально токсичных элементов	Критические уровни содержания растворенного кислорода в воде видоспецифичны
Поли-загрязнение	Могут наблюдаться различные эффекты коергизма и псевдокоергизма	См. раздел 1.2.1.3. Поведение токсикантов при их совместном присутствии в водных средах

Перечисленные свойства водной среды влияют на проявление токсичности загрязняющих элементов через процессы формообразования, сорбции и десорбции, окислительно-восстановительных реакций, процессов осаждения и соосаждения элементов. Изучение протекания этих процессов является важным для многих естественнонаучных областей, в том числе охраны окружающей среды и решения таких научно-прикладных задач как интерпретация результатов биотестирования [97, 145]. При этом необходимо учитывать наиболее значимые механизмы изменения биодоступности токсикантов в связи с особенностями химических и физико-химических свойств тестируемых сред.

Многочисленные химические соединения тяжелых металлов, редкоземельных элементов и других микроэлементов различаются по биодоступности в силу разной растворимости и миграционной способности, участию в простых и цепных реакциях, устойчивости, скорости осаждения [129].

Известно, что истинно растворенные формы металлов и микроэлементов – аква-ионы, ионные пары, низкомолекулярные органические соединения, включающие в состав элемент, – обладают максимальной биодоступностью, а соответственно и токсичностью для живых организмов [146]. И напротив, высокомолекулярные органоминеральные вещества, прочные комплексные соединения, а также малорастворимые формы металлов относятся к небiodоступным формам и не вызывают опасных токсических эффектов у живых организмов в природной среде и тест-организмов при биотестировании [102].

Комплексообразование за счет лигандов органического вещества является одним из основных механизмов снижения биодоступности, а, следовательно, и токсичности многих элементов. Известно, что 1 мг/л органического вещества может связать 4,4 мкг/л условного металла. По способности к комплексообразованию с органическими лигандами в

поверхностных водах металлы располагаются в следующий ряд: Sr (<1%) = Mn (<1%) < Zn (10%) < Ni (25%) < Al (30%) < Cu (65%) < Fe (99%) [139].

В поверхностных водах и почвенном растворе в растворенной фракции органического вещества преобладают гуминовые вещества – фульво- и гуминовые кислоты. Комплексные соединения микроэлементов с гуминовыми веществами в зависимости от молекулярной массы представлены растворенными и коллоидными формами, каждая из которых характеризуется определенной степенью устойчивости [86]. Изменение устойчивости этих комплексов зависит, во-первых, от физико-химических характеристик элементов, во-вторых, от качественного состава органических веществ [189, 190], в третьих, от молекулярной массы фульво- и гуминовых кислот [129, 132, 200].

В работах Г. М. Варшала, посвященных ртутному загрязнению природных вод и почв, подробно рассматриваются процессы формообразования ртути за счет взаимодействия с гумусовыми кислотами, составляющими основу запаса органических веществ поверхностных вод и почв. Показано, что в водах богатых гуминовыми кислотами подвижность ртути снижается за счет связывания с ними в меньшей степени по ионообменному типу (около 13%), в большей – благодаря процессу комплексообразования. Противоположный эффект наблюдается в водах, обогащенных фульвокислотами. Они способствуют увеличению подвижности ртути на 1–2 порядка за счет образования прочных высокомолекулярных фульватных комплексов ртути состава Hg:ФК=1:1 анионного типа, устойчивость которых растет с ростом значений pH [66, 67].

В морских экосистемах и устьях рек, впадающих в моря, качественный состав растворенного органического вещества отличается от континентальных поверхностных вод, что также влияет на степень опасности загрязняющих веществ и результаты биотестирования. В присутствии меди показано, что органическое вещество устьевых вод обладает большим

протекторным действием, чем аналогичное его содержание в морской воде [313].

С точки зрения защитной роли органического вещества в условиях присутствия токсичных веществ, поверхностные воды северных районов обладают меньшей устойчивостью к техногенно привнесенным элементам в силу их преобладающей олиготрофности, то есть низкого содержания органического вещества. В этом случае эффект биоаккумуляции приводит к развитию на трофическом уровне гетеротрофов, например, у рыб, элементозависимых патологий. Встречается нефрокальцитоза рыб в водоемах, загрязняемых медно-никелевыми отходами. В ответ на загрязнение стронцием страдают костные ткани, что обуславливает сколиоз и другие патологии позвоночных гидробионтов [139].

Защисление водной среды и почвенного раствора, а также высокое содержание гуминовых веществ, особенно фульвокислот, приводит к увеличению содержания ионных форм металлов, что крайне опасно для гидробионтов [67, 190]. Ситуация усугубляется тем, что многие поверхностные воды северных районов нашей страны отличаются повышенной природной кислотностью, например в бассейне р. Шуи (Россия, Карелия) ряд озер имеет рН воды 5,5 и ниже. Этот фактор приводит к увеличенной лабильности токсичных элементов, что отражается на повышении уровня острой и хронической токсичности вод и донных отложений в биотестах на *C. affinis*, а также проявлении генотоксичности вод в опытах на *Chironomus riparius* Meigen [137].

Эта же проблема освещается Т. И. Моисеенко с соавторами [139]. Ученными на примере восточных тундровых озер Кольского Севера, которые не подвержены влиянию индустрии, показано, что содержание многих микроэлементов повышено в результате естественного закисления природных вод. При этом, безусловно, имеет значение буферная емкость пород, на которых находится водоем. В той же работе исследователями установлено, что в пределах Кольского п-ова в озерах в Хибинских горах, где

породы легко подвержены химическому выветриванию, отмечаются аномально высокие концентрации лабильных Sr и Al (до 400 мкг/л) [139].

Встречаются и противоположные сведения. В работе Картикьяна и Мани, отмечается что токсичность хрома и никеля для индийского карпа значительно выше при высоком значении pH (9,0), чем при низком (6,0), кроме того, токсическое действие этих тяжелых металлов снижается в жесткой воде [109].

Фактор насыщенности природных вод природными солями также является важным при проявлении токсичных свойств многих элементов. В 48-часовом биотесте на эмбрионах голубой мидии *Mytilus galloprovincialis* показано, что при росте солености морских вод действующая доза меди уменьшается [313].

Данные по окислительно-восстановительному видообразованию токсичных элементов остаются ограниченными. Судьба редокс-чувствительных металлов, например, железа и хрома зависит от абиотических окислительно-восстановительных реакций и активности бактерий, ответственных за окислительно-восстановительные взаимопревращения потенциально токсичных элементов. Например, к компонентам, восстанавливающим Cr(VI) относят сульфидные минералы и минералы, содержащие Fe (II), а в реакциях окисления Cr(III) участвует (Mn)(III, IV) и растворенное железо Fe(III) [308]. После окисления хрома до шестивалентного состояния он становится наиболее опасен. Внутри клетки Cr(VI) восстанавливается до метастабильного пятивалентного хрома (Cr(V)), затем до трехвалентного хрома (Cr(III)). Трехвалентный хром, присоединяясь к протеинам, создает гаптены, которые включают иммунную реакцию. После их появления в организме чувствительность к хромю сохраняется. В этом случае даже контакт с текстильными изделиями, окрашенными хромсодержащими красками или с кожей, обработанной хромом, может вызвать раздражение кожи [395].

Таким образом, физико-химические свойства тестируемой среды значительно влияют на эффекты, производимые токсикантами на живые организмы. По этой причине в большинстве методов биотестирования предусмотрены измерение и учет значений рН исследуемой среды, концентрации растворенного кислорода, регулирование температуры среды. При наличии в тестируемой среде такого существенно модифицирующего токсичность фактора, как высокое содержание взвешенных и/или растворенных органических веществ, обычно рекомендуют проводить исследования профильтрованной и не фильтрованной водной среды, затем сравнивать результаты.

Также применяется отстаивание жидкости. Эти дополнительные меры для улавливания возможного присутствия в тестируемой среде токсикантов, безусловно, наиболее эффективно дополнять параллельными химико-аналитическими исследованиями и сопоставлением данных биотестирования и химического анализа.

1.2.1.3. Поведение токсикантов при их совместном присутствии в водных средах

В окружающей среде загрязняющее вещество редко присутствует в одиночку – как монозагрязнитель, чаще всего наблюдается комплексное загрязнение компонентов окружающей среды. Загрязнители могут взаимодействовать друг с другом прямым или косвенным образом [284, 386]. Они могут образовывать комплексы, изменяя растворимость друг друга. Они также конкурируют за одни и те же сайты связывания с веществами и частицами в природных растворах. Эти процессы приводят к модификации токсичности веществ, изначально поступивших в окружающую среду [343, 400, 416].

Эффекты, возникающие при совместном действии токсикантов, без подразделения на механизмы, называют коергизмом [125]. Об истинном

коергизме говорят, когда механизмы действия токсикантов накладываются друг на друга при воздействии на живой объект (от биомолекулы до целого организма). Коергизм включает в себя эффекты аддитивного синергизма, потенцирующего синергизма и антагонизма. Однако еще до аппликации или проникновения в живой организм токсиканты могут вступать во взаимодействие. Такое явление называется превдокоергизмом. В окружающей среде различные виды псевдокоергизма служат факторами устойчивости экосистем. К их основным механизмам относят адсорбцию на поверхности каких-либо частиц, химическое взаимодействие между загрязняющими или природными веществами в почвенном растворе или природной воде, связывание токсикантов с макромолекулами природных растворов. Эти процессы были рассмотрены выше.

Актуальны научные исследования, рассматривающие наиболее сложные ситуации, когда органические и неорганические токсиканты действуют на биоту в среде обитания совместно. В работе McRae с соавторами показан антагонистический эффект кадмия (2 и 9 мкг/л) и антиоксиданта диклофенака (770 мкг/л) при совместном воздействии на тест-организм рыбы *Galaxias maculatus* [379]. Полученные данные указывают на способность каждого из этих токсикантов компенсировать биологические эффекты другого: снижалось воздействие на почечную каталазу, почечную супероксиддисмутазу, глутатион-S-трансферазу. Однако, авторами не даны сведения о механизмах антагонизма. Остается не ясным локализация места взаимодействия токсикантов – раствор или тест-организм.

Пестициды и тяжелые металлы в дозах микроэлементов представляют собой два важных типа загрязнителей окружающей среды, которые в настоящее время могут обнаруживаться в природных водах и почвах одновременно. Они активно сорбируются на взвешенных частицах после попадания в природные водные системы, конкурируя за сайты связывания. В экспериментах по совместному присутствию пестицидов и ТМ показано, что, когда загрязняющие вещества присутствовали в одиночку, у них было другое

поведение, чем когда они присутствовали в ассоциации с другими загрязнителями [283]. Адсорбция пестицида аклонифена была снижена, когда в раствор был добавлен другой пестицид – алахлор, в то же время более растворимый алахлор показал значительное улучшение его адсорбции на взвешенных частицах, когда аклонифен был введен после него. Металлы кадмий и медь были менее подвержены влиянию совместных загрязнителей, чем пестициды. Они не модифицировали адсорбцию высокорастворимого пестицида алахлора, но и конкурировали со слаборастворимым пестицидом аклонифеном за сайты связывания. Совместное сорбционное поведение этих веществ определяет их дальнейший транспорт, биодоступность и экотоксичность в окружающей среде.

В других исследованиях на примере ассоциативного совместного поведения пестицидов и ТМ показано, что сорбция органических загрязнителей на взвешенных частицах в присутствии микроэлементов может уменьшаться из-за образования новых пестицидно-металлических комплексов. Микроэлементы также могут выступать связующим звеном между пестицидами и другими компонентами почвенного раствора, например, органическими веществами, способствуя их адсорбции [282, 334, 362, 370, 343]. Также, помимо комплексообразования, скорость адсорбции ионного пестицида и ТМ может быть изменена колебаниями физико-химических характеристик раствора, которые в свою очередь реагируют на введение нового загрязнителя [282, 334, 406].

При совместном попадании токсикантов в почвы может происходить конкурентная адсорбция на глинистых минералах или органических веществах. Такой конкуренцией объясняют изменение скорости адсорбции одного загрязнителя в присутствии других [320, 353, 362]. Сообщается, что два катионных загрязнителя, такие как хлордифенформ и медь, конкурируют за сайты обмена монтмориллонита [362]. Конкуренция за сайты адсорбции снижает адсорбцию нитрофенола на почвах в присутствии меди [320].

Современными исследованиями доказано, что порядок попадания загрязнителей в водную среду влияет на проявление их токсических свойств. Например, если медь присутствовала в воде до глифосата, то она успевает адсорбироваться и таким образом, меньше влияет на адсорбцию поступающего впоследствии пестицида [362], а также не имеет возможности действовать на биологические мишени. Однако этот механизм соблюдается, если медь остается в низких концентрациях и не приводит к конкуренции за сайты связывания. Если пестицид попал в среду первым – перед ТМ, его влияние на адсорбцию ТМ также не одинаково. Показано, что когда пестицид адсорбируется на глинистых частицах, то он одновременно облегчает проникновение ТМ в структуру минерала, в результате чего биодоступность и, следовательно, токсичность двух загрязнителей снижается [362].

В случае сложных органических загрязнений, например, поступающих в реки от фармакологических фабрик установить механизмы проявления синергизма и антагонизма веществ удастся не всегда. Однако для наблюдения за таким комплексным загрязнением важны сами факты совместного действия веществ. При установлении влияния наркотического вещества напроксена на микробное сообщество реки Тибр исследователи показали, что совместное присутствие в воде напроксена с лекарственным веществом гемфиброзилем увеличивает время деструкции наркотика микроорганизмами [307].

Работа [374] раскрывает некоторые механизмы взаимовлияния загрязняющих веществ в условиях их конкуренции за места адсорбции на магнитном графеновом наноматериале. Взаимодействие тетрациклина и Cd(II) при одновременном добавлении в водную среду было незначительным. Адсорбция As(V) была значительно подавлена в присутствии тетрациклина, в то время как сам As(V) почти не влиял на адсорбцию антибиотика. Кадмий (II) и мышьяк (V) при совместном присутствии увеличивали адсорбцию друг друга на магнитном графене на

65% и 30% соответственно. Этот синергетический эффект вызван электростатическим притяжением и дальнейшим комплексообразованием [374].

Такие научные данные говорят о том, что часто при совместном присутствии токсикантов возникают взаимодействия, характерные для конкретной пары веществ. Не исключены цепные реакции с образованием новых веществ, действие которых может быть не изученным [372, 384]. Это усложняет трактовку результатов биодиагностики, в частности биотестирования, даже при параллельном исследовании пробы физико-химическими методами.

Рассмотренные выше факторы, влияющие на результаты биотестирования, были отнесены к свойствам тестируемой среды и ее компонентов. В равной степени с представленными закономерностями проявляют себя факторы, формируемые стороной, принимающей токсическое воздействие, – организмами, на чувствительности которых к токсикантам основываются биотесты.

1.2.2. Свойства тест-организмов – мишеней действия токсикантов

1.2.2.1. Механизмы различной чувствительности организмов к токсикантам

Биологические виды живых организмов отличаются друг от друга ответными реакциями, наступающими при воздействии веществ, загрязняющих среду обитания, а также степенью проявления этих последствий. Межвидовые различия на действия химических веществ объясняются генетическими особенностями каждого вида. В молекуле ДНК, носителе генетической информации, зашифрованы физиологические, морфологические, биохимические и все другие видовые особенности, которые проявляются в ходе жизни и развития организма, определяя в том

числе и взаимодействия «токсикант-биологическая мишень». Неодинаковая токсичность веществ по отношению к разным видам, а также видоспецифические ответные реакции на токсикант, позволяют создавать химические соединения с избирательным действием – разнообразные классы пестицидов, антибиотиков или, напротив, – биопротекторов.

В биотестировании ориентир на межвидовые различия в чувствительности разных видов и выявление наиболее отзывчивых к воздействию организмов является одним из основных принципов разработки информативных биотестов. Также систематически далекие друг от друга виды принято использовать в экологических исследованиях для выяснения наиболее уязвимой группы организмов при сложившемся загрязнении. Такой принцип в методологии биотестирования получил название «батареи биотестов». Обычно она включает минимум три биотеста с использованием разных организмов, например, низших ракообразных *Daphnia magna*, одноклеточных водорослей *Desmodesmus subspicatus* и высших водных растений *Lemna minor* [288, 309].

Общие закономерности межвидовых различий в чувствительности к токсикантам известны [41, 286, 372]. Наиболее универсальным принципом является снижение чувствительности организмов по мере усложнения их эволюционной организованности. Это логично объясняется с позиций учения о токсикологических барьерах: чем выше организованность биологического вида, тем более совершенные токсикологические барьеры он имеет. Например, одноклеточные организмы чаще всего имеют один подобный барьер – клеточную стенку, отделяющую внутреннее содержимое организма-клетки от внешних воздействий. Млекопитающие имеют барьеры организменного уровня (кожные покровы), тканевого (соединительная и жировая ткань вокруг органов, трехслойное строение сосудов и т.д.) и клеточного [361]. Однако этот базовый принцип имеет исключения. Так, в исследовании детоксикации фосфорорганических и N-метилкарбаматных пестицидов (алдикарб, хлорпирифос-оксон, малаоксон, метамидофос,

оксамил, параоксон и метилпараоксон) показано, что, как правило, печень крысы (*in vitro*) обладает большим детоксикационным потенциалом, чем образцы клеток печени человека [286].

На уровне одного систематического класса или отряда причинами межвидовых различий в восприимчивости к токсикантам чаще всего являются особенности в структурах белков и содержание жира в организме. Эти видовые отличия определяют способность организма связывать токсикант, распределять и аккумулировать его в организме. Взаимодействие токсиканта и белковых биомолекул приводит не только к непосредственным токсическим процессам, но и к изменению скорости биотрансформации воздействующих веществ на организм, поскольку ферменты – это также вещества белковой природы [361]. После резорбции и процессов биотрансформации различия в межвидовой чувствительности к токсикантам добавляет фактор скорости экскреции токсиканта из организма [125].

Условия обитания видов организмов формировались у каждого вида специфично, в соответствии с его трофическими особенностями, биоритмами, месте в экосистеме и множеством других экологически и эволюционно значимых параметров. Среди этих факторов, эволюционно сопровождающих биологический вид, находится совокупность химических факторов, к которым формируются приспособления организмов [397]. В рамках данной работы мы не станем углубляться во все нюансы этой обширной темы, поскольку они лежат в области эволюционной токсикологии.

Среди методов биотестирования, используемых в работе, частому сравнению подвергаются близкие виды тест-организмов *D. magna* и *C. affinis*. В ряде наших исследований было показано, что приоритет по признаку чувствительности этих тест-организмов нельзя отдать в абсолютном отношении ни одному из видов. Более того, разграничивать чувствительность тест-организмов следует даже при загрязнении вод близкими по химическому составу загрязнителями. Например, *D. magna*

оказались более чувствительны к сульфату алюминия, тогда как *C. affinis* – к хлориду алюминия [65, 179].

Главной причиной как межвидовых, так и внутривидовых отличий в реакциях организмов на токсичные вещества, являются генетические особенности. Как в природных условиях биологические виды представлены многими популяциями, так и при содержании лабораторных культур тест-организмов искусственно формируются абсолютно изолированные группы организмов. Степень их изолированности способствует формированию индивидуальных генотипов, не выходящих за пределы видового генома, но отличающих представителей популяций по ряду свойств. Одним из таких свойств может быть разная реакция представителей вида на химические вещества. В рамках одной популяции чувствительность к токсикантам также колеблется в силу определенного количества мутаций, происходящих у организмов в течение жизни [41, 286].

Генетический полиморфизм, то есть существование в одной популяции двух и более резко различающихся аллелей одного и того же гена, – это механизм, и первопричина многих межиндивидуальных различий организмов одного вида [361].

Частный случай генетически обусловленной индивидуальной чувствительности к веществам – это различия, связанные с полом. Они могут формироваться за счет разного гормонального фона, разного соотношения жировых и водных фракций у самцов и самок, специфических ферментативных отличий, свойственных биологическому виду [125].

При проведении биотестирования большой разброс индивидуальной чувствительности к токсикантам является мешающим фактором в получении точных и воспроизводимых результатов. Поэтому на роль тест-организмов разработчики биотестов часто выбирают организмы относительно низкого эволюционного уровня: представителей микроорганизмов, низших растений, различных членистоногих.

Таким образом, уникальность свойств биологических видов позволяет не только использовать их в разных сферах науки и хозяйства, но и обуславливает выбор организмов наиболее эффективных для биотестирования.

1.2.2.2. *Daphnia magna* Straus – базовый тест-организм

Ветвистоусые рачки – небольшие по размерам (длина тела у большинства до 1 мм) и очень разнообразны по внешнему виду. *D. magna* один из наиболее крупных видов: взрослые особи достигают 6 мм. Морфология и биология рачков изучалась Е. Ф. Мануйловой и Н. Н. Смирновым [133, 225], а также подробно описана в определителях беспозвоночных животных [187, 188]. В кратком виде морфологические особенности *D. magna* изложены также в методике биотестирования [23].

По характеру питания *D. magna* относятся к фильтраторам, в природе дафнии питаются взвешенными в воде бактериями, одноклеточными водорослями, детритом, растворенными органическими веществами [133].

Известно, что в качестве тест-организмов обычно выбирают такие виды, которые, обладая чувствительностью к загрязнению, играют значительную роль в экосистеме, являясь важным звеном в трофической сети и формируя качество среды обитания [43, 138, 230]. Руководствуясь этим принципом, в представленной работе *D. magna* используется в качестве базового тест-организма.

Под базовым тест-организмом для биотестирования предлагаем понимать биологический вид, характерный для территории исследования, чувствительный к специфическим и общепромышленным токсикантам и обладающий преимуществами его использования при реализации методов токсикологического анализа.

Тест-культура *D. magna* удовлетворяет этим критериям. Вид широко распространен, используется около 100 лет для биотестирования природных

и антропогенно загрязненных вод различного состава [371], обладает следующими достоинствами:

- удобство и относительная простота культивирования, которое состоит в содержании культуры в чистой природной воде, ежедневном отсаживании молоди от взрослых самок, кормлении;

- использование генетически однородной молоди в биотестировании, что обеспечивается партеногенетическим размножением и поддержанием синхронизированной культуры, которой считается группа особей, находящихся на одной стадии развития;

- быстрое созревание рачков: при оптимальной температуре ($+20 \pm 2$ °C) и хорошем питании – 5-8 суток, длительность эмбрионального развития 3-4 дня;

- регулярное и многочисленное появление молоди каждые 3–4 дня. Количество молоди у молодых самок – 10–15, у зрелых до 40 особей;

- достаточно высокий уровень организации, позволяющий экстраполировать токсикологические результаты на других многоклеточных представителей экосистем и даже человека. При этом особенно важно наличие кровеносной и нервной систем;

- крупные размеры, за счет чего возможно вести визуальные наблюдения за многими ответными реакциями, что в свою очередь приводит к отсутствию необходимости в специализированных средствах измерений;

- чувствительность дафний к большинству загрязняющих веществ (при условии использования предлетальных тест-функций);

- сравнительная простота выполнения эксперимента: большинство методик выполнения анализов с использованием *D. magna* доступны освоению сотрудниками квалификации лаборант и младший научный сотрудник.

Ученые отмечают достоинства и преимущества *D. magna* для целей биодиагностики [338]. М. В. Мичукова в своей работе пишет: «*Daphnia magna* Straus, 1826 (класс ракообразные) – организмы, у которых широко

используются по отдельности следующие свойства: индикаторная – в биотестировании, кормовая ценность – в рыбоводстве, фильтрационный способ питания – в процессах очистки вод» [138]. В. К. Лузгин называет *D. magna* общепризнанным тест-организмом в водной токсикологии, как в нашей стране, так и за рубежом [131]. Известные научные школы в области биотестирования опирались в своих исследованиях и разработках на лабораторную культуру *D. magna*, позволяющую получать надежные и воспроизводимые результаты [209, 246, 385]. Список достоинств культуры *D. magna* дополняет разнообразие тест-функций составляющих ее организмов и банк исследований о чувствительности этих организмов к разнообразным токсикантам.

Разнообразие тест-функций *D. magna*. У *D. magna* апробированы и используются тест-функции разных уровней: поведенческие, морфологические, физиологические, биохимические, генетические.

Одной из самых распространенных тест-функций в биотестировании является гибель организма. Несмотря на то, что тест-функция гибели является самой «грубой», крайней степенью проявления токсического эффекта, использование показателя оправдано в экологическом нормировании и природоохранной практике. Например, для сточных вод и водных экстрактов отходов важнейшей характеристикой является безвредная кратность разбавления (БКР), то есть степень необходимого разбавления до отсутствия острой летальной токсичности. В зависимости от БКР водного экстракта отхода, его относят к одному из классов опасности [11]. БКР традиционно определяется с помощью *D. magna*, хотя это позволяют осуществлять и другие методики биотестирования.

Плодовитость – это вторая тест-функция наиболее часто оцениваемая у дафний. Данная тест-реакция обладает высокой диагностической ценностью, поскольку позволяет устанавливать наличие хронического токсического действия при биотестировании водных сред [157]. При проведении экспериментов необходимо учитывать, что фертильность

D. magna зависит от начальной плотности посадки особей в водную среду, поэтому в литературе можно встретить сообщения о довольно разной плодовитости дафний: от 30,3 до 74,6 особей [74], от 17 до 67 экземпляров молоди на одну самку [137].

Одновременно с количественным учетом погибших особей и плодовитости живых, во многих авторских методиках предусмотрена качественная оценка состояния морфологических и физиологических изменений рачков. «Качественно-количественный биотест на *D. magna* в течение 10 суток» Л. А. Лесникова и Т. К. Мосиенко [209] является системой подробного учета токсических эффектов для надзора за загрязненностью водных объектов: разработаны шкалы и определительные таблицы тест-функций с возможными причинами их появления. Например, помутнение плазмы клеток, начиная с жаберных отростков абдоминальных ножек, обычно происходит под влиянием соединений тяжелых металлов (ТМ), кислот и щелочей. Деформация раковины говорит о нарушении водного обмена, поскольку тургор у дафний поддерживается за счет активного водообмена, когда за минуту замещается до 80% воды организма. Описываются возможные окраски дафний, нарушения в процессе формирования яиц и молоди и т. д. В итоге методика позволяет установить острое летальное, хроническое летальное и сублетальное действия, а также предположить уровень сапробности водоема и причину наблюдаемых эффектов. Несмотря на относительную сложность учета «симптомов действия анализируемой пробы» и выражение их в виде специфических формул состояния особей, данная работа, представляющая итог многолетних исследований Л. А. Лесникова, становится отправной точкой для дальнейшего выявления наиболее информативных тест-функций *D. magna* с возможностью их количественного учета.

Учеником Л. А. Лесникова – В. К. Лузгиным – продолжена работа по разработке методик биотестирования на основе морфо-физиологических и биохимических реакций *D. magna* на загрязняющие вещества, в частности

ТМ. Разработана методика определения активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) дафний, и на ее основе определено изменение активности СДГ дафний в норме и при патологии. Установлено, что активность СДГ дафний зависит от возраста и пола организмов, а также от их физиологического состояния. К спектру качественных тест-функций добавлены специфические нарушения печеночных выростов и жаберных отростков дафний [131].

Количественному учету подлежат такие морфологические параметры *D. magna* как линейные размеры тела, биомасса модельных популяций, а также патологические отклонения – количество abortивных яиц, мертворожденной и уродливой молодежи. Показано, что в растворах с концентрацией ионов хрома 0,1 мг/л у рачков наблюдаются достоверные уменьшение размеров на 5 %; тест-функция «биомасса популяций дафний» оказалась чувствительной к действию хрома в растворах с концентрациями 0,035 и 0,17 мг/л, но эффект начинал проявляться только с 17-х суток [252].

Долговременные эксперименты на установление хронического токсического действия позволяют исследовать динамику гибели взрослых особей, продолжительность жизни, в том числе в сериях поколений, количество abortивных яиц. При исследовании токсических эффектов соединений стронция нами показано, что витальные концентрации (2,5 и 5 ПДК по действующему иону), позволяющие долгое время жить модельной популяции, приводят к массовому появлению abortивных яиц – от 14 штук в первом поколении до 97 штук в третьем поколении (показатель приведен для группы из 10 особей за полный жизненный цикл). Динамика гибели взрослых особей также носит негативный характер. На 50 день эксперимента естественная гибель в контрольном варианте незначительна (2,5–5%), тогда как при воздействии стронция погибает в среднем половина особей: от 32 до 82% с тенденцией увеличения гибели в последующих поколениях [152].

Патологические изменения развития партеногенетических яиц сами могут являться диагностическими признаками негативного влияния различных факторов на дафний [341].

Среди функциональных показателей ряд исследователей в качестве тест-функции предлагает оценивать трофическую, иначе фильтрационную, активность, то есть величину поглощенного дафниями корма за определенный промежуток времени. Для регистрации трофической активности рачков представители красноярской научной школы используют изменение интенсивности нулевого уровня быстрой флуоресценции водоросли хлорелла, используемой в качестве корма [264]. Также возможна оценка разницы между оптической плотностью тестируемой среды непосредственно после кормления и перед следующим кормлением. В наших экспериментах для этого использовался специализированный прибор ИПС-03, измеритель плотности суспензии, разработчик Григорьев Ю. С. [174]. В работе Д. Н. Маторина и П. С. Венедиктова [135] описано использование «Флюорат-02-Панорамма». Трофическая тест-функция дафний позволяет определить сублетальные концентрации загрязняющих веществ.

Обладают экспрессностью, – высокой скоростью получения ответной реакции тест-организма, методики, основанные на оценке физиологических параметров дафний – изменения частоты сердечных сокращений (ЧСС) и интенсивности дыхания [115, 261]. По данным А. Д. Усанова [242] функция ЧСС у дафний является чувствительной даже к физическим воздействиям, что показано в опытах с переменным магнитным и электрическим полями. К. В. Кулагиной [122] на примере пестицидов показана классическая картина развития токсикологического стресса: первоначальная стимуляция частоты сердечных сокращений (ЧСС) даже при летальных концентрациях, а затем резкое снижение значений показателя.

При биотестировании с первых минут эксперимента появляется возможность оценивать двигательную активность дафний и характер их поведения. Коллективом немецких исследователей разработан метод определения двигательной активности рачков в части их скорости передвижения, расстояния между дафниями, с подсчетом их количества и определением индекса токсичности. Для этого используется специально

разработанный программный продукт [369]. Оценка траектории движения лежит в основе оценки токсичности в подходе других авторов [331]. В представленной работе предложен визуальный метод учета двигательной активности *D. magna* для определения токсичности водных сред. Он прост в реализации, не требует специального оборудования и поэтому доступный широкому кругу исследователей (раздел 3.2.1).

Чувствительность *D. magna* к токсикантам. Рачки *D. magna* по характеру питания являются фильтраторами, что делает их чувствительными ко многим загрязняющим веществам, находящимся в водной среде в первую очередь в истинно растворенной форме, при более длительном воздействии – в форме коллоидов (размер частиц 1 до 100 нм) и нестойких органо-минеральных комплексов [126, 215]. Есть сведения, что на металлоорганические соединения дафнии реагируют обычно сильнее, чем на катионы соответствующих металлов. Тест-реакция дафний на металлоорганические соединения заслуживает внимания в связи с тем, что осуществление контроля соединений этого класса в объектах среды, в том числе и химическими методами, представляет в ряде случаев сложную задачу [114].

Известно, что молодые особи *D. magna* чувствительнее к токсичным веществам, чем взрослые, в связи с чем рекомендуется в качестве биотестов использовать молодь в возрасте не более 15–26 часов [126, 213]. В современной аттестованной методике биотестирования предписано использование рачков возраста 6–24 ч. [23]. Такой подход оправдан с точки зрения токсикологии: у молодых особей защитные токсикологические барьеры не сформированы в полной мере [125, 251], что работает на один из основных принципов биотестирования – максимальная чувствительность тест-организма.

Большинство исследований по чувствительности *D. magna* к токсикантам направлено на минеральные соединения, в частности ТМ. По

всей видимости, это объясняется повсеместным распространением данного вида загрязнения, а также удобством постановки модельных экспериментов.

Еще в 40-е годы была исследована чувствительность рачков к неорганическим ионам, где констатировалась наибольшая чувствительность *D. magna* к ионам серебра, ртути, кадмия, хромата, бихромата, цианида и йодида. В дальнейшем этому вопросу было посвящено много работ [238, 239, 269].

Большинство ТМ необходимы для жизнедеятельности гидробиотнов как микроэлементы, участвующие в обмене веществ. Но, безусловно, повышение концентрации приводит к различным токсическим эффектам. Для ацетата меди согласно работе [267] концентрация $0,03 \text{ мг/дм}^3$ по иону меди (II) вызывает гибель рачков, снижает их репродуктивную и фильтрационную активность, тогда как ПДК меди составляет $0,1 \text{ мг/дм}^3$. В этих же исследованиях выявлено, что цинк и никель не оказывают подобных эффектов в концентрациях, не превышающих установленные нормативы.

По другим данным летальные концентрации меди для этой группы организмов начинаются с $0,01\text{--}0,02 \text{ мг/дм}^3$, цинка – с $0,480\text{--}680 \text{ мг/дм}^3$, кадмия – с $0,038\text{--}0,055 \text{ мкг/дм}^3$ [140, 143].

В хронических опытах с *D. magna* хлористый кобальт в концентрации до $0,1 \text{ мг/л}$ в пересчете на действующий ион, влияет на выживаемость и линейный рост дафний, до $0,3 \text{ мг/дм}^3$ – на эмбриогенез и его синхронность с оогенезом, до $0,16 \text{ мг/дм}^3$ – на наполнение кишечника и накопление жира, до $0,01 \text{ мг/дм}^3$ – на количество выметанной молоди. При хроническом действии на дафний в пересчете на ион меди (II) в концентрации до $0,05 \text{ мг/дм}^3$ он влияет на выживаемость и линейный рост дафний, до $0,01 \text{ мг/дм}^3$ на общее количество молоди и среднюю плодовитость [127].

Лузгиным В. К. [131] установлены ответные реакции *D. magna* на уровне популяций: на фазе логарифмического роста популяция значительно более устойчива к действию токсикантов, чем на фазе биомассы насыщения.

Результаты исследований разных авторов могут не совпадать при тестировании одних и тех же веществ. Это явление вполне объяснимо тем, что в каждой лаборатории культура содержится в воде, обладающей региональными особенностями, часто условия проведения эксперимента в полной мере не совпадают, например, по длительности опыта и количеству организмов в тестируемой среде, кроме того, при оценке влияния потенциально токсичного элемента исследователи могут применять разные модельные вещества.

Влияние физических и физико-химических факторов на проявление токсичности загрязняющих веществ является важным направлением развития методологии биотестирования. Известно, что токсическое действие соединений ТМ и многих других веществ зависит от содержания органических веществ в воде, рН, жесткости, других физических факторов [147, 251]. Этот вопрос более подробно рассмотрен выше, в разделе 1.2.1.

Есть мнение о сравнительно невысокой чувствительности *D. magna* к неорганическим токсикантам по причине детоксикации катионов в воде за счет комплексообразования [35]. В тоже время при сопоставлении результатов исследований чувствительность дафний и инфузорий к катионам тяжелых металлов практически совпадает [238].

Биотесты на ветвистоусых рачках *D. magna* ценны также и для определения токсичности сред, загрязненных органическими веществами. Наличие нервной системы у дафний делает их высоко чувствительными к фосфорорганическим и хлорорганическим соединениям, ингибирующих ацетилхолинэстеразу [216].

Чувствительность дафний к органическим веществам существенно зависит от их природы. Фенол при содержании 1–2 мг/дм³ стимулирует размножение рачков [40]. Летальное действие поверхностно-активных веществ на дафний проявляется при концентрациях 0,8–30 мг/дм³ [60, 119].

В последнее время с помощью *D. magna* исследуют эффекты различного рода физических воздействий, излучений. Обнаружены

негативные биологические эффекты после кратковременного (доза 12 мДж/см²) воздействия УФ-излучения с длиной волны 365 нм на развивающиеся эмбрионы *D. magna* [84]. Эффект объясняется тем, что кванты УФ-излучения обладают большей энергией по сравнению с квантами света красного и инфракрасного диапазонов и способны, в отличие от последних, вызвать определенные нарушения связей в биологических макромолекулах, приводя, например, к разрушению ДНК [319].

На токсичность воды, в частности на показатели плодовитости *D. magna*, может оказывать влияние внешнее гамма-излучение. Согласно литературным данным, токсический эффект проявляется при мощности экспозиционной дозы 31 мГр/час [333]. В работе [322] показано, что токсическое воздействие на дафний урана как тяжелого металла преобладает над его радиотоксичностью как альфа-излучающего радионуклида. В материалах исследований показано, что относительно невысокое радиоактивное загрязнение в пределах 1100 мБк/дм³ по ²³⁸U (при уровне вмешательства 3000 мБк/дм³), также как и выявленные дозы внешнего гамма-излучения (максимум – 0,6 мкЗв/час), не оказывает влияния на токсичность проб воды, на первый план выходит химическое загрязнение [167].

В работе И. В. Конюхова [117] описаны эффекты светового и электромагнитного полей прибора, генерирующего красное светодиодное излучение: плодовитость дафний снижалась при облучении рачков в течение 300 секунд светодиодным излучением с длиной волны 650 нм и интенсивностью 0,04 мВт/см².

Таким образом, обоснованы преимущества использования *D. magna* в качестве базового тест-организма. При анализе литературных данных показано разнообразие тест-функций *D. magna*, включающих физиологические, морфологические и поведенческие ответные реакции. Чувствительность *D. magna* зависит от многих факторов. Главный из них – это оцениваемая тест-функция и состояние здоровья подопытных организмов.

1.2.2.3. *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg

Ветвистоусые рачки вида *C. affinis* обитают в пресноводных водоемах Европы, Северной Америки, Азии, Северной Африки, в основном в мелководных озерах с замедленным течением. Они относятся к олиго- и бетамезосапробам, то есть гидробионтам, предпочитающим воды с невысоким содержанием органических веществ. Такая экологическая особенность объясняет их высокую чувствительность к загрязнению вод органическими веществами.

Основные сведения о морфологии и физиологии рачков *C. affinis* описаны в определителях водных беспозвоночных [187, 188]. Цериодафнии имеют сравнительно мелкие размеры (половозрелые самки – 1,5 мм, самцы – 0,8 мм), что позволяет в токсикологических экспериментах оперировать относительно небольшими объемами воды и более компактными емкостями для культивирования.

В лабораторной культуре при содержании в оптимальных условиях (без перепада температурных условий, с регулированием плотности культуры) *C. affinis* размножаются партеногенетическим путем. Эта особенность, как и в случае с *D. magna*, позволяет получать синхронизированные линии с высокой степенью генетической однородности, и, следовательно, – достигать высокой повторяемости результатов параллельных исследований.

Биологический цикл развития от рождения до появления первого потомства у цериодафний составляет 3-4 дня. За срок 7-8 суток у рачков получают 3 помета, что позволяет за относительно короткий период времени установить наличие или отсутствие хронической токсичности по показателю изменения плодовитости.

Численность молоди у рачков в первом помете невелика – по 2-6 особей, а начиная со второго помета – от 6 до 20 особей на самку. В лабораторной культуре у *C. affinis* сохраняются естественные сезонные

биоритмы, максимум размножения приходится на август-сентябрь. В осенне-зимний период можно наблюдать снижение удельной плодовитости, что нужно учитывать при планировании опытов.

По отношению к уровню растворенного кислорода *C. affinis* довольно чувствительны, их нормальное развитие протекает при концентрации растворенного кислорода в воде не ниже 5 мг O₂/л. Вследствие этого цериодафнии чувствительны к органическому загрязнению веществами, снижающими концентрацию растворенного кислорода в среде.

Ветвистоусые рачки *C. affinis* морфологически сходны с *D. magna*. Тело их также заключено в прозрачную камеру (карапакс), благодаря чему есть возможность на живых экземплярах наблюдать процесс созревания яиц в гонадах, прохождение пищи по пищеварительному тракту, дыхательные движения, ритм сердцебиения. Эти показатели являются весьма важными при постановке токсикологических опытов для оценки степени токсичности и механизма действия веществ.

В природоохранной практике *C. affinis* является востребованным и распространенным тест-организмом. Многие исследователи отмечают высокие корреляционные связи между концентрациями загрязняющих веществ и такими тест-функциями рачков как гибель и плодовитость. Например, в работе В. В. Александровой отмечен достоверный показатель множественной корреляции между снижением плодовитости *C. affinis* и возрастанием концентрации солей марганца и цинка [38]. Цериодафнии используют для оценки безопасности веществ с содержанием наночастиц. Показана их чувствительность к наночастицам диоксида титана [79]. В ряде случаев *C. affinis* оказываются чувствительнее *D. magna* к загрязняющим веществам. В наших работах такой факт установлен для солей алюминия и минеральных форм азота [106, 179].

Непродолжительный жизненный цикл *C. affinis* позволяет оценивать токсические эффекты загрязняющих веществ в ряду поколений. Такие исследования особенно важны для выяснения последствий современных

фармакологических препаратов, моющих средств, пестицидов. Так в работах [270, 398] угнетающее действие гербицидов на репродуктивную функцию рачков *C. affinis* показано на нескольких поколениях. В пятом поколении воспроизводство потомства под воздействием действующего вещества хизалофоп-Р-этила (50 мг/дм³) прекратилось. В Институте биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН с помощью *C. affinis* изучают токсические эффекты фенола, карбофоса, додецил-сульфата натрия [260].

Несмотря на гораздо меньшие размеры *C. affinis* по сравнению с *D. magna*, у цериодафний доступны для учета некоторые сублетальные тест-функции, например, пищевая активность, линейные размеры, способность к биоаккумуляции [130].

Таким образом, *C. affinis* – тест-организм, близкий по эколого-биологическим особенностям низшим ракообразным *D. magna*. Основным преимуществом цериодафний в качестве тест-культуры является высокая чувствительность к загрязнению органической природы и некоторым другим веществам. Меньшее распространение в научно-исследовательских и аккредитованных лабораториях биотестирования *C. affinis* по сравнению с *D. magna* получили в силу наличия ряда сложностей в культивировании и выполнении операций биотестов:

- *C. affinis* более чувствительны к колебанию качества культивационной воды;
- мелкие размеры усложняют манипуляции с молодью рачков;
- ряд тест-функций недоступен для прямого визуального учета (время появления выводковых камер, наличие абортивных яиц, пигментация и т.д.).

1.2.2.4. *Paramecium caudatum* Ehrenberg

В числе организмов, на которых проводят биотестирование, присутствуют представители подцарства простейших. Они являются неизменным компонентом как почвенных, так и водных биоценозов [63], поэтому подходят для токсикологических исследований этих сред. История применения Protozoa в качестве тест-организмов насчитывает не одно десятилетие [69].

Среди всего разнообразия простейших инфузории оказались наиболее подходящими тест-организмами для биотестирования. Активно используются тетрахимены, род *Tetrahymena* [359], спиростомы, род *Spirostomum* [45], стилонихии, род *Stylonychia* [70]. По сравнению с другими группами простейших инфузории имеют наиболее сложное строение и отличаются разнообразием функций. С их помощью оценивают безопасность сельскохозяйственных кормов, уровни бактериального заражения среды, токсикологические свойства антропогенно загрязненных водных сред.

В биотестировании компонентов окружающей среды получила распространение инфузория-туфелька *Paramecium caudatum*. Этот вид простейших широко распространен в пресных водоемах, является организмом космополитом. Форма клетки эллипсоидная с размерами 200×40 мкм. Основную пищу инфузории составляют бактерии, дрожжи, мелкие органические остатки. Размножение инфузорий происходит путем поперечного деления клетки. В зависимости от условий выращивания время генерации может составлять от нескольких часов до нескольких суток.

Инфузория находится в непрерывном движении. Скорость ее при комнатной температуре составляет 2,0-2,5 мм/с. Траектория движения сложная: она движется вперед, вращаясь вдоль продольной оси тела с помощью ресничек, количество которых достигает 10-15 тысяч. Колебания внешних условий (температуры, химического состава среды и других факторов) воспринимаются клеткой, вызывая изменение таксиса –

двигательной реакции. Это первая проявляющаяся ответная реакция *P. caudatum* используется в аттестованных методиках биотестирования различных сред по оценке изменения хемотаксиса инфузорий [24]. Также представляют интерес более подробные характеристики движений: изменение характера движений, уменьшение или увеличение скорости, частоты остановок и разворотов.

Вид *P. caudatum* выбирается для биотестирования водных сред по следующим критериям:

– они представляют собой одновременно и клетку, и полноценный организм. Следовательно, реакции простейших на воздействие внешней среды можно рассматривать как более простую модель, по сравнению с многоклеточными организмами [193];

– *P. caudatum* – эукариотические организмы, как большинство организмов на планете, поэтому их реакции могут быть сопоставимы с цитологическими ответами более сложно организованных животных;

– культивирование *P. caudatum* возможно на минеральной среде Лозина-Лозинского, в которой используются доступные реактивы; культивирование происходит в нестерильных условиях с пересевом клеток каждые 3-4 дня, что также облегчает содержание культуры в лабораторных условиях [24];

– короткий жизненный цикл *P. caudatum* и высокая скорость размножения позволяют проследить их реакцию на токсиканты в ряду поколений [78].

– в трудах российских и зарубежных ученых накоплен большой статистический материал, свидетельствующий о высокой чувствительности инфузорий-туфельек ко многим распространенным загрязняющим веществам.

Инфузории высоко чувствительны к соединениям тяжелых металлов. В исследованиях О. В. Карпухиной и соавторов *P. caudatum* продемонстрировали высокую чувствительность к солям кадмия, свинца, меди и цинка. В присутствии этих веществ нарушается поведение

инфузорий, изменяется вектор двигательной активности организма, уменьшается или увеличивается скорость передвижения, происходит угнетение репродуктивных функций. Выраженная индукция окислительного стресса была обнаружена в клетках при воздействии сульфата меди, хлорида кадмия и ацетата свинца (концентрации 10-15 мкМ) [193]. Изучается также усиление чувствительности *P. caudatum* к окислительному стрессу различными веществами, что перспективно для индикации низких доз загрязнения [89].

Многие природные воды содержат повышенные концентрации солей железа. С помощью ответных реакций *P. caudatum* дифференцированы уровни загрязнения воды солями железа. Показано, что концентрация растворимых форм железа 0,025% приводит за 7 дней к гибели популяции, 0,005% приводит к стимуляции развития устойчивых особей, оставшихся в живых [149].

P. caudatum позволяют выявлять загрязнение почвы нефтепродуктами. Например, водные экстракты нефтезагрязненных почв, содержащие 300-10000 мг/кг нефтепродуктов, замедляют процессы размножения, а также вызывают гибель части наименее устойчивых особей популяции простейших [78].

Метод импульсной фотометрии, направленный на оценку двигательной активности инфузорий адаптировали к исследованию интегральной токсичности атмосферного воздуха [203]. Метод по выживаемости инфузорий применяют для исследования безопасности некоторых кормов [263]. За рубежом разрабатываются биотесты с оценкой генетического аппарата инфузорий [414]. В наших исследованиях биотест по оценке изменения хемотаксиса инфузорий хорошо зарекомендовал себя при определении токсичности природных вод, загрязненных разнообразными химическими веществами [82, 124, 167].

У инфузорий наряду с выживаемостью, самой распространенной тест-реакцией для биотестирования, является положительный или отрицательный

хемотаксис – движение особей соответственно в сторону или против химического фактора. Кроме того, о токсичности среды можно судить по физиологическим функциям: работе сократительных вакуолей и образовании пищеварительных [78, 193].

Имеются попытки работы с инфузориями в хронических экспериментах. Однако, авторы отмечают, что культура *P. caudatum* способна адаптироваться, поэтому за угнетением колонии часто идет всплеск численности; эффект показан на загрязненных нефтью почвах (300-10000 мг/кг) [78].

Таким образом, инфузории *P. caudatum* являются ценными тест-организмами, методики с их использованием нацелены на учет предлетальных эффектов и экспресс-диагностику состояния тестируемых сред.

1.2.2.5. *Escherichia coli*

Кишечная палочка *E. coli* – вид грамотрицательных палочковидных бактерий, относится к группе факультативно анаэробных бактерий. Представители вида широко распространены в нижней части кишечника теплокровных животных, а также они могут выживать в окружающей среде. Клетки палочковидные, со слегка закруглёнными концами, размером 0,4-0,8×1-3 мкм, объём клетки составляет около 0,6-0,7 мкм³. В анаэробных условиях *E. coli* образует в качестве продукта жизнедеятельности лактат, сукцинат, этанол, ацетат и углекислый газ. Часто при этом образуется молекулярный водород, который мешает образованию указанных выше метаболитов, поэтому *E. coli* часто сосуществует с микроорганизмами, потребляющими водород, например, с метаногенами или бактериями, восстанавливающими сульфат. Оптимальный рост достигается культурами *E. coli* при температуре 37°C, некоторые штаммы могут делиться при температурах до 49 °C. Рост может стимулироваться аэробным или

анаэробным дыханием, различными парами окислителей и восстановителей, в том числе, окислением пирувата, формиата, водорода, аминокислот, а также восстановлением кислорода, нитрата, диметилсульфоксида и триметиламин N-оксида [186].

Эти бактерии легко могут быть выращены в лабораторных условиях, поэтому кишечная палочка играет важную роль в биотехнологических, генетических, микробиологических исследованиях. Например, научные данные об основных генетических процессах – репликации, транскрипции, трансляции, репарации, рекомбинации, сегрегации, – получены благодаря *E. coli* [405]. На сегодняшний день условно непатогенные штаммы кишечной палочки используются и в технологиях биотестирования водных среды.

Многие бактериальные методы определения качества природных объектов основаны на прямом подсчете клеток, что не всегда выполнимо и требует много времени. В лаборатории биологически активных веществ кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова разработана отечественная бактериальная люминесцентная тест-система «Эколюм» с использованием непатогенного штамма *E. coli* [75, 83].

Бактериальные биолюминесцентные тест-системы называют основой одних из самых многообещающих биологических методов контроля качества окружающей среды, так как они отличаются экспрессностью, точностью и чувствительностью [220]. Зарубина А. П. и Сорокина Е. В. в своей работе [91] также отмечают, что это «один из самых экспрессных и доступных методов биотестирования».

Одно из весомых преимуществ бактериальных люминесцентных биотестов – не обязательно выращивать культуру бактерий: можно применять ферментативные выделенные препараты [75, 83]. Кроме того, для этих целей используют иммобилизацию светящихся бактерий на неорганических носителях (карбонат кальция, целлюлоза), что позволяет сохранять начальный уровень биолюминесценции в три раза дольше, чем в бактериальном препарате [297, 293].

Многими авторами отмечается высокая чувствительность люминесцентных бактериальных систем на основе *E. coli* к тяжелым металлам, фенолам, нефтепродуктам, углеродным и новейшим наноматериалам [91, 381, 413]. Исходя из собственного опыта, следует отметить, что бактериальные тесты стабильно «работают» на модельных растворах с моно загрязнением. При натуральных исследованиях уровень улавливаемого загрязнения повышается. Замечено угнетение свечения препарата на основе *E. coli* (тест-система «Эколюм») водами питьевого качества, а также значительная стимуляция биолюминесценции при наличии в пробе органических веществ. Подобные особенности применения биолюминесцентных тестов отмечают и другие авторы [297].

Мировые ученые также позиционируют люминесцентные бактериальные тесты как удобные, экспрессные и экономически выгодные для первичной оценки токсичности различных химических веществ и их смесей, а также физических воздействий [303, 304, 305, 407]. Учеными МГУ и зарубежными исследователями показано, что среднеэффективные дозы, вызывающие тушение биолюминесценции бактерий, коррелируют со среднелетальными концентрациями для эукариотических организмов [75, 304]. Коэффициент корреляции для многих веществ составляет от 0,8 до 0,95 [348].

Бактериальный тест «Эколюм» позволяет также во время анализа выяснять такие показатели пробы как стабильность, токсичность продуктов деградации и способность к биоаккумуляции [83].

Наиболее востребован биотест с использованием *E. coli* в мониторинге токсичности водных образцов [167, 305]. К водным образцам в этом случае относятся пробы поверхностных природных вод, промышленных сточных вод, водные вытяжки из почв, донных отложений, воздушных фильтров [296, 303].

E. coli – ценный тест-организм для исследования эффектов антибиотиков и механизмов их токсического действия. Например, авторами

показано, что воздействие сублетальных концентраций фторхинолонов и цефалоспоринов на клетки *E. coli* вызывало возрастание содержания в них полиаминов [236].

Таким образом, бактерия *E. coli* – универсальный модельный прокариотический организм, нашедший свое применение в микробиологии, генетике и токсикологии, включая экологическую токсикологию. Ценность *E. coli* как тест-организма заключается в адекватных реакциях культуры на многие загрязняющие вещества, экспрессности ответных реакций, а также возможности оценивать эффекты специфических соединений, в частности – антибиотиков.

1.2.3. Условия проведения биотестирования

Условия проведения биотестирования и их соблюдение является важным фактором получения достоверных и воспроизводимых результатов биотестирования. Они представлены требованиями к стандартизации тест-культур, в том числе к условиям культивирования тест-организмов, и регламентацией параметров проведения экспериментов. Условия проведения биотестирования регламентируются методиками проведения токсикологических анализов и требованиями к организации лабораторий биотестирования [6, 10].

Методика измерений – совокупность конкретно описанных операций, выполнение которых обеспечивает получение результатов измерений с установленными показателями точности [7]. Наиболее общие научные требования к методам биотестирования, обеспечивающие их пригодность для решения комплекса современных экологических задач сформулированы в работе В. А. Тереховой [234]:

– применимость для оценки любых экологических изменений среды обитания живых организмов;

- способность характеризовать наиболее общие и важные параметры жизнедеятельности биоты;
- достаточная чувствительность для выявления даже начальных обратимых экологических изменений;
- адекватность для любого вида живых существ и любого типа воздействия;
- удобство не только для лабораторного моделирования, но также и для исследований в природе;
- проста для широкого использования.

К современным методам биотестирования предъявляются жесткие требования для обеспечения высокого качества токсикологических анализов. В центре этих требований находится процедура стандартизации тест-культур и строго регламентированная процедура анализа.

1.2.3.1. Стандартизация тест-культур и понятие здоровья тест-организмов

Согласно Федеральному закону «О техническом регулировании» «стандартизация – это деятельность по разработке, опубликованию и применению стандартов, по установлению норм, правил и характеристик в целях обеспечения безопасности продукции, работ и услуг для окружающей среды, жизни, здоровья и имущества, технической и информационной совместимости...» [9]. Стандартизация направлена на достижение упорядоченности в определенной сфере через установление правил, положений, алгоритмов для всеобщего применения [9]. Такой подход позволяет унифицировать многие процедуры во всех сферах хозяйственной и научной деятельности, что является гарантией качества продукции, работ или услуг.

Исследования, опирающиеся на методы биотестирования, призваны выяснять принципиальные вопросы о качестве продукции, опасности или

безопасности природных и техногенных сред и объектов, о степени токсичности тестируемых сред, веществ и материалов. По этой причине биотесты, – методы биотестирования, и тест-организмы, – датчики информации о токсичности, должны подвергаться строгой стандартизации, что с разных сторон обсуждается в научных работах [294, 350, 401].

В области биотестирования стандартизацию можно условно разделить на два направления: стандартизация культур тест-организмов и стандартизация условий испытаний, включая параметры содержания лабораторных культур.

Стандартизация тест-культур связана с трудностями, исходящими из сути работ с живыми организмами, которые своей генетической изменчивостью, наличием биоритмов и других факторов, рассмотренных выше, неминуемо создают вариативность своих ответных реакций на токсичные вещества. Например, при сравнении культур одинакового биологического вида у двух лабораторий, можно обнаружить, по меньшей мере, морфологические отличия особей данных искусственных популяций [165].

Проблему обеспечения лабораторий биотестирования стандартизированными тест-культурами ученые Московского государственного университета предлагают решать через формирование единого национального банка тест-культур, который гарантировал бы соответствие тест-культуры заданным критериям [294]. Однако, стандартизированная культура быстро теряет свои качества и пригодность к биоанализам в силу различий в химическом составе культивационных вод, использовании даже незначительных вариаций в примях культивирования организмов и вследствие действия на них других абиотических и биотических факторов.

В современной методологии биотестирования используются следующие приемы стандартизации тест-культур:

1. Строгое определение видовой принадлежности используемого организма. Это условие имеет большое значение, поскольку разные виды одной систематической группы часто проявляют яркую видовую чувствительность к токсикантам. Например, *C. affinis* – обитатели олиготрофных водоемов, поэтому они чувствительны к органическому загрязнению, а *D. magna* таким откликом не отличаются.

2. Поддержание чувствительности культуры организмов в заданных методикой интервалах. Определение чувствительности тест-организмов по подобию с химическими методами называют также калибровкой. Процедура установления чувствительности тест-организмов представляет собой классический токсикологический эксперимент по тестированию серии растворов, содержащих возрастающие концентрации модельного токсиканта. Среднеэффективная концентрация токсиканта (EC50) у пригодной к биотестированию культуры должна соответствовать установленному разработчиками метода диапазону.

Стандартизированные методики биотестирования обязательно включают испытания тест-организмов с использованием эталонных токсикантов, чтобы гарантировать надежность метода [26–34; 294]. В то же время, как отмечает Н. С. Жмур, это не дает гарантии абсолютно объективного ответа о токсичности пробы, но исключает многие систематические ошибки метода [22, 23, 88].

Чувствительность тест-культур устанавливается с помощью биотестирования серий растворов модельных токсикантов. В России ими чаще всего становятся соли тяжелых металлов (сульфат меди, дихромат калия, сульфат цинка). За рубежом спектр эталонных токсикантов гораздо шире. Например, в работе [294] указано, что в руководящем документе США (1994 г.) предлагается использовать следующие соединения в качестве эталонных токсикантов: хлорид натрия NaCl, хлорид калия (KCl), хлорид кадмия (CdCl₂), медь сульфат (CuSO₄), додецилсульфат натрия (SDS) и калий дихромат (K₂Cr₂O₇); также в научных работах можно встретить

использование лаурилсульфата натрия, фенола, хлороформа, эндосульфана, хлорида аммония, фторида натрия, этилового спирта и других веществ [280, 294, 349].

К модельному токсиканту предъявляются требования, обоснованные задачами его использования: вещество должно быть стойким в водной среде, количественно определяемым в растворе, минимально опасным для оператора анализа [29, 234]. Этим требованиям максимально соответствуют неорганические трудно окисляемые вещества, хотя, как указано выше, органические соединения также используются. Из органических веществ в качестве эталонного токсиканта ученые часто останавливают свой выбор на феноле, поскольку он используется во многих процессах органического синтеза, может выделяться при деструкции современных материалов, присутствует в спектре выбросов и сбросов различных промышленных объектов [294, 368, 380, 411].

3. Сохранение различных параметров жизнеспособности и благополучия тест-культуры. На сегодняшний день такие параметры тест-культур не обоснованы и в практике биотестирования используются не достаточно. Чаще всего можно встретить рекомендации по наблюдению за морфологическими признаками благополучия либо угнетения тест-организмов, что основано на признаках биологического вида, указанных в определителях. В то же время такие важные характеристики тест-культур как продолжительность жизни и уровень плодовитости не стандартизированы ни для одного тест-организма. Этот факт объясним множеством факторов, способных повлиять на характеристики тест-культуры, в результате чего может проявиться модификационная изменчивость в пределах нормы реакции вида на условия существования.

Параметры благополучия тест-культур предлагаем объединить в понятие «здоровье тест-культуры». Изначально понятие «здоровье» широко употреблялось в медицинских и фармакологических аспектах, то есть в основном применительно к человеку. Еще в 1988 году П. И. Калью в своей

обзорной работе приводит 79 определений здоровья [107]. В настоящее время можно встретить понятия «здоровье почвы», «здоровье окружающей среды», «здоровье биосферы», а также применение термина здоровье по отношению к определенной экосистеме [330, 383, 399]. Под здоровьем культуры тест-организмов мы предлагаем понимать ее способность длительно существовать в качестве модельной популяции в созданных оптимальных условиях, стандартизированных абиотических и биотических факторах искусственной среды обитания со стабильной продолжительностью жизни особей, сохранением способности к самовоспроизводству, а также удовлетворением общепринятых требований по чувствительности культуры к эталонному токсиканту.

Таким образом, в современной методологии биотестирования предусмотрены процедуры стандартизации тест-культур и условий проведения биоанализов. Подходы к стандартизации в области биотестирования на сегодняшний день не унифицированы и продолжают развиваться. Для определения пригодности тест-культур к биоанализам с учетом биотических и абиотических факторов, влияющих на тест-организмы и их ответные реакции на токсиканты, необходима разработка универсальной стратегии стандартизации тест-культуры.

1.2.3.2. Стандартизация условий культивирования тест-организмов для получения воспроизводимых результатов

Для получения воспроизводимых результатов биотестов, кроме стандартизации тест-культур, должны быть стандартизированы условия культивирования тест-организмов и проведения самого эксперимента, включающие:

1. Содержание культуры в оптимальных научно обоснованных и регламентированных методикой условиях, позволяющих сохранить здоровье тест-культуры и необходимую чувствительность к токсикантам. Для

гидробионтов, в основном используемых в биотестировании, наиболее важными параметрами являются химический состав культивационной воды, а также его стабильность, температурный и световой режим, биогенные параметры, такие как плотность популяции, вид и периодичность кормления, отсутствие организмов-антагонистов.

Выбор и/или подготовка подходящей для тест-культуры культивационной воды имеет важнейшее значение для успешного культивирования организмов и получения достоверных результатов. Влияние химических и физико-химических свойств водной среды на организмы и их чувствительность к веществам рассмотрено выше (см. раздел 1.2.1). В настоящее время в методиках и протоколах биотестирования можно встретить рекомендации о применении не только природных вод, удовлетворяющих требованиям по их жесткости, насыщенности солями, отсутствию тяжелых металлов и органических загрязнителей, но и алгоритмы разведения организмов на искусственно созданных водных средах. Причем речь не идет о классических питательных средах Успенского или Тамия, используемых в основном для выращивания низших растений, цианобактерий, – искусственные среды вводятся для рыб, ракообразных, хирономид и других организмов [32, 294]. Например, получила распространение среда M4, предложенная Elenkt и Bias для *D. magna*, включающая в свой состав макро- и микроэлементы, а также витамины [324].

Создание экологического оптимума абиогенных и биогенных факторов позволяет поддерживать высокую чувствительность культуры, а также нивелировать сезонные колебания состояния тест-организмов. Для соблюдения абиогенных условий применяют климатостаты и культиваторы различных марок. Большинство из них дает возможность регулировать температуру и освещение. Желательна функция автоматического соблюдения оптимального фотопериода. Биогенные факторы регулируются ежедневными манипуляциями: регулированием плотности культуры,

полового и возрастного состава (при необходимости), выбором полноценного питания и соблюдением его режима.

2. Реализация биотеста, процедуры токсикологического анализа, также требует детальной алгоритмизации и стандартизации условий и значимых параметров, так как условия эксперимента могут повлиять на итоговое заключение о безопасности пробы. В этой части стандартизации биотестирования также важны абиотические и биотические факторы, описанные выше.

Стандартизация тест-культур и процедур биотестирования по указанным направлениям позволяет лабораториям выдавать результаты анализов с точностью, запланированной разработчиком методики. Несоблюдение условий культивирования тест-организмов, требуемых используемой методикой или нарушение алгоритмов биотеста обесценивает порой многолетнюю работу по поддержанию жизнеспособности и работоспособности тест-культур, приводит к недостоверным результатам экологических исследований.

Следовательно, необходимость стандартизации в области биотестирования признана на мировом уровне, но до сих пор не выработано единых стандартов культивирования и проведения экспериментов даже для основных «классических» тест-культур (рыб, низших ракообразных, простейших, одноклеточных водорослей и т.д.).

Например, несмотря на вековую историю культивирования низших ракообразных, условия их содержания, обычно описываемые в методиках (протоколах) испытаний, не унифицированы. В мировой практике биотестирования применяют различные протоколы испытаний для определения острой и хронической токсичности с помощью *D. magna* и *D. pulex* [23, 28, 29, 30, 32, 33]. Часть методик используется и обсуждается только в научных работах [382], некоторые протоколы приняты международными организациями по охране окружающей среды [23, 28, 29, 391]. Условия содержания тест-культур ракообразных и проведения

токсикологических экспериментов могут существенно различаться. Это приводит к трудностям при сравнении результатов биотестирования, полученным по различным методикам, или с помощью культур низших ракообразных, содержащихся в разных условиях.

В американских протоколах биотестирования, основные позиции которых вышли в свет еще в 1988 году [385], лабораторную культуру дафний рекомендуется содержать при плотности посадки 10 взрослых особей на литр культивационной воды. В качестве корма предложены водоросли *Selenastrum capricornutum* и *Chlorella vulgaris*, периодичность кормления – два раза в неделю. В «Руководстве пользователя для проведения биотестирования с помощью *D. magna*» (США) [388] авторы рекомендуют содержание 20 особей *D. magna* в расчете на объем 1,6 литра культивационной воды, то есть в 80 мл воды на одного рачка. Для проведения анализа 5 молодых ракообразных (не более 24 часов) помещают в 80 мл тестируемой среды, повторность опыта четырехкратная, а продолжительность эксперимента составляет 48 часов.

В международном стандарте ISO 6341:2012 плотность посадки при культивировании в 2 раза выше: 20–25 особей на литр воды [30]. Для питания рекомендуются водоросли *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella vulgaris* с ежедневным кормлением [30]. Условия содержания *D. magna* по стандарту ISO 6341:2012 приняты в методике, допущенной в Российской Федерации для государственного экологического контроля и мониторинга [23].

В научных работах описывается содержание *D. magna* в других вариантах: 1 особь на 150 мл [137], 5 особей на 100 мл [209]. При этом согласно экологическим законам известно [375], что от плотности популяции зависят смертность и плодовитость – две основные тест-функции *D. magna*, а также накопление биомассы, пищевое поведение и некоторые другие параметры.

Требования к абиотическим факторам в разных методиках также варьируют. Авторы [390] отмечают, что оптимальное значение уровня рН

воды для культивирования дафний находится в диапазоне от 7 до 8. Poirier с соавторами [385], рекомендует использовать культивационную воду с рН 6,5-8,5. В Руководстве для пользователей «Руководстве пользователя для проведения биотестирования с помощью *D. magna*» [388] диапазон рН культивационной воды составляет 7,6-8,5, а диапазон рН в тестируемой среде шире – 6,8-8,5.

Важная роль освещения для поддержания культуры дафний описана в работе [352]. Авторами показано, что продолжительность освещения влияет на характер размножения популяции дафний. При длине светового дня 8 часов преобладает половое размножение, а при 16-часовом освещении – бесполое. В лабораторных условиях для поддержания культуры *D. magna* рекомендуется поддерживать освещение 16 часов в сутки, 8 часов в сутки – ночная фаза [352, 385].

В практике биотестирования нет единства также в части продолжительности токсикологического эксперимента. В ряде официальных документов [30, 32, 388] рекомендуется проводить эксперимент в течение 24 и 48 часов, в протоколе [27] – строго 48 часов, в исследованиях [336] эксперимент длился 24 и 57 часов, в работе [274] – всего 2 и 4 часа. В России острую токсичность по смертности *D. magna* оценивают за 96 часов [23], а при постоянном перемешивании тестируемой жидкости в течении 48 часов [18].

В 1970-1980 гг. решалась проблема выбора модельных токсикантов для калибровки чувствительности тест-организмов [391]. В результате были предложены вещества, которые могут быть использованы в качестве эталонных токсикантов, одним из них стал бихромат калия. В Канаде используется хлорид натрия, сульфат цинка и бихромат калия [26, 27]. В обзоре [391] подчёркивается, что использование в работе общепринятых соединений является лучшим инструментом для определения «точности» испытаний, а также приемлемости результатов биотестирования.

Таким образом, показано, что лабораторные тест-культуры, несмотря на выращивание в искусственных условиях, подвержены действию абиотических и биотических факторов. Параметры большинства этих факторов можно регламентировать. Для аквакультур, которые чаще всего используются в биотестировании, сложнее всего унифицировать требования к культивационной воде. Ее химический состав и иные свойства отражаются на результатах биотестов, влияя на здоровье тест-организмов при их культивировании, а также могут модифицировать свойства тестируемой среды, например, при необходимости приготовления разбавлений. В целом, изучение влияния условий содержания на характеристики тест-культур остается актуальной научной задачей, решение которой позволит оптимизировать стандартизацию процедур биотестирования и разработать обоснованные рекомендации по лабораторному содержанию тест-организмов.

Таким образом, в главе 1 проведены обобщения и систематизация современных научных данных о биотестировании, включая анализ тенденций развития методологии биотестирования. Рассмотрены факторы, влияющие на результат биотестирования. Даны характеристики, описаны свойства и функции тест-организмов, которые необходимо учитывать в экспериментальной практике.

Обоснованы следующие теоретические и практические положения,

– сформулированы новые понятия в методологии биотестирования: здоровье тест-организмов и базовый тест-организм;

– выявлены основные тенденции развития методологии биотестирования и предложена стратегия планирования и проведения биотестирования, направленная на получение достоверных и экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред, учитывающих многофакторность ответных реакций тест-организмов. Разработка и

апробация новой стратегии биотестирования водных сред легла в основу концепции представленной диссертационной работы;

– выделены три группы факторов, влияющих на итоговый результат биотестирования: зависящие от тестируемой среды, от используемых тест-организмов и от условий реализации комплекса работ по биотестированию. Учет всех изложенных факторов позволит организовать процесс биотестирования для получения корректных результатов и последующей их научно-обоснованной интерпретации;

– обобщены особенности тест-организмов, используемых в работе, с выделением их преимуществ для целей биотестирования; *D. magna* предложен в качестве базового тест-организма при биотестировании водных сред по критериям наиболее стандартизированных условий культивирования, многообразия ответных реакций, включая спектр предлетальных тест-функций. Проведение экологических исследований с использованием базового тест-организма позволит сравнивать результаты токсикологических анализов и воспроизводить их при необходимости.

Результаты анализа литературных данных показали, что главенствующим подходом получения достоверных и экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред на сегодняшний день является увеличение «батареи биотестов». Формирование методологии биотестирования продолжается в этом направлении: а именно предлагаются новые методы биотестирования, ведется поиск чувствительных организмов и их тест-функций, разрабатывается приборное обеспечение методов биотестирования. Однако, в методологии биотестирования остаются нерешенными вопросы целевого выбора биотестов, приближения результатов биотестирования к оценке экологически значимых эффектов токсикантов в окружающей среде, а также строгой стандартизации тест-организмов. Как следствие, отсутствует целостная концепция планирования и проведения биоанализов, направленная на получение достоверных и экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред, учитывающая

многофакторность ответных реакций тест-организмов. Поэтому концепцией нашей работы стала разработка стратегии биотестирования, решающей задачи предварительного целевого выбора биотестов для диагностики установленного фактора загрязнения, сочетания экспресс-биотестов с системным биотестированием в условиях неустановленного фактора токсичности и усиления контроля пригодности тест-культур к биоанализам.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследований

Поставленные в диссертации задачи решались в процессе многолетних лабораторных и полевых работ (2006-2020 гг.). Основной базой лабораторных экспериментальных исследований была Научно-исследовательская экоаналитическая лаборатория Вятского государственного университета, имеющая подразделения количественного химического анализа и биотестирования, аккредитованная Росаккредитацией РФ на данные виды работ. Результаты исследований апробировались и внедрялись в следующих лабораториях и научных центрах (акты апробации работ – Приложение 10):

- специализированная инспекция аналитического контроля (СИАК) областного природоохранного центра (г. Киров);
- испытательный центр АО «Кировские коммунальные системы» (г. Киров);
- центр лабораторного анализа и технических измерений (ЦЛАТИ) по Приволжскому федеральному округу (г. Киров);
- испытательная канализационная химико-бактериологическая лаборатория (г. Волгоград);
- лаборатория физиологии и токсикологии водных животных ФГБУН Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН (г. Борок).

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).

Объектами исследований были водные среды:

– водные растворы с моделируемым загрязнением, приготовленные методом последовательных разбавлений с использованием природной артезианской воды (химический состав – Приложение 1 и 2);

– природные воды;

– водные вытяжки из почв, приготовленные по используемым методикам биотестирования (см. ниже).

Отбор нативных сред (почв и природных вод) проводился по общепринятым методам, закрепленным в государственных стандартах [2, 3, 4]. Пробоподготовка проводилась в соответствии с задачами исследований по используемым методикам биотестирования и количественного химического анализа.

В диссертации использованы общенаучные методы обобщения, систематизации, анализа информации. Основными методами экспериментальных разделов были следующие методы биотестирования:

– оценка токсичности водных сред по смертности и плодовитости низших ракообразных *D. magna*, методика ФР.1.39.2007.03222 [23];

– оценка токсичности водных сред по смертности и плодовитости низших ракообразных *C. affinis*, методика ФР 1.39.2007.03221 [22];

– экспресс-биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* с использованием прибора Концентратомер «Биотестер-2» (Россия, ООО «Спектр-М»), методики ФР.1.39.2015.19242 [24], ФР 1.39.2015.19243 [25];

– экспресс-биотест по изменению биолюминесценции препарата «Эколюм» на основе *E. coli* с использованием прибора «БИОТОКС-10М» (Россия, ООО «Нера-С»), методика ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 [17];

– общепринятые методы оценки следующих тест-функций *D. magna*: смертность, линейные размеры тела, пигментация тела, задержка появления первого потомства, плодовитость;

– модифицированные нами методы биотестирования по реакциям *D. magna*: учет трофической и двигательной активности, «качества» молодежи,

появления абортивных яиц, формирование опытных поколений рачков F2 и F3 и учет их тест-функций.

В работе представлена подробная характеристика использованных аттестованных методов биотестирования, описаны методы биотестирования, разработанные в процессе решения поставленных задач, которые рассмотрены в экспериментальных разделах.

Для сопоставления с результатами биотестов, а также для определения количественного содержания токсикантов применялись следующие методы физико-химического анализа:

– атомно-абсорбционный для определения массовых долей валовых и подвижных форм металлов в водных средах; прибор Атомно-абсорбционный спектрометр «Спектр-5» (Россия, ОАО «Союзцветметавтоматика»); методика ФР.1.31.2012.135739 [21];

– спектрофотометрический для определения содержания минеральных форм азота в природной воде; прибор Спектрофотометр ЮНИКО 2800 (Россия, ООО «ЮНИКО-СИС»); методики ПНД Ф 14.1:2:4.4-95 [15], ПНД Ф 14.1:2:3.4-95 [14];

– хроматографический для определения содержания катионов и анионов в природной воде, прибор Хроматограф жидкостный «Стайер» (Россия, ЗАО НПКФ «Аквилон»), методики ФР.1.31.2005.01724 [19], ФР.1.31.2005.01738 [20];

– газовая хроматомасс-спектрометрия для определения содержания органических веществ в пробах; прибор газовый хроматограф-масс-спектрометр DSQ (Япония, Shimadzu), с расшифровкой спектров по библиотеке NIST [364];

– инфракрасная спектрофотометрия для определения содержания нефтепродуктов, прибор Анализатор нефтепродуктов КН-2м (Россия, «СИБЭКОПРИБОР»), методика ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 [16];

– масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой для определения элементного состава воды, прибор PQ-2 (Англия, «Elemental»);

– потенциометрия для определения значений рН водных растворов, прибор рН-метр «рН-150 МИ» (Россия, ООО НПО «Измерительная техника ИТ»);

– амперометрический для измерения концентрации кислорода, прибор HI 9143 (Литва, «HANNA»).

Все используемые приборы проходили своевременную поверку и калибровку.

2.2. Методы исследования токсичности водных сред

2.2.1. Методика определения токсичности водных сред по гибели и плодовитости *D. magna*

Автором методики является Н. С. Жмур. Впервые методика была аттестована в 2001 году, в настоящее время применяется ее версия 2007 года [23]. Используемый тест-организм – *Daphnia magna* Straus. Оцениваемые тест-функции – смертность и плодовитость по сравнению с контрольными показателями. Время эксперимента – 96 часов для оценки острой токсичности по показателю смертности особей, 24 дня требуется для оценки хронической токсичности по изменению плодовитости.

Операции при биотестировании с использованием *D. magna*:

1. Подготовка пробы согласно методике: получение водных вытяжек из твердых образцов, фильтрация вод и полученных водных вытяжек, приготовление необходимых разбавлений, измерение температуры, рН и содержания растворенного кислорода в контрольном и опытных вариантах.

2. Подготовка проб для эксперимента: пробы без разбавлений и варианты их разбавлений наливают в стеклянные сосуды по 100 см³ (опыт). Другие сосуды наполняют таким же объемом отфильтрованной воды из емкостей, где культивируются дафнии (контроль). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

3. Посадка рачков: при биотестировании используют молодь дафний в возрасте 6–24 часов. В каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 дафний. Их быстро переносят стеклянной трубкой диаметром 5–7 мм на сачок из мелкоячеистого материала («мельничный газ»), дают стечь жидкости, чтобы не смешивать растворы разного состава, а затем переносят дафний в тестируемую среду, погружая туда сачок. Тщательно пересчитывают особей, определяют, не пострадали ли они при пересадке. Дафний ежедневно кормят и пересчитывают.

4. При определении плодовитости дафний, взрослых особей пересаживают в свежую тестируемую среду каждые 5 дней. С момента появления молоди необходимо вести ее подсчеты параллельно с учетом живых взрослых особей.

5. Завершение эксперимента: в конце биотестирования визуально подсчитывают количество живых дафний. Живыми считаются дафнии, которые свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позже, чем через 15 секунд после легкого встряхивания воды. Остальных дафний считают погибшими. В опыте на установление хронического действия подсчитывают итоговое количество молоди в расчете на 1 самку.

После подсчета дафний в контроле и опыте в каждом сосуде определяют концентрацию растворенного кислорода, значение рН и температуру;

6. Обработка и оценка результатов. На основании результатов трех параллельных определений количества живых дафний в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых дафний во всех вариантах.

Рассчитывают в процентах количество погибших дафний в опыте по отношению к контролю по формуле:

$$A = \frac{X_K - X_T}{X_K} \cdot 100\% ,$$

X_k – количество выживших дафний в контроле, X_t – количество выживших дафний в тестируемой среде.

Плодовитость в контрольных и опытных вариантах выражают в виде среднего количества молодых особей на 1 самку и затем сравнивают по критерию Стьюдента. Если показатель достоверности t больше критерия Стьюдента, то делается вывод о наличии хронической токсичности, если t меньше критерия Стьюдента, то проба не оказывает хронического токсического действия. Также критерием хронической токсичности служит гибель 20% и более взрослых тест-организмов.

Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы делают на основании величины A . Если величина A составляет 50% дафний и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности анализируемой пробы устанавливают ее безвредную кратность разбавления.

2.2.2. Методика определения токсичности водных сред по смертности и плодовитости *C. affinis*

Данная методика основана на использовании другого вида низших ракообразных – *Ceriodaphnia affinis* Liljeborg [22]. Оцениваемые тест-функции – гибель и плодовитость. Экспозиция для определения острой токсичности по гибели – 48 часов, для определения хронической токсичности по изменению плодовитости 7-10 суток (появление трех последовательных приплодов рачков).

Несмотря на схожесть общих принципов и алгоритма биотестирования методики не могут полностью заменить друг друга, поскольку тест-организмы обладают разной чувствительностью к загрязняющим веществам [230].

Операции при биотестировании схожи с биотестом по *D. magna*, отличаются в следующих пунктах:

1. Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводят в десяти стаканах в 2-х повторностях и сопровождают одной для всех разбавлений серией контроля в 10 стаканах;

2. Каждого рачка помещают в 15 мл тестируемой водной среды;

3. При определении острой токсичности тестируемая среда не меняется, а в опыте на установление хронического токсического действия смену растворов на новые осуществляют через каждые двое суток на третьи из свежееотобранных проб или из проб, хранящихся в холодильнике при температуре от +2 °С до +4 °С.

Расчеты смертности и плодовитости ведутся аналогично методике с использованием *D. magna* на основании данных двух параллельных определений.

2.2.3. Методика определения токсичности водных сред по изменению хемотаксической реакции *P. caudatum*

В качестве тест-организма для данного биотеста используются инфузории *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Оцениваемая тест-функция – изменение хемотаксической реакции этих простейших, то есть двигательной активности в опытной пробе по сравнению с контрольной. Для учета тест-функции используется специализированный прибор «Биотестер-2». Время тест-реакции составляет 30 мин., поэтому методика относится к экспресс-биотестам [24].

Методика основана на способности инфузорий *P. caudatum* реагировать на присутствие в водной среде веществ, представляющих опасность для их жизнедеятельности, и направленно перемещаться по градиенту концентраций (в направлении изменения концентраций) этих веществ (хемотаксическая реакция), избегая их вредного воздействия. Хемотаксическая реакция реализуется при условии наличия стабильного во времени градиента концентраций химических веществ.

Подобный градиент создается путем наложения на взвесь инфузорий, находящихся в загустителе (поливиниловом спирте), испытуемой жидкости. При этом в измерительной кювете образуется стабильная граница раздела, сохраняемая в течение всего времени биотестирования. Эта граница не препятствует свободному перемещению инфузорий в предпочтительном для них направлении и при этом предотвращает перемешивание жидкостей из нижней и верхней зон.

После создания в кювете двух зон в течение 30 минут происходит перераспределение инфузорий по зонам. Важная особенность поведенческой реакции инфузорий – массовое перемещение организмов в верхние слои жидкости. В случае, если исследуемая проба не содержит токсических веществ, в кювете будет наблюдаться концентрирование клеток инфузорий в верхней зоне. Наличие в исследуемой пробе токсических веществ приводит к иному характеру перераспределения инфузорий в кювете, а именно: чем выше токсичность пробы, тем меньшая доля инфузорий перемещается в верхнюю зону (исследуемую пробу).

Критерием токсического действия является значимое различие в числе клеток инфузорий, наблюдаемых в верхней зоне кюветы в пробе, не содержащей токсических веществ (контроль), по сравнению с этим показателем, наблюдаемым в исследуемой пробе (рис. 2).

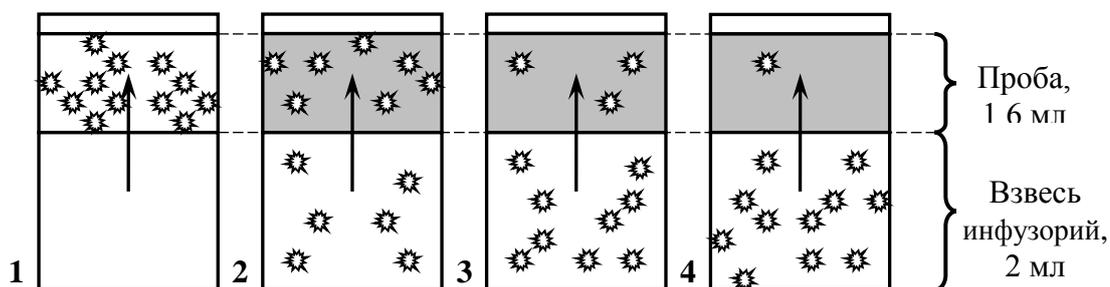


Рисунок 2 – Схема биотестирования по хемотаксической реакции инфузорий: 1 - безвредная проба; 2, 3 - среднетоксичная проба; 4 - токсичная проба [77]

Количественная оценка параметра тест-реакции, характеризующего токсическое действие, производится путем расчета соотношения числа

клеток инфузорий, наблюдаемых в контрольной и исследуемой пробах, и выражается в виде индекса токсичности T (табл. 3).

Таблица 3 – Классификация проб, анализируемых с помощью *P. caudatum*

Интервал индекса токсичности T , у. е.	Группа токсичности
$0 < T < 0,40$	Группа I. Допустимая степень токсичности
$0,41 < T < 0,70$	Группа II. Умеренная степень токсичности
$T > 0,71$	Группа III. Высокая степень токсичности

Примечание: у. е. – здесь и далее - условные единицы

Расчет индекса токсичности производится по формуле:

$T = (X_k - X_{оп}) / X_k$, где T – индекс токсичности (у. е.), X – показания прибора «Биотестер-2» для опытных и контрольных вариантов.

2.2.4. Методика определения токсичности водных сред по изменению биолюминесценции *E. coli*

Методика предполагает использование культуры люминесцентных бактерий *E. coli*, содержащихся в среде инертных газов в специальных стеклянных флаконах [17]. Бактерии штамма М-17 закупаются у разработчика метода биотестирования в виде препарата «Эколюм». Оцениваемая тест-функция – изменение биолюминесценции бактериальной взвеси при воздействии химических веществ, присутствующих в пробе, по сравнению с контролем. Для регистрации тест-функции используется прибор «БИОТОКС-10М». Время тест-реакции составляет 30 минут, то есть биотест является экспрессным.

Операции при биотестировании:

1. Подготовка опытных (исследуемых) проб согласно методике: получение водных вытяжек из твердых образцов, фильтрация вод и полученных водных вытяжек, приготовление серии разбавлений.

2. Подготовка бактериальной суспензии: вскрывается флакон с бактериальным препаратом (хранится в морозильной камере), добавляется 10 мл дистиллированной охлажденной воды с нейтральным значением рН для регидратации препарата. Суспензия выдерживается в холодильнике при температуре $+(2-4)^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Далее температура суспензии бактерий доводится до комнатной.

3. Разбавление суспензии бактерий: регидратированную бактериальную суспензию разбавить до показателей биолюминесценции в 100–500 раз превышающих фоновые шумы прибора «БИОТОКС-10 М».

4. Проведение эксперимента. Для анализа отбирают по 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и вносят в три пробирки для контрольных и три пробирки для опытных (исследуемых) вариантов. В пробирки в качестве контроля добавляют по 0,9 мл дистиллированной воды, а в остальные по 0,9 мл опытной пробы. Замечают время экспозиции (30 мин.), а затем измеряют интенсивность биолюминесценции бактерий;

5. Расчет результатов по формуле:

$T=(X_k-X_{оп}) / X_k \cdot 100\%$, Т – индекс токсичности (у. е.), X – среднее значение биолюминесценции (для контрольного и опытного вариантов).

6. Оценка результатов: проводится согласно таблице 4.

Таблица 4 – Классификация проб водных сред, анализируемых с помощью *E. coli*

Интервал индекса токсичности Т, у.е.	Группа токсичности
$0 < T < 20,00$	Группа I. Проба не токсична
$20,1 < T < 49,99$	Группа II. Проба средне токсична
$T > 50,00$	Группа III. Проба сильно токсична

Предложенная в методике шкала токсичности обеспечивает начальную интерпретацию результатов, что особенно важно при выдаче результатов исследований специалистам из других областей знаний.

2.2.5. Обеспечение объективности и математической достоверности результатов работы

Представленные и обсуждаемые в работе результаты экспериментов получены на базе аккредитованной научно-исследовательской экоаналитической лаборатории Вятского государственного университета. Аккредитация лаборатории – это официальное признание органом по аккредитации (Росаккредитацией) компетентности лаборатории выполнять работы в определенной области оценки соответствия [6]. Для успешной аккредитации и подтверждения компетентности в лаборатории установлены и соблюдаются процедуры контроля микроклимата, качества и пригодности реактивов для анализов, стандартизации тест-организмов, контроля приемлемости и прецизионности результатов анализа.

Все эксперименты выполнялись в трех опытных параллелях (повторностях). 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. Достоверными считали различия между двумя сравниваемыми массивами данных, если уровень значимости был менее 0,05 (5%). В ряде случаев приводим конкретное значение уровня значимости. Для расчетов использовался Microsoft® Excel™.

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

Обзор литературы, представленный в главе 1, подтвердил, что несмотря на широкое распространение методов биотестирования, обеспеченных фундаментальными и прикладными исследованиями механизмов ответных реакций тест-организмов, в современной методологии биотестирования отсутствует целостная концепция планирования и проведения биотестирования, направленная на получение достоверных и экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред, учитывающая многофакторность ответных реакций тест-организмов.

При решении этой научной проблемы на первый план выходит научно обоснованный выбор тест-организмов на этапе планирования экологических исследований. Согласно существующим научно-методологическим подходам данный выбор сводится к следующему:

1. Учёт особенностей антропогенного влияния, ожидаемых на территории исследования, с ориентацией на территории-аналоги, испытывающие воздействие одинаковых или близких по химической природе загрязняющих веществ. Недостатком подхода является невозможность полного совпадения территорий исследования по абиотическим и биотическим условиям, что усложняет экстраполяцию ранее полученных сведений о чувствительности биотестов.

2. Ориентация на научные исследования, раскрывающие особенности разнообразных тест-организмов и их реакций на загрязняющие вещества.

3. Использование «батареи биотестов» – количественного подхода увеличения числа биотестов с желательным включением в исследование тест-организмов разных трофических групп.

В российской государственной природоохранной практике корректный выбор тест-организмов достаточно условен и ориентируется в первую очередь на возможности лабораторий, обеспечивающих экологический контроль и мониторинг. Лаборатории в свою очередь не стремятся увеличивать разнообразие культивируемых организмов, руководствуясь Приказом Минприроды № 536 2014 года [11], рекомендуя минимальное количество биотестов на двух организмах разных систематических групп.

Ниже представлены исследования, направленные на выбор биотестов во-первых, в ситуации известного основного фактора токсичности, и, во-вторых, при неизвестном или комплексном характере загрязнения.

3.1. Целевой выбор биотестов для диагностики установленного основного фактора токсичности

3.1.1. Алгоритм предварительного целевого выбора биотестов для экологических исследований

Нами предлагается алгоритм выбора биотестов, основанный на ранжировании их чувствительности к определенному токсиканту, который создает основной фактор токсичности компонентов среды в районах воздействия на нее предприятий различных отраслей. Под основным фактором токсичности понимается наличие в тестируемой среде вещества, эффекты которого превалируют над действием на живые организмы других веществ пробы. Предварительные испытания биотестов на чувствительность к загрязняющему веществу, потенциально содержащемуся в пробах, позволят в дальнейших мониторинговых работах применять «адресные» целевые методы биотестирования.

Алгоритм установления чувствительности биотестов (методик биотестирования) к известному основному фактору токсичности, заключается в следующем [376]:

1. Установление нелетальных и летальных доз исследуемого вещества для базового тест-организма *D. magna* в биотесте по смертности организмов. Данный биотест – один из наиболее широко распространенных в мировой практике биотестирования. Определение среднелетальной концентрации токсиканта при этом не обязательно, если это не является задачей исследования. Такой подход значительно сокращает объем работы.

Ориентиром для выбора серии тестируемых концентраций могут быть результаты опубликованных научных работ в случае, если токсикант ранее подлежал изучению. В ином случае необходимо ориентироваться на действующие дозы гомологичных веществ (для органических соединений) или наиболее близких по генезису веществ (для неорганических). Запланированные дозы для тестирования необходимо вводить в природную воду, что позволит получить данные, адекватные естественному химическому фону природных вод. Использование дистиллированной воды не рекомендуется по выше указанной причине.

2. На втором этапе выбираются биотесты, доступные для дальнейшего использования для биотестирования водных сред. Несмотря на рекомендации нормативного документа об использовании двух тест-организмов разных трофических групп [11], на данном этапе необходимо использовать все доступные методики биотестирования для дальнейшего выбора наиболее чувствительных, не менее трех.

С помощью выбранных биотестов тестируются модельные водные среды с добавками нелетальных и летальных доз, выявленных для базового тест-организма *D. magna*. При необходимости, для улавливания различий в чувствительности испытуемых биотестов, оцениваются эффекты дополнительных доз веществ. Контрольная среда, используемая для моделирования, остается той же – подобранной изначально.

3. Установление дополнительных эффектов действия токсиканта на исследуемые организмы для разграничения близкой чувствительности биологических видов. Данная процедура является не обязательной.

4. Сопоставление полученных результатов с помощью разных биотестов путем распределения их в порядке возрастания чувствительности к тестируемым веществам.

Выбранные для тестирования вещества представлены на рисунке 3. В каждой серии экспериментов ряды чувствительности формировались по результатам биотестирования модельных водных сред, а также, по возможности, подтверждались на нативных средах, – природных водах или водных вытяжках из почв, отобранных в местах сформировавшегося специфического загрязнения. В отдельных случаях использовали моделирование загрязнения почв, если исследуемый токсикант в большей степени характерен для почвы.



3

Рисунок 3 – Группы токсикантов для апробации алгоритма выбора биотестов

Апробация проводилась при исследовании чувствительности биотестов с использованием четырех тест-организмов, характеристики которых описаны в главе 2. У низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis* основным биотестом было выявление смертности для установления острой летальной токсичности, а также в качестве дополнительного – тест по изменению

плодовитости. В биотесте с инфузориями *P. caudatum* оценивали изменение хемотаксиса – двигательной реакции на токсиканты. Бактериальная тест-система «Эколюм» относится к биолюминесцентным тестам по реакции *E. coli*. Во 2 главе также раскрыто обоснование этого выбора и краткий ход токсикологических анализов. Схема исследований показана на рисунке 4.



Рисунок 4 – Схема ранжирования чувствительности четырех биотестов

Выполнялось 2 блока экспериментов и 1 аналитический блок:

I – биотестирование проб по реакциям *D. magna* и *C. affinis* с подразделением опытов на острые (IA) и хронические (IB).

II – экспресс-биотестирование растворов веществ, оказывающих летальное действие на низших ракообразных (IIА), и не оказывающих такого действия (IIБ).

III – сравнение чувствительности биотестов путем анализа результатов.

Результат каждого блока экспериментов представлен в виде рядов чувствительности биотестов по отношению к тестируемому веществу и других выводов по результатам проведенных экспериментов.

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

Чувствительность биотестов к солям тяжелых металлов

Тяжелые металлы (ТМ) – группа химических элементов, находящихся в природных средах и объектах в виде различных соединений оксидов, сульфидов, средних, основных солей и комплексных соединений. Для биологических объектов многие из них важны, выполняют роль необходимых микроэлементов и содержатся в них чаще в виде комплексных катионов с органическими лигандами и водой, а также могут находиться и в анионной форме. В дозах превышающих значения ПДК все соединения ТМ относятся к токсикантам. К наиболее токсичным ТМ относятся Cd, Hg, Pb, Zn, Cu, Co, Cr Mo, Be, Ni. В природных биологических объектах они встречаются как при отдельном, так и при совместном присутствии. При антропогенном рассеивании соединения ТМ загрязняют окружающую среду, способны накапливаться в живых организмах, вследствие чего оказывают на них и природные экосистемы токсичное воздействие [51, 99].

В общей и промышленной токсикологии соединения тяжелых металлов являются хорошо изученными. Механизм токсического действия тяжелых металлов лежит во взаимодействии с биологически активными макромолекулами. Катионы ТМ могут формировать координационно-ковалентные связи с аминокислотами (АК), ферментами, ДНК, РНК, липопротеидами в мембранах клеток, гормонами и другими веществами, связывая кислород-, азот- и серосодержащие группы [206].

Высокие уровни загрязнения почв характерны в районах непосредственной добычи и переработки руд железа и цветных металлов – до нескольких десятков ПДК подвижных форм элементов [106]. В городах, не являющихся металлургическими центрами, концентрация ТМ в природно-техногенных средах также растет. В частности, в г. Калуга был выявлен

опасный уровень загрязнения почв соединениями тяжелых металлов по содержанию свинца, цинка более 60 мг/кг [192]. В центре Стокгольма максимальное валовое содержание свинца достигло средних значений 104 мг/кг [358]. Во многих водных объектах также диагностируются высокие уровни загрязнения ТМ [167, 223].

Основными документами, регулирующими порядок разработки и утверждения нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, являются Приказы Росрыболовства и Минсельхоза России [12, 13]. Нормативы предельно-допустимых концентраций для водных объектов рыбохозяйственного назначения (ПДКр.х.) в большинстве случаев являются более строгими по сравнению с ПДК для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования, так они разрабатывались исходя из непрерывного контакта гидробионтов с их средой обитания – поверхностной природной водой.

Моделирование загрязнения природной воды солями тяжелых металлов. Для установления чувствительности выбранных методов биотестирования к загрязнению воды тяжелыми металлами проводили модельные эксперименты. Среди всего разнообразия ТМ были выбраны четыре, соединения которых наиболее часто обнаруживаются в компонентах окружающей среды: медь, кадмий, свинец, цинк [243]. Краткая токсикологическая характеристика металлов приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Характеристики ТМ, используемых в модельных опытах

ТМ	Класс опасности	ПДКх.п., мг/дм ³	ПДКр.х., мг/дм ³	Биологическое действие соединений
Медь	3	1,0	0,001	Блокировка группы -SH в белках, в особенности в ферментах. Повышение проницаемости мембран митохондрий
Кадмий	2	0,001	0,005	Связывает серосодержащие ферменты и аминокислоты. Канцероген. Кумулятивный яд.
Свинец	2	0,01	0,006	Блокировка тиоловых ферментов; взаимодействие с карбоксильными и фосфатными группами биополимеров, нуклеотидами; инактивация эстераз. Протоплазматический яд широкого спектра действия.
Цинк	3	1,0	0,01	Денатурация белков. Мутагенез через нарушение работы ферментных белков – ДНК- и РНК-полимераз.

Примечание: ПДКх.п. – предельно допустимая концентрация для воды водных объектов хозяйственно-питьевого назначения; ПДКр.х. – предельно допустимая концентрация для воды водных объектов рыбохозяйственного назначения.

В качестве загрязняемой водной среды использовали природную воду питьевого качества. Её полный и краткий химический состав приведен в Приложениях 1 и 2. Для моделирования загрязненных вод использовали добавки хорошо растворимых солей ТМ: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Выбор этих солей обеспечил присутствие тяжелых металлов в виде растворимых форм. Согласно нормативному документу [12] учет предельных концентраций не подразумевает разграничение водорастворимых форм металлов на их виды.

Согласно, предлагаемому нами алгоритму установления чувствительности биотестов, тестировали модельные воды с возрастающими дозами соединений ТМ с помощью *D. magna*. Полученные таким образом результаты служили ориентиром для выбора модельных растворов, тестируемых далее в биотестах по смертности *C. affinis*, угнетению двигательной активности *P. caudatum*, снижению биолюминесценции бактерий *E. coli*. Полученные результаты отражены в таблице 5.

По результатам биотестов с оценкой смертности *D. magna* и *C. affinis* основными тестируемыми водными средами стали те, которые содержали 1, 5 и 10 ПДКр.х. в расчете на ионы меди, кадмия, свинца и цинка. В количественном выражении добавки солей этих металлов различались не более, чем в 2 раза. Добавки 0,001–0,01 мг/дм³ в расчете на действующий ион соответствовали 1 ПДКр.х. (табл. 5). В биотесте по *D. magna* эти минимальные добавки не вызывали ответной гибели организмов, тогда как в биотесте по *C. affinis* в варианте с добавкой соли свинца, наблюдалась гибель рачков (30%), а при тестировании соли меди гибель цериодафний достигла 40%. Увеличение действующих доз подтвердило повышенную чувствительность *C. affinis* к загрязнению воды свинцом. В вариантах с добавками солей кадмия и цинка нарастание эффектов у двух видов низших ракообразных было одинаковым.

Таблица 5 – Результаты биотестов в ответ на возрастающие дозы ТМ

Оценка тест- реакции	Токсиканты и их концентрации											
	Cu ²⁺ , мг/дм ³			Cd ²⁺ , мг/дм ³			Pb ²⁺ , мг/дм ³			Zn ²⁺ , мг/дм ³		
	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.	78,9±23,7 III группа	73,6±22,1 III группа	85,3±16,2 III группа	0 I группа	0 I группа	23,5±6,1 II группа	0 I группа	0 I группа	6,1±1,8 I группа	0 I группа	0 I группа	0 I группа
Индекс Т <i>P. caudatum</i> , у.е.	0,58±0,05 II группа	0,82±0,04 III группа	0,94±0,05 III группа	0,93±0,04 III группа	0,95±0,03 III группа	0,97±0,02 III группа	0,45±0,04 II группа	0,47±0,02 II группа	0,58±0,05 II группа	0,22±0,04 I группа	0,43±0,08 II группа	0,72±0,1 III группа

Примечание: * - погрешность в пределах норматива методик [22, 23];

обозначение групп токсичности указано в разделах 2.4.3 (табл. 2) и 2.4.4 (табл. 3).

Далее модельные растворы с выбранными указанным способом дозами ТМ, тестировались с помощью экспресс-биотестов (табл. 5). В отношении трех ТМ (Cd, Pb, Zn) *E. coli* оказались значительно устойчивее, чем *P. caudatum*. Даже концентрация свинца и цинка соответствующая 10 ПДКр.х. значимо не увеличивали индексы токсичности (Т) для *E. coli*. При загрязнении природной воды кадмием только максимальная из трех доз металла привела к увеличению индекса Т до значений II группы токсичности. Следовательно, при загрязнении водных сред минеральными соединениями Cd, Pb, Zn бактериальный биотест с использованием *E. coli* оказался наименее чувствительным из четырех испытываемых методов.

Другая ситуация наблюдалась при тестировании растворов меди. Все модельные растворы были отнесены к III группе токсичности для *E. coli*. Биотест по хемотаксису *P. caudatum* дал схожие результаты, однако раствор, загрязненный в меньшей степени, характеризовался II группой токсичности по *P. caudatum*, что дало основание по чувствительности к меди в предлагаемом нами ряду расположить метод биотестирования на инфузориях после метода с использованием *E. coli*.

Таким образом, в результате апробации алгоритма выбора биотестов для экологических исследований были составлены ряды снижения чувствительности четырех биотестов к следующим ТМ:

– к меди: биолюминесцентный 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* > биолюминесцентный тест на *E. coli*;

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

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

Следовательно, при опасности загрязнения водных сред тяжелыми металлами в первую очередь рекомендуем ориентироваться на тест с использованием инфузорий *P. caudatum*. Биотесты по гибели низших ракообразных всегда проявляли среднюю чувствительность. При этом реакция бактерий *E. coli* на воздействие кадмия, свинца, цинка минимальная, а на медь – максимальная.

Кроме этого, проведенные эксперименты с использованием четырех биотестов позволили построить ряд опасности загрязнения водных сред тяжелыми металлами: $Cu > Cd > Pb > Zn$.

Первые эксперименты по апробации алгоритма выбора биотестов для конкретных экологических исследований показали, что даже в отношении близких по генезису и токсикологическому действию веществ наблюдаются значимые различия в чувствительности биотестов – вплоть до противоположных результатов разных методов биотестирования. Следовательно, стратегия предварительного целевого выбора биотестов, направленная на выявление наиболее чувствительных методов биотестирования в условиях известного основного фактора токсичности, является оправданной с точки зрения затрат времени для дальнейшего корректного применения биотестирования в рамках комплекса экологических исследований.

Чувствительность тест-организмов к минеральным соединениям азота

Минеральные соединения азота, присутствующие в водных средах в растворенном виде, представлены нитратами, нитритами, ионами аммония. В соответствии с требованиями глобальной системы мониторинга состояния окружающей среды (ГСМОС/GEMS) нитрит- и нитрат-ионы входят в программы обязательных наблюдений за составом питьевой воды и являются важными показателями степени загрязнения и трофического статуса природных водоемов [160, 332].

Наиболее типичными промышленными источниками поступления минеральных форм азота в окружающую среду, в частности поверхностные воды, является производство минеральных удобрений, а также те предприятия химической промышленности, которые используют азотную кислоту и её соли в качестве сырья. Сельское хозяйство, вследствие образования большого количества отходов животноводства и как основной потребитель минеральных удобрений, в условиях промывного почвенного режима является важным антропогенным источником поступления техногенного азота в водные объекты [226].

В природных поверхностных водах и сточных водах нередко содержание минерального азота выше установленных нормативов [82, 98, 197]. По этой причине данные соединения наряду с фосфатами являются одними из основных причин эвтрофикации водоемов. На примере озер Ямало-Ненецкого автономного округа показано, что даже водные объекты, не имеющие прямого сброса в них сточных вод, подвергаются закислению из-за формирования кислотных осадков под влиянием выбросов оксидов азота и серы [36].

При биотестировании природных и сточных вод, загрязненных соединениями азота, могут наблюдаться противоположные друг другу эффекты – как стимуляция, так и угнетение функций организмов, поскольку азот относится к основным биогенным элементам, и эффекты его соединений закономерно подвергаются инверсии ответных реакций живых организмов [160]. Следовательно, установление откликов тест-организмов и рядов чувствительности биотестов может способствовать последующей интерпретации результатов биотестирования водных сред, которые являются реципиентами азотного загрязнения.

Моделирование токсического действия азотсодержащих минеральных веществ в условиях раздельного воздействия на организмы. Для установления рядов чувствительности моделировалось загрязнение артезианской воды питьевого качества нитратом натрия,

нитритом натрия и хлоридом аммония (химический состав исходной воды – Приложения 1 и 2). Данные вещества были выбраны целенаправленно: после диссоциации солей токсический эффект минеральных форм азота будет превалировать над биологическим действием сопутствующих им ионов [160]. Этот факт подтверждается установленными предельно-допустимыми концентрациями: ПДКр.х. нитратов – 40 мг/дм^3 , для нитритов и ионов аммония нормативы гораздо строже – $0,08 \text{ мг/дм}^3$ и $0,5 \text{ мг/дм}^3$ соответственно, тогда как допустимое содержание натрия и хлорид-ионов значительно выше (120 мг/дм^3 и 350 мг/дм^3 соответственно). По причине известной величины ПДКр.х. в качестве ориентира действующих доз потребности в широком диапазоне тестируемых концентраций не было.

В первой серии экспериментов тестировались относительно невысокие дозы загрязнения, не оказывающие летального действия. Вещества вводились в воду до достижения 5 и 10 ПДКр.х. в расчете на действующий ион. Ориентировались на ПДК для водоёмов рыбохозяйственного назначения (ПДКр.х.), поскольку дальнейшее тестирование проводили в основном на гидробионтах, а также бактериальной тест-системе «Эколюм» с *E. coli*. Контрольной средой служила питьевая вода без добавок.

Низшие ракообразные *D. magna* и *C. affinis* различались по чувствительности к тестируемым веществам. Наиболее значимая разница в реакции этих рачков была при загрязнении водной среды ионами аммония. Для цериодафний запланированные изначально дозы, соответствующие концентрации 5 и 10 ПДКр.х. по аммоний, оказались летальными, поэтому в части опыта с внесением в воду ионов NH_4^+ для данных организмов концентрацию аммония уменьшили до 1 и 2,5 ПДКр.х. Поскольку минеральные формы азота – одно из наиболее распространенных видов загрязнения биогенными элементами, то биотесты по смертности ракообразных *D. magna* и *C. affinis* сразу же были дополнены испытаниями на хроническую токсичность с фиксацией плодовитости и некоторых других тест-функций (табл. 6, 7).

Таблица 6 – Реакции *D. magna* на загрязнение вод нитрат-, нитрит-ионами и ионами аммония

Показатели	Вариант						
	Контроль	Нитрат ион (NO ₃ ⁻)		Нитрит ион (NO ₂ ⁻)		Ион аммония (NH ₄ ⁺)	
		5 ПДКр.х.	10 ПДКр.х.	5 ПДКр.х.	10 ПДКр.х.	5 ПДКр.х.	10 ПДКр.х.
Смертность, % к контролю**	0	5	5	7,5	0	2,5	5
Плодовитость, шт./ 1 самку.	9,3±0,7	7,3±1,1	5,7±0,1*	3,6±1,1*	4,2±0,1*	2,9±0,5*	2,1±0,2*
Абортивные яйца, шт./вариант	0	5	1	8	6	4	12
Мертворожденные особи, шт./вариант	0	1	4	0	1	1	0

Примечание: ПДКр.х. – предельно допустимая концентрация веществ для воды водных объектов рыбохозяйственного назначения; * - различия достоверны в сравнении с контролем; ** - погрешность в пределах норматива методики [23].

Реакция *D. magna* на загрязнение минеральными формами азота в нелетальных дозах ярче всего отражается на показателе плодовитости. Несмотря на отнесение азота к биогенным элементам, загрязнение его минеральными формами в большинстве случаев угнетали способность рачков к размножению (табл. 6). Нитрат-ионы оказывали наименьшее воздействие: их концентрация соответствующая 5 ПДКр.х. угнетала плодовитость, но различия с контролем оказались недостоверны. На втором месте по силе воздействия оказались нитрит-ионы, снизившие показатель в 2,6 (при 5 ПДКр.х.) и 2,2 раза (при 10 ПДКр.х.). Максимальное же подавление размножения *D. magna* вызвали добавки ионов аммония [160].

Кроме смертности и плодовитости *D. magna* за 24 дня эксперимента учитывали количество абортивных яиц и число мертворожденной молодежи. Эти явления не носили массовый характер, поэтому число фактов приводится в целом на вариант (сумма по трем параллельным определениям). Количество мертвой молодежи было единичным во всех вариантах. Без оценки достоверности различий, отметим, что максимальное количество абортивных яиц отмечено при воздействии ионами NH₄⁺.

У периодафний учитывали только рекомендованные методикой показатели (табл. 7).

Таблица 7 – Реакции *C. affinis* на загрязнение вод нитрат-, нитрит- ионами и ионами аммония

Показатели	Вариант / кратность превышения ПДКр.х.						
	Контроль	Нитрат ион (NO ₃ ⁻)		Нитрит ион (NO ₂ ⁻)		Ион аммония (NH ₄ ⁺)	
		5 ПДК	10 ПДК	5 ПДК	10 ПДК	2,5 ПДК	1 ПДК
Смертность, % к контролю**	0	10	0	0	0	10	20
Плодовитость, шт./ 1 самку	25,3±3,4	6,7±2,2*	8,3±3,5*	13,3±5,7*	12,7±5,9*	14,6±4,3*	24,7±8,0

Примечание: ПДКр.х. – предельно допустимая концентрация веществ для воды водных объектов рыбохозяйственного назначения; * - различия достоверны в сравнении с контролем, ** - погрешность в пределах норматива методик [22].

Культура *C. affinis* оказалась чувствительнее ко всем формам азота, в том числе и к ионам аммония. Про наибольший эффект ионов аммония сказано выше. Сравнивая действие ионов аммония при концентрации соответствующей 1 и 2,5 ПДКр.х. следует отметить, что допустимая концентрация действительно не оказывает эффекта по показателю плодовитости, но по смертности взрослых особей достигнут критический предел, предусмотренный для опыта на хроническую токсичность – 20%. Незначительное повышение дозы ионов аммония до 2,5 ПДКрх привело к снижению размножения в 1,7 раза ($p < 0,05$), но смертность *C. affinis* оставалась на уровне случайной – 10%.

При сравнении действия нитрит-ионов и нитрат-ионов на оба тест-организма выявлено, что наибольший угнетающий эффект оказывает нитрат-ион на *C. affinis*. Плодовитость *C. affinis* в ответ на воздействие NO₃⁻ при концентрации соответствующей 5 ПДКр.х. снижается в 3,8 раза, а при 10 ПДКр.х. в 3,1 раза, тогда как при воздействии NO₂⁻ только в 2 раза (без значимых отличий между значениями концентраций).

Анализ полученных результатов, свидетельствует о более высокой чувствительности *C. affinis*, в сравнении с другими тест-объектами, к минеральным формам азота. В научной литературе имеются сведения о целесообразности использования *C. affinis* для контроля азотного загрязнения, что объясняется принадлежностью этих рачков к олиготрофным организмам [188].

Модельные растворы с добавками нелетальных для низших ракообразных доз далее тестировались по экспресс-биотестам (табл. 8, 9).

Таблица 8 – Ответные реакции *E. coli* на минеральные формы азота

Кратность превышения ПДКр.х.	Вариант		
	Нитрат ион (NO ₃ ⁻)	Нитрит ион (NO ₂ ⁻)	Ион аммония (NH ₄ ⁺)
5	(-2,3) ± 1,1 I группа	(-155,2) ± 8,8 I группа	66,1 ± 1,9 III группа
10	(-15,3) ± 5,7 I группа	(-181,3) ± 10,8 I группа	70,9 ± 2,3 III группа

Примечание: обозначение групп токсичности указано в разделе 2.4.4 (табл. 3).

Для бактерий *E. coli* сила воздействия минеральных форм азота возрастает в ряду: (NO₂⁻) < (NO₃⁻) < (NH₄⁺). Причем воздействие нитрат- и нитрит-ионов стимулировало биолюминесценцию бактерий. Такие эффекты крайне сложно интерпретировать при биотестировании нативных сред [153, 168]. Именно поэтому необходимо ориентироваться на ответные реакции нескольких организмов в конкретных биотестах, оперируя фактами о чувствительности каждого из них.

По классификации индексов токсичности для бактерий *E. coli* воздействие нитрит- и нитрат-ионов характеризовалось I группой токсичности (пробы не токсичны), а ионов аммония – III группой токсичности (пробы сильно токсичны).

Как и для других организмов, реакция инфузорий *P. caudatum* на загрязнение водной среды ионами аммония, оказалась наиболее значительной (табл. 9).

Таблица 9 – Ответные реакции *P. caudatum* на минеральные формы азота

Кратность превышения ПДК	Вариант		
	Нитрат ион (NO ₃ ⁻)	Нитрит ион (NO ₂ ⁻)	Ион аммония (NH ₄ ⁺)
5	(-0,21) ± 0,08 I группа	(-0,16) ± 0,05 I группа	0,44 ± 0,02 II группа
10	(-0,29) ± 0,03 I группа	(-0,11) ± 0,04 I группа	0,53 ± 0,03 II группа

Примечание: обозначение групп токсичности указано в разделе 2.4.3 (табл. 2).

Отличительной особенностью инфузорий стало то, что невысокие дозы нитрат- и нитрит-ионов, не летальные для низших ракообразных, оказывали на простейших эффект стимуляции их хемотаксиса. Объяснением этому факту является тяготение инфузорий в естественных местообитаниях к водоёмам с высоким индексом сапробности [69]. Угнетение тест-функции вызывала добавка соли аммония, но реакция оказалась слабее, чем у бактерий *E. coli*: по индексам токсичности модельные пробы относятся ко II группе токсичности из трех возможных – «умеренная степень токсичности».

Дальнейший поиск доз, летальных для низших ракообразных, а также тестирование этих растворов с помощью экспресс-биотестов подтвердил наметившийся ряд чувствительности (табл. 10).

Биотестирование модельных растворов с добавками минеральных форм азота в интервале концентраций от 25 до 100 ПДКр.х. по действующему иону показало, что для низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis* такие дозы являются в большинстве случаев летальными. При содержании в воде нитрат-ионов в концентрации соответствующей 25 ПДКр.х. остались живы только несколько особей *D. magna* (96 часов эксперимента). В остальных опытных вариантах варьировало время наступления 100%-ной гибели рачков, которое закономерно сокращалось в ответ на увеличение концентрации действующих веществ.

Анализ времени гибели ракообразных с учетом полученных данных (табл. 10) подтверждает большую чувствительность *C. affinis* к загрязнению минеральным азотом по сравнению с *D. magna*.

Тест-организмы, используемые в экспресс-биотестах, оказались устойчивее к воздействию минеральных форм азота. Билюминесценция бактерий *E. coli* возрастала в ответ на увеличивающуюся концентрацию нитрат-ионов. При увеличении добавки нитрат-ионов до концентрации соответствующей 150 и 200 ПДКр.х. стимуляция сохранялась. Этот эффект был подтвержден и при моделировании загрязнения дистиллированной воды (в основном эксперименте для всех тест-организмов использовалась артезианская вода питьевого качества). Аналогичное содержание нитрат-ионов вызывало в дистиллированной воде еще более усиленную стимуляцию билюминесценции. Например, индекс токсичности T для варианта 100 ПДКр.х. в дистиллированной воде был равен $(-244,6) \pm 27,7$, а в питьевой воде $(-113,9) \pm 10,3$.

По сравнению с бактериями *E. coli* инфузории оказались чувствительнее к нитрат-ионам. Начиная с концентрации соответствующей 50 ПДКр.х., наблюдался рост положительных индексов T , то есть угнетение хемотаксиса простейших.

**Таблица 10 – Результаты биотестирования природной воды
с добавками минерального азота в интервале концентраций от 25 до 100 ПДКр.х. по действующему иону**

Вариант	Нитрат ион (NO ₃ ⁻), ПДК			Нитрит ион (NO ₂ ⁻), ПДК			Ион аммония (NH ₄ ⁺), 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.)
Биолюми- несценция <i>E. coli</i> / индекс Т, у.е.	0 (-44,5±8,4) I группа	0 (-112,9±12,8) I группа	0 (-113,9±10,3) I группа	7,8±1,6 I группа	8,6±1,7 I группа	13,1±1,5 I группа	60,4 ± 4,0 III группа	69,1 ± 5,3 III группа	60,7 ± 6,6 III группа
Изменение хемотаксиса <i>P. caudatum</i> / индекс Т, у.е.	0 (-0,35±0,15) I группа	0,15±0,05 I группа	0,34±0,08 I группа	0 (-0,40±0,1) I группа	0,1±0,02 I группа	0,20±0,05 I группа	0,61±0,1 II группа	0,75±0,09 III группа	0,77±0,2 III группа

Примечание: * - здесь и далее в таблице в скобках указано время гибели всех подопытных организмов; погрешность в пределах норматива методик [22, 23]; обозначение групп токсичности указано в разделах 2.4.3 (табл. 2) и 2.4.4 (табл. 3).

Реакция на нитрит-ионы у инфузорий и бактерий *E. coli* оказалась схожей. Наблюдался закономерный рост индексов токсичности, однако, модельные пробы с добавками нитрит-ионов в концентрациях соответствующих 25–100 ПДКр.х. относились к I группе токсичности. Дальнейшее увеличение тестируемых концентраций до 150 и 200 ПДКр.х. закономерно увеличило токсичность исследуемых проб для *E. coli* до II группы токсичности ($24,9 \pm 7,1$ и $26,0 \pm 2,5$ соответственно). В биотесте по хемотаксису инфузорий II группа была достигнута только при концентрации соответствующей 200 ПДКр.х. ($0,44 \pm 0,06$).

Максимальное угнетение тест-функций наблюдалось при тестировании растворов с ионами аммония. Основная часть проб была отнесена к III группе токсичности.

В результате двух серий экспериментов, в которых ориентировались, во-первых, на нелетальные дозы для *D. magna*, во-вторых, на летальные для них концентрации было установлено, что биотесты по гибели низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis* чувствительнее, чем экспресс-биотесты по *P. caudatum* и *E. coli*. Ряды информативности испытанных биотестов и другие выявленные закономерности действия минеральных форм азота на гидробионты приведены в заключении к разделу.

Далее эксперименты были продолжены в направлении исследования комплексного воздействия разных ионов минерального азота. Комплексное загрязнение в целом характерно для современного антропогенного воздействия. Однако, именно для минеральных форма азота эта проблема наиболее актуальна, поскольку благодаря реакциям окисления и деятельности бактерий при загрязнении одной формой минерального азота можно ожидать появления в водной среде и других форм.

Моделирование совместного токсического действия азотсодержащих минеральных веществ. В природных и сточных водах в районах промышленных предприятий, животноводческих ферм часто наблюдается совместное присутствие различных минеральных форм азота. В

Кировской области для промышленных предприятий данная проблема свойственна поверхностным водным объектам расположенным в г. Кирово-Чепецке – центре химической промышленности. Сточные воды, хвостохранилища и шламонакопители отходов данных предприятий оказывают влияние на качество подземных и поверхностных вод пойменных озёр и малых рек – притоков реки Вятки [167].

Для определения острого и хронического токсического действия тестируемых веществ готовились модельные растворы нитратов и нитритов, совместно с ионом аммония в концентрациях соответствующих 5 и 10 ПДКр.х. Выбор диапазона анализируемых концентраций для приготовления растворов связан с тем, что такие превышения нормативов встречаются при исследовании поверхностных и подземных водных источников [111, 112, 113].

Эксперименты были проведены по схеме, аналогичной предыдущим исследованиям. Результаты определения интегральной токсичности по гибели и плодовитости *D. magna* и *C. affinis* представлены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11 – Реакции *D. magna* на загрязнение вод комплексом азотсодержащих веществ (экспозиция 24 дня)

Показатели	Вариант / кратность превышения ПДКр.х.				
	Контроль	Нитрат-ион и ион аммония		Нитрит-ион и ион аммония	
		5 ПДК	10 ПДК	5 ПДК	10 ПДК
Смертность** дафний в опыте, в % к контролю	0	40	42,5	100	100
Среднее количество потомства, шт./ 1 самку.	17,1±0,2	31,8±4,1*	48,0±2,4*	36,6±1,5*	0
Абортивные яйца, шт./вариант	0	6	8	10	0
Мертворожденные особи, шт./вариант	0	3	4	5	0

Примечание: * - отличия от контроля достоверны ($p < 0,05$); ** - погрешность в пределах норматива методики [23].

Установлено, что в опыте с нитратами и ионами аммония смертность *D. magna* по истечении 24 суток составила 40–42,5%, тогда как в опыте с нитритами и ионом аммония – 100% по сравнению с контролем. Поскольку факты гибели особей были зафиксированы на 9 сутки (вариант 10 ПДКр.х.) и на 22 сутки (5 ПДКр.х.), то эти пробы следует признать не оказывающими острого токсического действия, но обладающими хроническим токсическим эффектом по показателю смертности взрослых особей более 20%.

Несмотря на установленный уровень смертности рачков, среднее количество потомства в опытных образцах примерно в два раза выше, чем в контроле. Причиной этого может быть повышенная смертность взрослых особей в исследуемых пробах и последовавшее увеличение жизненного пространства, что стимулировало размножение дафний, хотя коррекция объёма кормления была проведена. Влияние плотности посадки дафний на их основные тест-функции показано в наших работах [163, 408].

Наличие эффекта стимуляции плодовитости отличает воздействие комплекса азотсодержащих веществ от влияния растворов с одним действующим ионом. С одной стороны стимуляция в установленных пределах может быть диагностическим признаком такого комплексного загрязнения. С другой стороны, явления стимуляции всегда усложняют интерпретацию результатов, так как содержание органического вещества в пробах, микроэлементов, присутствие в них природных колоний водорослей могут приводить к увеличению потомства тест-организмов.

В этом случае наличие таких патологических отклонений как абортивные яйца и мертворожденная молодежь, отмеченные в опытных образцах, могут помочь в диагностике загрязнения [166, 171].

Для сравнения чувствительности тест-организмов аналогичные опыты были проведены с цериодафниями. В первую очередь установили, что для данных тест-организмов добавки по 5 и 10 ПДКр.х. двух разных форм минерального азота в тестируемую среду являются летальными. Поэтому далее было принято решение тестировать смеси веществ в разбавлении до

концентрации соответствующей 2,5 и 1 ПДКр.х. каждого из действующих ионов. Результаты эксперимента отражены в таблице 12.

Таблица 12 – Реакции *C. affinis* на загрязнение вод комплексом азотсодержащих веществ (экспозиция 12 дней)

Показатели	Вариант / кратность превышения ПДКр.х.				
	Контроль	Нитрат-ион и ион аммония		Нитрит-ион и ион аммония	
		2,5 ПДК	1 ПДК	2,5 ПДК	1 ПДК
Смертность** дафний в опыте, в % к контролю	0	70	20	60	20
Среднее количество потомства, шт./ 1 самку.	14,7±2,9	0	8,1±1,4*	0	6,5±0,9*

Примечание: * - отличия от контроля достоверны ($p < 0,05$); ** - погрешность в пределах норматива методики [22].

Концентрация, соответствующая 2,5 ПДКр.х. по двум действующим ионам, оказалась для цериодафний токсичной как по показателю гибели взрослых особей, так и по угнетению плодовитости. В этих вариантах рачки не смогли оставить потомство. Снижение концентрации до 1 ПДКр.х. позволило 80% особей выжить в обоих тестируемых вариантах, а также оставить потомство. Количество потомства было достоверно ниже, чем в контроле, то есть эффект стимуляции плодовитости комплексом минеральных форм азота у цериодафний не проявился. Это также делает их более предпочтительными тест-организмами для оценки токсичности водных сред, потенциально загрязненных минеральным азотом [178].

Согласно принятой схеме эксперимента, далее тестировались концентрации, оказывающие эффект на низших ракообразных, в биотестах на *P. caudatum* и *E. coli* (табл. 13).

Таблица 13 – Результаты экспресс-биотестов вод, загрязненных комплексом азотсодержащих веществ

Биотест	Вариант							
	Нитрат-ион и ион аммония, ПДКр.х.				Нитрит-ион и ион аммония, ПДКр.х.			
	1	2,5	5	10	1	2,5	5	10
Изменение хемотаксиса <i>P. caudatum</i> / Т, у.е.	0,19±0,07 I группа	0,22±0,05 I группа	0,56±0,10 II группа	0,65±0,12 II группа	0,32±0,09 I группа	0,45±0,11 II группа	0,72±0,2 III группа	0,81±0,15 III группа
Биолюминесценция <i>E. coli</i> / Т, у.е.	0 (-25,8±7,9) I группа	0 (-8,4±1,6) I группа	6,0±8,7 I группа	12,1±1,0 I группа	25,7±5,1 II группа	60,9±9,2 III группа	97,9±0,5 III группа	97,7±0,4 III группа

Примечание: обозначение групп токсичности указано в разделах 2.4.3 (табл. 2) и 2.4.4 (табл. 3).

При воздействии на организмы смеси нитрат-ионов и ионов аммония в биотесте по реакции *E. coli* наблюдали инверсию ответной реакции: концентрации действующих ионов, равные 1 и 2,5 ПДКр.х., оказывали стимулирующий эффект на биолюминесценцию, тогда как повышенные концентрации соответствующие 5 и 10 ПДКр.х. вызвали угнетение свечения бактерий. Однако следует отметить, что инверсия ответных реакций нежелательна, так как усложняет интерпретацию результатов биотестирования. В то же время реакция на аналогичные растворы *P. caudatum* находится в прямой корреляционной зависимости от возрастающих доз ($r=0,92$). Следовательно, по чувствительности к обсуждаемой смеси веществ на первое место необходимо расположить биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum*.

Смесь действующих веществ нитрита натрия и хлорида аммония не вызывала инверсии ответной реакции у *E. coli*. Напротив реакция бактериального теста оказалась более выраженной по сравнению с *P. caudatum*: при добавке данной смеси в концентрации соответствующей 1 ПДКр.х. проба была отнесена ко II группе токсичности, а последующие возрастающие концентрации – к III группе токсичности. Аналогичные растворы в биотесте на инфузориях были отнесены только к I и II группе, поэтому в ряду чувствительности биотестов при данном сочетании веществ биолюминесцентный тест оказывается предпочтительней.

Таким образом, при моделировании загрязнения природной воды питьевого качества минеральными формами азота (ионы аммония, нитрат-ионы, нитрит-ионы) в условиях их отдельного внесения, а также при их совместном присутствии выявлено:

– концентрации соответствующие 5 и 10 ПДКр.х. всех исследуемых форм азота при отдельном внесении не оказывали острого токсического действия на *D. magna*, но достоверно угнетали плодовитость особей спустя 25 дней опыта. Эти же дозы веществ действовали на *C. affinis* сильнее: отмечено угнетение плодовитости *C. affinis* при концентрации NO_3^-

соответствующей 5 ПДКр.х. до 3,8 раз по сравнению с контролем, а влияние ионов аммония при концентрации 5 и 10 ПДКр.х. оказалось для цериодафний летальным;

– в интервале летальных доз по действующему иону аммония (25–100 ПДКр.х.) биотесты по двум видам низших ракообразных ранжировали по времени наступления гибели, которое для *C. affinis* в каждой серии опытов было меньше, чем для *D. magna*. Например, время гибели всех особей *D. magna* при воздействии на них ионов аммония в концентрации соответствующей 25 ПДКр.х. 2 часа, а цериодафний – всего 15 минут;

– для бактерий *E. coli* концентрации нитрат- и нитрит-ионов соответствующие 5 и 10 ПДКр.х. оказывали стимулирующее действие на биолюминесценцию, и только действие ионов аммония значительно угнетало тест-функцию (III группа токсичности). Дальнейшее увеличение тестируемых доз подтвердило, что сила воздействия минеральных форм азота для *E. coli* возрастала в ряду: $\text{NO}_2^- < \text{NO}_3^- < \text{NH}_4^+$;

– реакция инфузорий *P. caudatum* на загрязнение водной среды ионами аммония, так же оказалась наиболее значительной (II группа токсичности при концентрации 5 и 10 ПДКр.х.);

– в итоге при раздельном воздействии минеральных форм азота на гидробионты были построены 2 ряда, отражающих уменьшение чувствительности биотестов. При загрязнении исследуемых проб нитрат- и нитрит-ионами соблюдается ряд:

биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биолюминесцентный тест на *E. coli*;

При загрязнении ионами аммония ряд выглядит следующим образом:

биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum*;

– при исследовании комплексного воздействия нитрит-ионов и ионов аммония, а также нитрат-ионов и ионов аммония основные закономерности

подтвердились с усилением токсичного влияния веществ в смеси. Как и при анализе раздельного действия исследуемых веществ, было составлено два ряда уменьшения чувствительности биотестов. При совместном загрязнении нитрат-ионами и ионами аммония ряд представлен следующим образом:

биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биолюминесцентный тест на *E. coli*.

При совместном загрязнении нитрит-ионами и ионами аммония соблюдается ряд:

биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna* > биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum*.

Таким образом, диагностику загрязнения биогенными элементами, на примере соединений азота, необходимо дополнять методами биотестирования с предварительным выявлением наиболее чувствительных биотестов.

Чувствительность биотестов к минеральным соединениям фосфора

Минеральные соединения фосфора, содержат в своем составе важный биогенный элемент фосфор, необходимый для построения мембран клеток (фосфолипидный слой), регуляции энергетических процессов в клетках (НАДФ), сохранения генетической информации (остаток фосфорной кислоты в ДНК) и многих других процессов. Фосфор вовлекается в биологический круговорот благодаря усвоению его растворенных в почвенном растворе форм (фосфатов и полифосфатов) растениями. Многие почвы средней полосы России нуждаются в дополнительном обогащении данным макроэлементом через внесение фосфорных удобрений [150]. Однако промывной водный режим почв способствует вымыванию фосфатов, которыми насыщаются поверхностные, а в некоторых случаях и подземные воды. Такой процесс приводит к эвтрофикации водоемов – распространенному техногенному воздействию на водные экосистемы.

Кроме данного пути поступления фосфатов в окружающую среду, следует отметить, что в выбросах и сбросах ряда предприятий химической отрасли, в хозяйственно-бытовых сбросах также присутствует минеральный фосфор в различных формах. Например, в Кировской области с 2006 по 2015 гг. действовал объект уничтожения химического оружия «Марадыковский», в перечне выбросов которого на втором месте после сажи находился минеральный техногенный фосфор, в частности пирофосфаты и фосфаты натрия [94, 95, 96, 184].

Источником пирофосфата натрия и его производных являются фосфорсодержащие соединения, например, бладан, хлорофос, применяемые в сельском хозяйстве в качестве пестицидов [64]. В противовес мнению о том, что поступление соединений фосфора антропогенного происхождения не имеет негативных последствий, существует иная позиция. Например, доказано [121], что фосфат-ионы обладают высокой лигандной активностью. Особенно сильными комплексообразователями являются техногенные фосфорные соединения, в том числе пирофосфаты. Это определяет педохимическую судьбу не только самого фосфора, но и других почвенных элементов.

С целью выявления чувствительности биотестов к потенциальному загрязнению окружающей среды минеральным фосфором нами проведены исследования в районе действующего около 10 лет объекта уничтожения фосфорсодержащих отравляющих веществ.

Моделирование фосфатного загрязнения водной среды. В качестве модельных токсикантов были выбраны $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (пирофосфат натрия) и $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (фосфат натрия). Диапазон исследуемых концентраций выбранных веществ для каждого биотеста, указанных в алгоритме установления их чувствительности, определяли в предварительном эксперименте. При этом исходили из условия, что подавление тест-функции организмов, должно быть значимой величиной, то есть отличаться от 0 и 100%.

Поскольку параллельно с определением чувствительности биотестов, решалась задача сравнения токсичности фосфатов и пирофосфатов, то модельные растворы содержали одинаковое количество фосфат- и пирофосфат-ионов. Массовые концентрации веществ приведены в Приложении 3.

Контролем служила артезианская вода питьевого качества (химический состав см. Приложения 1 и 2). При использовании питьевой воды учитывалось естественное содержание фосфатов. Проводилось тестирование свежеприготовленных растворов, а также растворов через 48 часов и через 96 часов после их приготовления. Это позволило выявить степень снижения токсичности солей вследствие их гидролиза в растворе.

Для низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis* действующие концентрации пирофосфат- и фосфат-ионов оказались достаточно высокими. Острая токсичность для *D. magna* по показателю гибели более 50% особей наблюдалась при добавке фосфат-ионов в количестве $5,3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, что соответствует дозе 2 г/дм³ фосфата натрия (Приложение 3). В опыте с пирофосфатами летальность достигалась при еще большей дозе (табл. 14).

Таблица 14 – Исследование минеральных форм фосфора в биотестах с низшими ракообразными

Концентрация токсиканта, моль/дм ³	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 [22, 23].

Данные, полученные в эксперименте с ракообразными, свидетельствуют о большей чувствительности *C. affinis* по сравнению с *D. magna* к минеральным формам фосфора: гибель цериодафний наблюдается, начиная с концентрации пирофосфата натрия $1,3 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ (по пирофосфат аниону), дозы в $4,0 \cdot 10^{-3}$ и $5,3 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ оказываются летальными. В опытах с низшими ракообразными дозы выше $10,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ не тестировали, так как за счет насыщения раствора пирофосфатом натрия происходит смещение рН среды в щелочную сторону, выводя уровень рН из оптимального для тест-организмов.

Далее согласно апробируемому алгоритму определения чувствительности биотестов нелетальные и летальные дозы тестируемых веществ испытывались с помощью экспресс-биотестов. Первый тест – по угнетению хемотаксиса *P. caudatum* – показал, что минимальные из исследованных на низших ракообразных дозы минерального фосфора приводят к максимальному угнетению инфузорий (до III группы токсичности). По этой причине при дальнейшем тестировании концентрации пирофосфата и фосфатата натрия снижали (табл. 15), соотношение массовых концентраций и количества вещества для фосфат-анионов и пирофосфат-анионов представлено в Приложении 4.

При биотестировании свежеприготовленных растворов выявлено, что практически во всем диапазоне действующих доз индексы токсичности для пирофосфата натрия достоверно выше аналогичных показателей для растворов фосфатов (табл. 15). Только при концентрациях веществ, вызывающих угнетение тест-функции выше 80% ($1,1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³), различия между действием исследуемых веществ становятся недостоверными ($p < 0,05$). Это явление может быть связано с осмосом – миграцией воды из клеток в окружающий раствор, что наблюдается при достаточно высоких концентрациях солей в тестируемой среде [125].

**Таблица 15 – Оценка токсичности растворов
пирофосфата и фосфата натрия по угнетению хемотаксиса *P. caudatum***

Концентрация действующих анионов, моль/дм ³	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
1,1·10 ⁻³	0,89±0,02 III группа	0,85±0,03 III группа	0,67±0,07 II группа	0,80±0,05 III группа	0,47±0,06 II группа	0,78±0,04 III группа
1,0·10 ⁻³	0,71±0,03 III группа	0,58±0,09 III группа	0,49±0,05 II группа	0,55±0,02 II группа	0,38±0,05 II группа	0,52±0,02 II группа
0,8·10 ⁻³	0,53±0,06 II группа	0,31±0,05 I группа	0,40±0,03 II группа	0,31±0,04 I группа	0,30±0,04 I группа	0,25±0,05 I группа
0,7·10 ⁻³	0,44±0,06 II группа	0,27±0,05 I группа	0,31±0,05 I группа	0,25±0,02 I группа	0,26±0,04 I группа	0,23±0,03 I группа
0,69·10 ⁻³	0,40±0,08 II группа	0,22±0,02 I группа	0,27±0,05 I группа	0,18±0,01 I группа	0,23±0,03 I группа	0,10±0,01 I группа
0,6·10 ⁻³	0,34±0,05 I группа	0,20±0,02 I группа	0,21±0,02 I группа	0,16±0,01 I группа	0,19±0,04 I группа	0,10±0,01 I группа
0,55·10 ⁻³	0,32±0,05 I группа	0,16±0,02 I группа	0,19±0,01 I группа	0,11±0,02 I группа	0,15±0,03 I группа	0 I группа
0,4·10 ⁻³	0,30±0,04 I группа	0,12±0,01 I группа	0,17±0,01 I группа	0 I группа	0,07±0,01 I группа	0 I группа
0,3·10 ⁻³	0,29±0,04 I группа	0 I группа	0,16±0,01 I группа	0 I группа	0 I группа	0 I группа
Контроль	0 I группа	0 I группа	0 I группа	0 I группа	0 I группа	0 I группа

Примечание: обозначение групп токсичности указано в разделе 2.4.3 (табл. 2).

При биотестировании через 48 и 96 часов индексы токсичности значительно уменьшаются за счет гидролиза исходных солей [118]. Следовательно, процесс гидролиза минеральных фосфорных соединений приводит к снижению их негативного влияния на живые организмы. В опыте с помощью *P. caudatum* показано, что токсичность растворов пирофосфата натрия снижается через 48 часов в 1,3–1,8 раз, через 96 часов сохраняется та же тенденция. Уменьшение значений индекса Т растворов фосфата натрия при тех же условиях менее выражено.

С помощью *E. coli* исследовались растворы с концентрацией действующего вещества на два порядка меньше, чем при тестировании на инфузориях, так как в экспериментах с вышеприведенными дозами наблюдалось 100%-ное угнетение билюминесценции бактерий. Данный факт позволил в дальнейшем расположить бактерий *E. coli* на первом месте

по чувствительности к минеральным формам фосфора. Соотношение массовых концентраций и количества вещества фосфат-анионов и пирофосфат-анионов, используемых в экспериментах с *E. coli* приведены в Приложении 4.

Результаты биотестирования растворов с добавками действующих доз пирофосфата и фосфата натрия представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Оценка уровня токсичности растворов пирофосфата и фосфата натрия для *E. coli*

Концентрация действующих анионов, моль/дм ³	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
$5,3 \cdot 10^{-5}$	41,3±8,1 III группа	25,3±4,9 II группа	18,7±3,7 I группа	13,4±2,6 I группа	14,7±2,9 I группа	13,5±2,6 I группа
$5,0 \cdot 10^{-5}$	38,7±7,6 II группа	22,5±4,4 II группа	15,6±3,1 I группа	11,9±2,4 I группа	13,4±2,6 I группа	11,5±2,3 I группа
$4,7 \cdot 10^{-5}$	35,6±6,9 II группа	19,8±3,9 I группа	12,0±2,4 I группа	9,4±1,8 I группа	11,1±2,2 I группа	9,8±1,9 I группа
$4,5 \cdot 10^{-5}$	32,5±6,4 II группа	17,6±3,5 I группа	9,3±1,8 I группа	7,0±1,4 I группа	9,2±1,8 I группа	6,8±1,3 I группа
$4,2 \cdot 10^{-5}$	29,1±5,7 II группа	15,5±3,0 I группа	7,5±1,5 I группа	5,7±1,1 I группа	6,3±1,1 I группа	6,1±1,2 I группа
$3,9 \cdot 10^{-5}$	26,9±5,3 II группа	12,4±2,4 I группа	5,8±1,1 I группа	3,1±0,6 I группа	4,2±0,8 I группа	3,2±0,6 I группа
$3,7 \cdot 10^{-5}$	23,8±4,6 II группа	10,5±2,1 I группа	3,4±0,7 I группа	1,2±0,2 I группа	1,9±0,4 I группа	1,1±0,2 I группа
$3,4 \cdot 10^{-5}$	21,1±4,1 II группа	9,1±1,8 I группа	1,4±0,3 I группа	0,0 I группа	0,9±0,2 I группа	0,0 I группа
$3,2 \cdot 10^{-5}$	17,9±3,5 I группа	9,3±1,6 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа
$2,9 \cdot 10^{-5}$	15,7±3,1 I группа	7,1±1,4 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа
$2,6 \cdot 10^{-5}$	13,8±2,7 I группа	6,1±1,2 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа	0,0 I группа

Примечание: обозначение групп токсичности указано в разделе 2.4.4 (табл. 3).

Полученные результаты подтверждают тот факт, что вещества в малых концентрациях гидролизуются быстрее, чем в более высоких. Основное снижение токсичности для бактериальной тест-системы произошло через 48 часов после приготовления растворов. Индексы Т для растворов фосфата через 96 часов не имеют достоверных отличий от значений, полученных

через 48 часов, тогда как токсичность растворов пирофосфата натрия продолжает достоверно снижаться. Это говорит о том, что уже через 48 часов процесс гидролиза фосфата натрия практически подошел к концу, а гидролиз пирофосфата продолжается. Кинетическая устойчивость пирофосфата натрия (в сравнении с фосфатом) по отношению к гидролитическому распаду способствует проявлению его токсических свойств в окружающей среде.

Полученные нами данные об угнетении функций лабораторных тест-организмов пирофосфатами согласуются с результатами полученными авторами для высших растений. В работе [219] было показано, что водные растворы пирофосфата натрия вызывали неспецифические стрессорные ответные реакции растений ячменя: активацию пероксидаз и процессов перекисного окисления липидов, накопление антоцианов, возрастание выхода электролитов из корней. При воздействии техногенного фосфора на низшие почвенные растения происходит изменение структуры естественного альгоценоза [50, 96, 116].

Серия экспериментов по моделированию загрязнения природной воды минеральным фосфором, позволяет построить ряд чувствительности оцениваемых нами биотестов (от наиболее чувствительных к наименее): биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*.

Обобщение других закономерностей, дополненных по результатам полевых экспериментов, представлено в заключении к разделу.

Моделирование загрязнения почвы техногенными выбросами минерального фосфора. В опытах с водными растворами минеральных соединений фосфора было определено, что пирофосфат натрия обладает большей токсичностью, особенно в отношении микроорганизмов. В аэрозольных выбросах объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» техногенный фосфор присутствовал именно в форме пирофосфатов [43]. Эти причины сформировали необходимость моделирования воздействия пирофосфата натрия на почву с последующим

подтверждением ряда чувствительности биотестов, установленного на водных средах.

Для решения этой задачи, был заложен микроделяночный полевой опыт на трёх площадках с типичными для зоны воздействия объекта почвами. Опытная площадка с подзолистыми песчаными почвами находилась на расстоянии 1,5 км до объекта «Марадыковский» и представляла собой лесной фитоценоз (сосновый лес). Площадка с дерново-подзолистыми супесчаными почвами была удалена от объекта на 2,8 км, представляла суходольный луг. Опытная площадка с аллювиальными среднесуглинистыми почвами также располагалась на луговом участке, до объекта уничтожения химического оружия было 3,5 км [96, 173]. Внешний вид опытных площадей представлен на фото в Приложении 5.

Выбранные нами почвы свойственны для подзоны средней и южной тайги. Например, в Кировской области подзолы занимают 35% территории края, а дерново-подзолистые – 45%. Пойменные почвы (аллювиальные) располагаются по долинам рек – 5,6% площади области [240, 241].

Доза внесения пирофосфата натрия соответствовала уровню предельного выпадения этого вещества на поверхность почвы, который рассчитывался исходя из предположения, что весь фосфор, входящий в состав ФОВ на объекте уничтожения химического оружия «Марадыковский», будет при сжигании продуктов детоксикации выброшен в атмосферу в форме пирофосфата натрия. Расчет производился при помощи компьютерной программы, разработанной на основе работы [57] с учетом розы ветров, расстояния и направления от источника выброса до площадки. В итоге расчетная доза предельного выпадения (ПВ) пирофосфата натрия на почву составила 5,0 г/м².

Опыт включал 3 варианта: контроль, внесение 1 ПВ и 10 ПВ пирофосфата натрия. Контролем служили пробы почв с делянок без внесения пирофосфата. Размещение вариантов в опыте систематическое. Опыт выполнен в четырёхкратной повторности, заложен в конце мая 2007

г. Почва находилась под естественной растительностью, скошенной только непосредственно при закладке опыта [158, 173].

Смешанные образцы почвы с опытных участков отбирались согласно основным генетическим горизонтам, свойственным каждому типу исследуемых почв. На площадке с подзолистой почвой пробы отбирались по трем горизонтам почвенного профиля: A_0 – лесная подстилка мощностью 2–3 см, A_1 – грубогумусовый горизонт мощностью 3 см, A_2 – подзолистый горизонт мощностью до 10 см. На площадках, представляющих дерново-подзолистые и аллювиальные почвы для исследования были отобраны образцы двух почвенных горизонтов. A_d (A_1) – мощностью 5–7 см, A_2 – мощностью 10–15 см.

Пробоотбор образцов почвы производили через 10 и 90 дней после внесения поллютанта. После пробоподготовки проводили оценку чувствительности четырех оцениваемых биотестов.

В результате проведенных исследований подтвердилось, что биотесты по гибели *D. magna* и *C. affinis* имеют наименьшую чувствительность к пирофосфату натрия. Отклонения от контроля обнаружены только в пробах с лесного участка (подзолистая почва): в горизонте A_0 показатель погибших особей *D. magna* составил 30%, в горизонте A_1 – $23,3 \pm 9,3\%$. В вытяжках из образца подзолистой почвы, горизонт A_0 , наблюдалась также гибель цериодафний (30%). Согласно используемым методикам, данные пробы не оказывают острого токсического действия, однако не могут считаться безвредными. Зафиксированную смертность ракообразных объясняем косвенным действием пирофосфата натрия. Вещество смещает уровень pH в щелочную сторону, за счет чего часть органического вещества перешло в водную вытяжку, которая имела за счет этого насыщенный коричневый цвет. В процессе опыта органическое вещество окислялось, в результате чего уровень растворенного кислорода к концу опыта снижался до критического для гидробионтов уровня ($5,5$ – 6 мг/дм³).

В то же время экспресс-биотесты с использованием *P. caudatum* и бактерий *E. coli* показали высокую чувствительность к исследуемому загрязнению. Результаты биотестирования представлены ниже (табл.17, 18).

Таблица 17 – Оценка уровня токсичности почвы при загрязнении пирофосфатом натрия в биотесте по хемотаксису *P. caudatum*

Вариант		Значения индекса токсичности Т в исследуемых образцах, у.е.		
		Контроль	1 ПВ	10 ПВ
Подзолистая почва	A ₀	0,15±0,04 ¹	0,26±0,07 ¹	0,65±0,04 ²
	A ₁	0,14±0,02 ¹	0,23±0,01 ¹	0,36±0,12 ¹
	A ₂	0,12±0,02 ¹	0,21±0,02 ¹	0,31±0,08 ¹
Дерново-подзолистая	A ₁	0,13±0,08 ¹	0,11±0,05 ¹	0,41±0,05 ²
	A ₂	0,08±0,01 ¹	0,28±0,02 ¹	0,44±0,06 ²
Аллювиальная почва	A ₁	0,17±0,02 ¹	0,37±0,09 ¹	0,44±0,06 ²
	A ₂	0,09±0,01 ¹	0,17±0,04 ¹	0,25±0,06 ¹

Примечание: ¹ – группа I, допустимая степень токсичности; ² – группа II, умеренная степень токсичности.

Почва без внесения исследуемого загрязняющего вещества на всех опытных площадках оказалась не токсичной как в биотесте по изменению хемотаксиса *P. caudatum*, так и угнетению биолюминесценции бактерий *E. coli*.

Биотестирование водных вытяжек из почвы (*P. caudatum*), отобранной на делянках с внесением 1 расчетной дозы пирофосфата натрия показало, что все пробы обладают умеренной степенью токсичности. Однако значения индекса токсичности заметно возросли по сравнению с контрольными вариантами. Наибольшее увеличение индекса Т отмечалось в горизонте A₂ дерново-подзолистой почвы – в 3,5 раза по сравнению с контролем. В остальных образцах токсичность по сравнению с пробами без внесения ЗВ увеличивалась в 1,7–2,2 раза, кроме образца горизонта A₂ аллювиальной почвы, где значимого изменения токсичности не отмечалось. Это можно объяснить высокой сорбционной способностью горизонта A₁ аллювиальной почвы за счет преобладания глинистой фракции в гранулометрическом

составе и повышенного содержания оксидов железа и алюминия, способных образовывать комплексы со многими соединениями [240, 279].

Бактерии *E. coli* оказались чувствительнее низших ракообразных и простейших *P. caudatum* к пирофосфату натрия (табл. 18).

Таблица 18 – Оценка уровня токсичности почвы при её загрязнении пирофосфатом натрия по снижению биолюминесценции *E. coli*

Вариант		Значения индекса токсичности Т в исследуемых образцах, у.е.		
		Контроль	1 ПВ	10 ПВ
Подзолистая почва	A ₀	20,5±2,4 ¹	55,2±10,8 ²	64,0±12,5 ³
	A ₁	19,7±3,7 ¹	54,6±10,7 ²	55,6±10,9 ³
	A ₂	4,7±0,9 ¹	29,9±5,9 ²	48,3±9,5 ³
Дерново-подзолистая	A ₁	1,8±0,4 ¹	16,5±3,2 ¹	30,9±6,0 ²
	A ₂	1,6±0,3 ¹	25,9±5,1 ²	42,0±8,0 ²
Аллювиальная почва	A ₁	16,6±3,2 ¹	30,5±5,9 ²	30,5±5,9 ²
	A ₂	10,3±1,5 ¹	33,9±6,6 ²	41,3±8,1 ²

Примечание: ¹ – группа I, проба не токсична; ² – группа II, проба средне токсична; ³ – группа III, проба обладает высокой токсичностью.

Пробы с делянок, загрязненных одной расчетной дозой пирофосфата (1 ПВ), для *E. coli* обладают средней степенью токсичности, кроме одного варианта (дерново-подзолистая почва, горизонт A₁), см. табл. 18. Наибольшее увеличение токсичности (в 16 раз) по сравнению с контролем отмечалось на площадке, представляющей дерново-подзолистую почву, в горизонте A₂. Это свидетельствует о низкой буферной ёмкости данной почвы: загрязнитель за 10 дней экспозиции проник в нижележащие почвенные горизонты, что отразилось в большей токсичности горизонта A₂ по сравнению с горизонтом A₁.

При внесении 10 расчетных доз (10 ПВ) пирофосфата натрия значения индекса токсичности в биотесте по *E. coli* и *P. caudatum* значительно отличались от контроля (табл. 17, 18).

По хемотаксической реакции инфузорий нами выявлено увеличение токсичности почвы в 2,6–5,5 раз по сравнению с контрольными вариантами. Наибольшее отклонение индекса Т от контроля наблюдалось при

тестировании образцов дерново-подзолистой почвы, взятых с горизонта A_2 . Тестирование проб подзолистой почвы выявило, что из трех исследуемых горизонтов после загрязнения наиболее токсичной стала лесная подстилка (A_0). Можно сказать, что это явление закономерно, так как наибольшей сорбционной способностью в профиле подзолистых почв обладают верхние горизонты [191].

Тестирование проб аллювиальной почвы после внесения 10 расчетных доз исследуемого вещества выявило большее увеличение индекса токсичности в горизонте A_2 (в 2 раза), чем в горизонте A_1 . При внесении 1 расчетной дозы наблюдалась противоположная картина, что также можно объяснить сорбционными свойствами изучаемой почвы: насыщение ионообменного комплекса почвы даёт возможность пиррофосфату натрия двигаться вниз по почвенному профилю [240].

Результаты тестирования проб с использованием бактерий согласуются с данными, полученными при помощи инфузорий. Горизонт A_2 дерново-подзолистой почвы также оказался наиболее токсичным из всех образцов: индекс Т в варианте с загрязнением 10 расчетными дозами (10 ПВ) равен 42 у.е. против 1,8 у.е. в контрольном варианте.

Аллювиальная почва также проявила в горизонте A_2 большую токсичность по сравнению с пробой горизонта A_1 . Как и при тестировании на инфузориях эта разница составила около 2 раз.

Следует отметить, что угнетение биолюминесценции бактерий под действием вытяжек из почв, загрязненных пиррофосфатом натрия, оказалось значительно сильнее, чем воздействие тех же проб на хемотаксическую реакцию инфузорий. К примеру, пробы с внесением 10 расчетных доз вещества обладали для *E. coli* средней и высокой степенью токсичности. Тем не менее, корреляция между результатами, полученными по этим методикам, оказалась высокой: коэффициент $r=+0,72$.

Исходя из проанализированных данных, можно сделать вывод о том, что из всех тестируемых проб наибольшей токсичностью по сравнению с

контрольными вариантами обладали образцы горизонта А₂ дерново-подзолистой почвы. Это связано с тем, что данному опытному участку присущ легкий механический состав почвы. Как известно, бедность тонкодисперсными механическими элементами (физическая глина и ил) значительно снижает сорбционные свойства почвы [279]. В условиях промывного режима внесенный нами токсикант проникал вглубь почвенного профиля.

Таким образом, в модельных экспериментах на водных средах, а также при полевом моделировании воздействия минерального фосфора на типичные почвы подзоны средней тайги установлен ряд чувствительности биотестов к техногенным фосфатам и пирофосфатам:

биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*.

Показано, что пирофосфат натрия как специфический техногенный поллютант, несмотря на способность довольно быстро гидролизироваться до фосфат-ионов, согласно проведенным биотестам способен оказывать более значительное негативное действие на живые организмы, чем фосфаты в тех же мольных количествах. Среди почв, характерных для подзоны средней тайги, дерново-подзолистые супесчаные являются наименее устойчивыми к загрязнению техногенным фосфором вследствие низкой буферности. Это качество способствует проникновению поллютанта вниз по почвенному профилю и создает возможность загрязнения подземных вод. Наиболее устойчивыми к техногенному минеральному фосфору можно назвать аллювиальные среднесуглинистые почвы;

Представленные исследования воздействия минеральных форм азота и фосфора дополняют новыми фактами научное направление о воздействии нестойких загрязняющих веществ, содержащих биогенные элементы, на компоненты экосистем, включая биоту.

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

Алгоритм определения чувствительности биотестов был успешно апробирован на нескольких минеральных веществах. Дальнейшая работа с органическими веществами, результаты которой представлены в этом разделе, всегда подчинялась дополнительным научно-практическим задачам: определению степени безопасности материалов, поиску лучших рецептур органических композиций, исследованию эффектов (в том числе положительных) органических веществ. При этом, предложенная последовательность определения чувствительности биотестов выполняется и в данной серии экспериментов.

Чувствительность биотестов к гербицидам

В Федеральном законе РФ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами» [8] определено, что пестициды – это химические или биологические препараты, используемые для борьбы с вредителями и болезнями растений, сорными растениями, вредителями хранящейся сельскохозяйственной продукции, бытовыми вредителями и внешними паразитами животных, а также для регулирования роста растений, предуборочного удаления листьев (дефолианты), предуборочного подсушивания растений (десиканты). Для сельского хозяйства пестициды, как и удобрения, являются неотъемлемой частью процесса выращивания растительной продукции. Современные препараты чаще всего имеют относительно невысокий класс опасности для окружающей среды (3 или 4), при этом оказывают искомое действие в низких дозах, а также разрушаются под воздействием естественных факторов (света, влажности, температуры).

Одними из наиболее востребованных классов пестицидов, применяемых во всех видах растениеводства, являются гербициды –

препараты для уничтожения сорных растений. Современные гербициды, как заявляют производители, не оказывают губительного действия на насекомых, например, пчел, а также на другие виды животных, то есть действуют избирательно на растения. Тем не менее, существует опасность негативного действия пестицидов на живых организмов агроэкосистемы, например, педобионтов или гидробионтов ближайших водоёмов [164, 231, 235]. Эта проблема обсуждается в отношении пресноводных экосистем различных стран [287, 311, 316].

В этой части работы нами оценивалось действие трех гербицидных препаратов на бактерий, простейших, низших ракообразных, а также решалась задача по выявлению рядов чувствительности аттестованных биотестов к данным препаратам. Основные характеристики гербицидов приведены в таблице 19.

Таблица 19 – Характеристика исследованных гербицидов

Характеристика препарата	Гольф ВК	Актеон	Родимич
Действующее вещество	Имазетапир $C_{15}H_{19}N_3O_3$ (Имидазолиноны)	Клопиралид + пикорам (производные пиридина)	Имазамокс $C_{15}H_{19}N_3O_4$ (Имидазолиноны)
Препаративная форма	Водорастворимый концентрат	Водный раствор	Водный раствор
Содержание действующего вещества, г/л	100	267 + 67	40
Механизм действия	Ингибирование синтеза белка в чувствительных растениях, что приводит к замедлению и прекращению роста их клеток.	Замещение натуральных гормонов растения, нарушают процессы дыхания клеток и блокируют точки роста тканей меристем, что приводит к значительным нарушениям ростовых процессов в растениях и их гибели	Подавление образования незаменимых аминокислот валина, лейцина и изолейцина, нарушение синтеза белка и нуклеиновых кислот. В результате прекращается деление клеток и чувствительные растения отмирают

Продолжение таблицы 19			
Классы опасности	3/3	3/3	3/3
Регистрационный номер	042(275)-03-737-1	042(275)-03-823-1	297(042)-03-1240-1
Регистрант	ООО "Форвард", ООО "Шанс", ООО "АГРОДИМ" (Россия)	ООО "Форвард", ООО "АГРОДИМ" (Россия)	ООО "Форвард" ООО "Франдеса" (Республика Беларусь)
Дата окончания срока регистрации	13.06.2023	27.10.2025	26.09.2026
Преимущества для сельского хозяйства	- Обладает высокой эффективностью как при внесении в почву, так и по вегетирующим растениям; - одна обработка обеспечивает эффективную защиту посевов в течение всего вегетационного периода	- Эффективная защита посевов от проблемных сорняков, в том числе подмаренника цепкого в течение всего вегетационного периода; - широкий диапазон сроков применения (вплоть до появления цветочных бутонов); - уничтожает не только надземные части, но и корневую систему многолетних сорняков, включая почки возобновления и корневые отпрыски; - не снижает эффективности даже в неблагоприятных условиях среды	- Эффективно уничтожает широкий спектр однолетних злаковых и двудольных сорняков, а также некоторых многолетних; - сдерживает «вторую волну» сорняков за счет продолжительного экранирующего действия.

В представленной выше таблице отражено, что выбранные препараты содержат водорастворимые гербициды, применение которых рекомендовано путем приготовления водного рабочего раствора. Используя добавки возрастающих доз препаратов (в расчете на действующие вещества), мы моделировали тестируемые растворы для определения чувствительности различных биотестов. В соответствии с разработанным алгоритмом в первую очередь были установлены нелетальные и летальные дозы гербицидов по базовому биотесту с определением смертности *D. magna*. Параллельно

определили чувствительность *C. affinis* к модельным водным растворам тестируемых веществ (табл. 20).

Таблица 20 – Результаты определения острого токсического действия гербицидов в биотестах по смертности *D. magna* и *C. affinis*

Гербицид	Доза		Смертность ракообразных, %	
	мг/дм ³	Кратность превышения ПДК	<i>D. magna</i>	<i>C. affinis</i>
Имазетапир («Гольф ВК»)	0,5	50	0	25±10
	1,5	150	0	100
	3	300	100	100
Клопиралид + пикорам («Актеон»)	2	50	0	40±16
	6	150	46,6±18,4	100
	12	300	100	100
Имазамокс («Родимич»)	0,2	50	0	65±26
	0,6	150	63,3±25,3	100
	1,2	300	100	100

Примечание: погрешность в пределах норматива методик [22, 23].

Чувствительность низших ракообразных к тестируемым веществам оказалась достаточно низкой, что характерно для современных гербицидов, а также является положительным фактом для их активного использования в сельском хозяйстве. Полная гибель *D. magna* была выявлена только в ответ на добавки гербицидов, соответствующие 300 ПДК. Цериодафнии, в силу биологических особенностей, являются тест-организмами более чувствительными к органическому загрязнению, поэтому летальные эффекты проявились в ответ на меньшие дозы. Несмотря на низкую чувствительность дафний и цериодафний к гербицидам, удалось определить, что их опасность для данных гидробионтов увеличивается в ряду имазетапир < клопиралид + пикорам < имазамокс.

Далее был реализован второй этап алгоритма определения чувствительности биотестов. Модельные растворы были протестированы с помощью еще двух биотестов, используемых во всех исследованиях работы. При первичном тестировании выявлено, что экспресс-биотесты по ответным реакциям *P. caudatum* и *E. coli* реагируют на действие гербицидов гораздо

сильнее, чем испытанные культуры дафний. Дозы веществ, выше 50 ПДК максимально угнетали тест-функции бактерий и простейших, поэтому для сравнения их чувствительности к данному виду загрязнения далее испытывались добавки 1, 10 и 50 ПДК действующих веществ (табл. 21).

Таблица 21 – Ответные реакции *P. caudatum* и *E. coli* на гербициды

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 группа	6,5±1,5	I группа
	10	0,68±0,06	II группа	8,4±1,6	I группа
	50	0,94±0,01	III группа	32,5±0,9	II группа
Клопиралид + пикорам («Актеон»)	1	0,52±0,05	II группа	0 (-56,9±13,7)	I группа
	10	0,60±0,07	II группа	0 (-23,2±6,0)	I группа
	50	0,94±0,02	III группа	41,2±3,1	III группа
Имазамокс («Родимич»)	1	0,29±0,05	I группа	0 (-19,9±4,5)	I группа
	10	0,04±0,01	I группа	0 (-12,7±6,5)	I группа
	50	0,92±0,02	III группа	20,4±6,5	II группа

Примечание: обозначение групп токсичности указано таблице 2 и таблице 3.

В тестируемом диапазоне концентраций для большинства проб наблюдалось закономерное увеличение индексов токсичности в ответ на повышение дозы действующего вещества. Только при испытании растворов с добавками гербицида «Родимич» при концентрации соответствующей 1 и 10 ПДК наблюдали снижение токсичности от 1 к 10 ПДК. Это может быть связано как с нелинейными токсикологическими эффектами [306, 326, 347], так и с временной стимуляцией двигательной активности инфузорий при добавке относительно невысокой дозы в 10 ПДК.

В целом инфузории *P. caudatum* оказались более чувствительными тест-организмами к гербицидному загрязнению, чем бактерии *E. coli*. Добавки всех веществ в концентрациях соответствующих 50 ПДК, приводили к угнетению хемотаксиса инфузорий до уровня III группы токсичности (высокая степень токсичности). Аналогичные дозы токсикантов

в биотесте по снижению биолюминесценции *E. coli* привели к подобной характеристике только в варианте с препаратом, содержащим клопиралид и пикорам («Актеон»). Однако, условный порог между II и III группами токсичности ($T=20,0$ у.е.) был преодолен в незначительной мере. Также результаты, полученные в биолюминесцентном тесте для вариантов клопиралид + пикорам («Актеон») и имазамокс («Родимич») 1 и 10 ПДК, свидетельствуют о стимуляции оцениваемой тест-функции. В тесте с инфузориями для всех анализируемых вариантов наблюдали угнетение ответной реакции организмов.

Отметим, что наблюдались отличия и в степени воздействия тестируемых гербицидов на низших ракообразных и микроорганизмов. Для *P. caudatum* и *E. coli* справедлив ряд возрастания опасности действующих веществ веществ в препаратах: имазамокс («Родимич») < имазетапир («Гольф ВК») < клопиралид + пикорам («Актеон»).

Дополнительно устанавливали хронические токсические эффекты нелетальных доз гербицидов для *D. magna* (табл. 22).

Таблица 22 – Влияние гербицидов на тест-функции *D. magna*

Вариант	Доза		Показатели			
			Появление выводковых камер, сутки	Появление первой молоди, сутки	Плодовитость за 24 дня, шт./взрослую самку	Смертность** в конце эксперимента, %
	Кратность превышения ПДК	мг/дм ³				
Контроль	0	0	7	9	12,4±1,2	0
Имазетапир («Гольф ВК»)	1	0,04	7	10	9,0±1,7*	3,3
	10	0,4	8	10	8,1±0,5*	0
	50	2	8	11	10,7±1,0	0
Клопиралид + пикорам («Актеон»)	1	0,004	9	11	6,8±0,1*	3,3
	10	0,04	9	11	10,3±1,8	6,7
	50	0,2	9	11	7,1±0,8*	0
Имазамокс («Родимич»)	1	0,04	9	11	9,0±0,9*	0
	10	0,4	9	11	11,4±2,1	16,7
	50	2	9	11	9,3±0,3*	6,7

Примечание: * - отличия от контрольных значений достоверны ($p<0,05$); ** - погрешность в пределах норматива методики [23].

Воздействие нелетальных доз гербицидных препаратов начало проявляться с момента созревания рачков: большинство модельных проб вызывали задержку появления выводковых камер у дафний, а затем и появление первой молодежи. Обычно такое действие веществ приводит впоследствии к отклонению плодовитости от контрольных значений. Эта гипотеза подтвердилась. В конце эксперимента удельная плодовитость на 1 подопытную самку была снижена во всех пробах с добавками. Также была отмечена незначительная гибель взрослых особей на 24 день эксперимента, не превышающая критических 20% по сравнению с контрольными данными.

Отметим, что в большинстве вариантов хроническое действие доз гербицидов в диапазоне от 1 до 50 ПДК значимо не различается между собой. Это косвенно свидетельствует о том, что обнаруженное воздействие произвели не только добавленные в воду вещества, но и продукты их деструкции, что еще предстоит изучить.

Полученные результаты дополняют научный банк данных о влиянии современных гербицидов на организмы различной систематики. В исследовании [259] авторы также пришли к заключению, что действующие на гидробионтов дозы во много раз выше установленных нормативов. Отмечена высокая чувствительность элодеи *Elodea canadensis*: сублетальное действие имазетапира по замедлению роста боковых и основного побегов проявилось в ответ на концентрацию 10 мг/дм³ и выше. В отличие от наших данных, авторы работы [259] приводят сведения о хроническом токсическом действии имазетапира для *D. magna*, начиная с дозы 300 мг/дм³. Можно предположить, что несогласованность данных вызвана различиями в химическом составе воды для моделирования загрязнения [164].

За рубежом также ведется поиск гидробионтов, способных сигнализировать о пестицидных, в том числе гербицидных угрозах водным объектам. На примере нильской тилляпии *Oreochromis niloticus* показана опасность производных пиридина, которые в нашем исследовании представлены смесью клопиралида и пикорама, для ихтиофауны даже при

применении в соответствии рекомендуемыми нормами [281]. Макрофиты *Lemna minor* и *Azolla caroliniana* предлагаются в качестве биоиндикаторов гербицидного загрязнения водных объектов. Ряска *L. minor* оказалась чувствительнее к атразину, смеси бентазона и имазамокса, кломазону. Действующие дозы для ряски лежали в диапазоне 0,1–118 мг/дм³ для разных веществ [360]. Чувствительность *L. minor* к имазапиру подтверждается данными биотестирования: в 7 дневном тесте LD₅₀ составила всего 1,06 мг/дм³ [340]. Такую эффективность имазапира предлагается использовать для борьбы с водными макрофитами там, где их разрастание способствует эвтрофикации водоема.

Таким образом, исследованные гербицидные препараты производных пиридина (клопиралид и пикорам) и имидазолиноны (имазетапир и имазамокс) в дозах до 50 ПДК включительно оказывают значимое воздействие в первую очередь на микроорганизмы, используемые в экспресс-биотестах – инфузории и бактерии. Концентрации соответствующие 1, 10 и 50 ПДК оказывают негативное действие на рачков *D. magna* и *C. affinis* по показателям хронического воздействия. Для проявления воздействия на низших ракообразных в краткосрочных опытах (96 часов) требуются концентрации свыше 150 ПДК.

В итоге чувствительность применяемых биотестов к современным гербицидам имазапапиру («Гольф ВК»), смеси клопиралида и пикорама («Актеон») и имазамокса («Родимич») можно представить следующим рядом:

биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биоллюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*.

Чувствительность биотестов к нефтепродуктам

Углеводородное загрязнение одно из самых распространенных видов воздействия на окружающую среду. Добыча нефти, ее переработка, использование нефтепродуктов (НП) сопровождаются загрязнением почв в виде разливов, выбросов автотранспорта, локализации отходов нефтяной промышленности [85, 103, 355]. С увеличением численности автотранспорта на территории городов формируется типичное антропогенное загрязнение нефтепродуктами в сочетании с тяжелыми металлами [170, 268].

Загрязнение фракциями нефти негативно влияет на все компоненты окружающей среды. Однако почва и населяющие её организмы чаще всего испытывают как острое, так и хроническое отравление нефтепродуктами в силу аккумулярующих свойств педосферы. Естественное самоочищение почв от нефтяного загрязнения является длительным процессом – от одного до нескольких десятилетий в зависимости от начального уровня загрязнения, типологии почв и климатической зоны [92]. Загрязнение почв нефтью в местах ее добычи, переработки, транспортировки и распределения по нефтепроводам превышает фоновое в десятки и более раз. Результаты исследования содержания НП в почвах некоторых городов России в среднем составляют: для Москвы 5–5100 мг/кг, Нижнего Новгорода – 726-6270 мг/кг, Самары – 1750–13950 мг/кг, в местах нефтедобычи в Казахстане содержание достигает 86000 мг/кг, при фоновом уровне нефтепродуктов для недобывающих нефть районов 40 мг/кг [141, 245].

С учетом этих фактов в отношении действия НП алгоритм установления чувствительности биотестов был скорректирован. Добавка токсиканта проводилась не в водную среду, а непосредственно в почву. Дополнительной причиной необходимости перехода от моделирования загрязнения водных сред к модельному опыту на почвах стало то, что физико-химические свойства НП, бензина в частности, не позволяют получить истинный раствор при добавке этих токсикантов в воду. Разграничение физических причин токсичности НП (изолирующая пленка) и

химических (взаимодействие с молекулами-мишенями) – это отдельное направление научной работы.

Чувствительность испытуемых в настоящей работе биотестов к загрязнению НП определяли не только при моделировании возрастающего загрязнения почвы, но и при параллельной оценке свойств торфа и торфогеля для ремедиации почвы после ее загрязнения бензином –одним из самых распространенных НП.

Почва для модельного эксперимента отбиралась в осенний период 2016 г. на суходольных лугах в районе с. Бобино (Кировская область). Выбранный участок находится вдалеке от крупных автотрасс, промышленных объектов и не используется для сельскохозяйственных целей. Моделирование происходило посредством добавок к почве НП, торфа и торфогеля в различных сочетаниях. Как токсикант использовался бензин марки АИ–95 в следующих дозировках: 1%, 5%, 10% от тестируемой почвы (в расчете на сухую массу).

В качестве первого сорбента использовали торф (50% от сухой массы), добываемый в Кировской области (пос. Зенгино). Известно что, торф обладает значительной нефтеемкостью (6–10 г нефти/г сорбента), гидрофобностью, неограниченным сроком консервации нефти в объеме сорбента [108]. Верховой торф из пос. Зенгино ранее использовался для сельскохозяйственных целей, его сорбционные свойства в отношении НП не изучались.

В качестве второй субстанции для ремедиации почв использовали торфогель – инновационный перспективный препарат, получаемый непосредственно из торфа. Торфогель представляет собой концентрат в виде гомогенной суспензии темно-коричневого цвета, в состав которого входят более 30 элементов минеральных и органических веществ, включая основные микроэлементы. Торфогель применяется как стимулятор роста, протравитель семян, минеральная подкормка растений, восстановитель плодородного слоя

почв, иммуномодулятор для больных растений, однако, в качестве препарата для снижения токсических эффектов нефтепродуктов применялся впервые.

В итоге схема эксперимента была следующая (рис. 5).



Рисунок 5 – Схема модельного эксперимента по влиянию бензина (Б) на свойства почвы и определению ремедиационного потенциала торфа и торфогеля (ТГ)

Контрольные и опытные образцы почвы в описанных вариантах закладывались в пластиковые химически инертные контейнеры объёмом 2000 мл и выдерживались 30 дней. Далее оценивали остаточное содержание НП методом ИК-спектрофотометрии и токсичность модельных образцов почвы для построения ряда чувствительности биотестов.

Анализ образцов показал парадоксальную на первый взгляд ситуацию: добавки как торфа, так и торфогеля привели к недостоверной тенденции увеличения содержания НП (рис. 6).

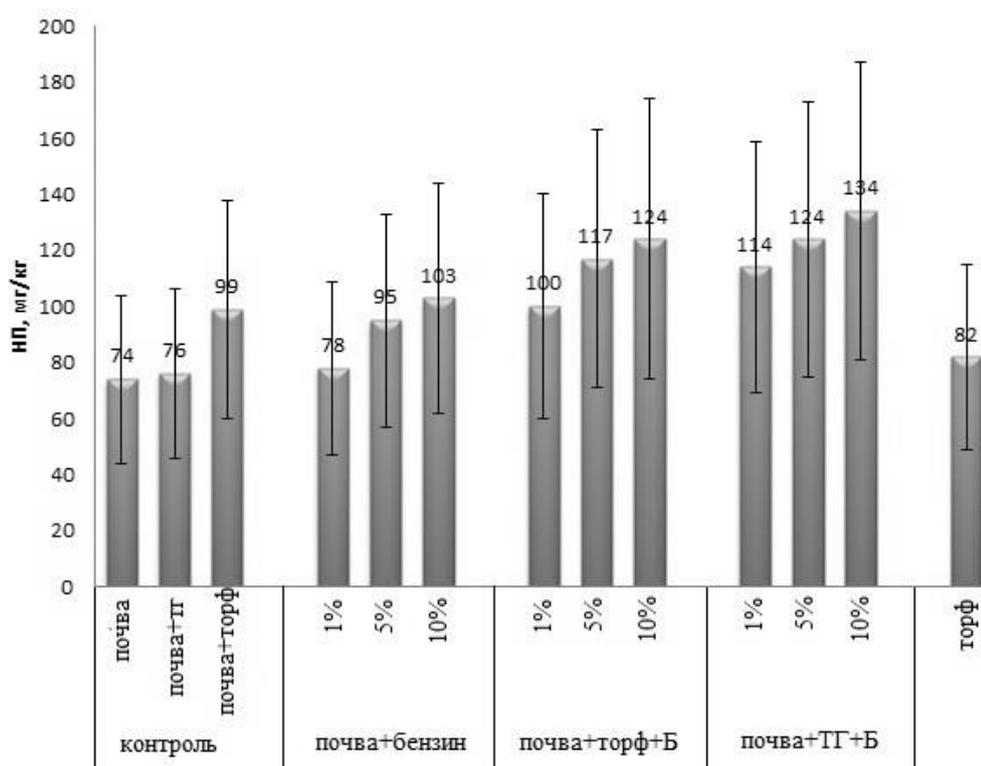


Рисунок 6 – Содержание НП в исследуемых образцах (Б – бензин; ТГ – торфогель)

Эта ситуация объясняется тем, что органическая фракция почв содержит природные вещества, входящие в состав нефти, например битумы. Эти вещества извлекаются органическим растворителем при пробоподготовке для дальнейшего анализа. Такой мешающий фактор известен в ИК-спектрофотометрии, более того является одной из причин отсутствия утвержденного норматива содержания НП в почве [56]. В аспекте решения наших задач исследования, наличие такой проблемы повышает актуальность поиска биотестов, чувствительных к техногенным НП.

Острой токсичности образцов базовый биотест по смертности *D. magna* не выявил. В данной части работы повышать концентрацию токсиканта мы не стали, поскольку это привело бы к губительному действию бензина за счет образования поверхностной пленки на водной вытяжке из почвы, препятствующей растворению кислорода в тестируемой среде. Однако, в качестве доказательства имеющегося воздействия относительно низких доз

бензина на дафний приводим данные по изменению двигательной активности рачков в водных вытяжках из модельных образцов (рис. 7).

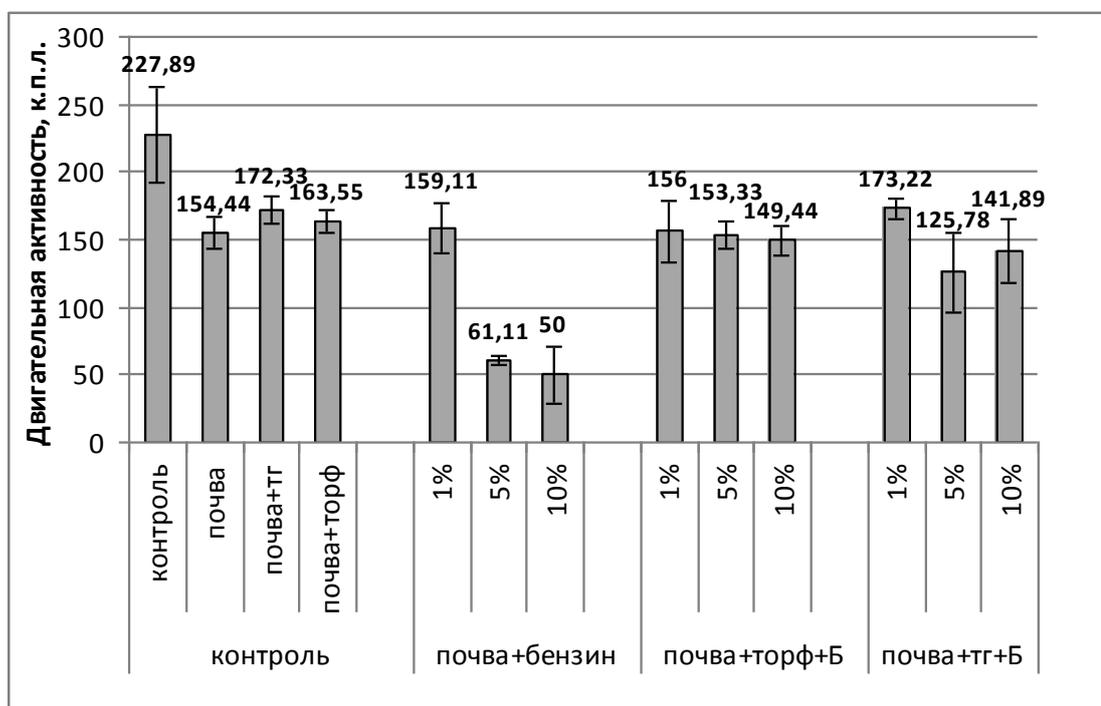


Рисунок 7 – Двигательная активность *D. magna* в исследуемых пробах (к.п.л. – количество пересечений линий, см. раздел 2.3.5; Б – бензин; ТГ – торфогель)

На рисунке 7 показано, что добавки возрастающих доз бензина приводят к достоверному угнетению моторной активности рачков относительно контроля. Добавки как торфа, так и торфогеля снижают этот эффект: рачки начинают двигаться одинаково активно при всех дозах токсиканта.

Для выявления наиболее чувствительного вида низших ракообразных, наиболее часто используемых в биотестировании – *D. magna* и *C. affinis*, описанные выше эксперименты были продублированы с использованием особей *C. affinis*. Добавки бензина в почву от 1 до 10% также не оказывали летального действия на *C. affinis*, но менялись поведенческие реакции рачков (рис. 8).

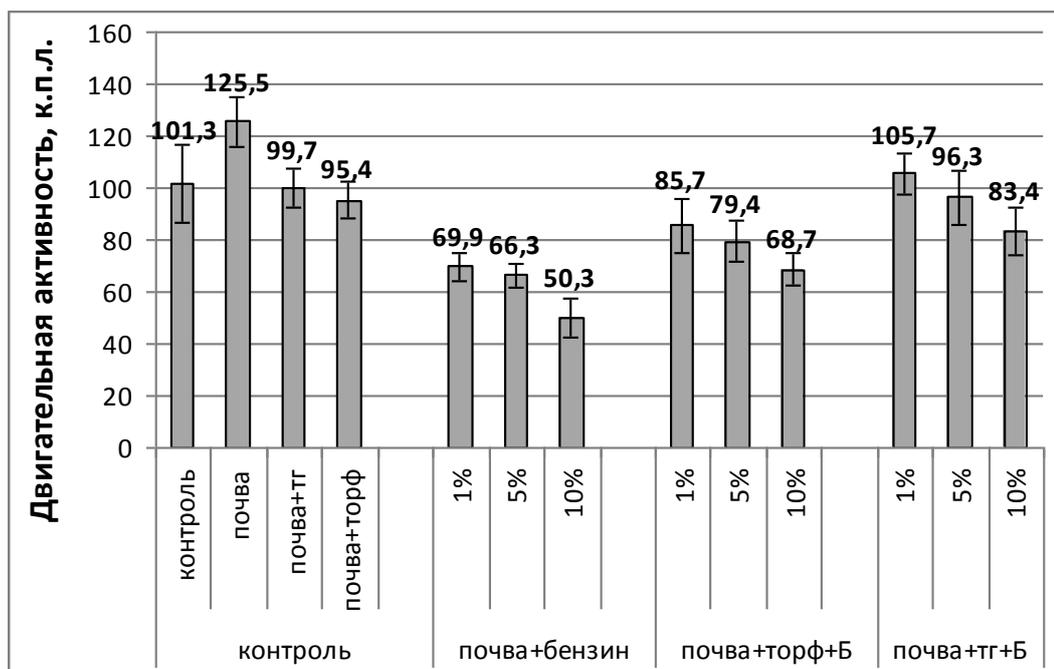


Рисунок 8 – Двигательная активность *C. affinis* в исследуемых пробах (обозначения – см. рис. 7)

Вытяжка из незагрязненной почвы стимулировала двигательную активность цериодафний, в отличие от реакций, наблюдаемых для *D. magna*. Однако, добавки торфа и торфогеля этот эффект значительно снижали, что объясняется чувствительностью цериодафний к органическим веществам как олигосапробных организмов. Действие бензина на *C. affinis* оказалось значительнее, чем на *D. magna*: минимальная добавка токсиканта угнетала моторную активность цериодафний в 1,8 раз ($p < 0,05$), тогда как на более крупных рачков *D. magna* такая доза не действовала. Остальные закономерности воздействия почвы, загрязненной бензином и восстановленной торфом и торфогелем, подтвердились в опытах на *C. affinis*, причем чаще всего в более ярком выражении, чем в биотесте по *D. magna*.

Далее в соответствии с отработываемым алгоритмом установления чувствительности биотестов образцы почв, полученные в модельном эксперименте, тестировались с помощью экспресс-тестов (табл. 23).

Таблица 23 – Результаты тестирования почв, загрязненных бензином, с помощью *P. caudatum* и *E. coli*

Результаты исследования по тест-системам	Варианты											
	контрольные образцы			добавки бензина			сорбент - торф			сорбент - торфогель		
	почва	почва+тг	почва+торф	почва+бензин 1%	почва+бензин 5%	почва+бензин 10%	почва+торф+Б1%	почва+торф+Б5%	почва+торф+Б10%	почва+тг+Б1%	почва+тг+Б5%	почва+тг+Б10%
«Эколюм»												
Индекс токсичности, Т, у.е.	0 (-235±37)	0 (-252±35)	0 (-190±21)	0 (-57±9)	0 (-20±4)	0 (-142±33)	0 (-289±39)	0 (-362±43)	0 (-352±43)	0 (-302±64)	0 (-120±36)	0 (-258±41)
Группа токсичности / оценка результата	I группа / не токсично	I группа / не токсично	I группа / не токсично	I группа / не токсично	I группа / не токсично	I группа / не токсично	I группа / не токсично	I группа / не токсично				
<i>P. caudatum</i>												
Индекс токсичности, Т	0,006±0,0015	0,15±0,01	0,24±0,02	0,29±0,02	0,41±0,03	0,79±0,15	0,28±0,02	0,31±0,02	0,36±0,03	0,21±0,01	0,35±0,02	0,30±0,02
Группа токсичности / оценка результата	I группа / низкая токсичность	II группа / умеренная токсичность	III группа / высокая токсичность	I группа / низкая токсичность								

Примечание: ; Б – бензин; ТГ – торфогель.

В целом по результатам, приведенным в таблице 23, можно сделать заключение, что биотест по оценке хемотаксиса инфузорий *P. caudatum* оказался наиболее чувствительным как к специфическому загрязнению НП, так и оценке защитного действия торфа и торфогеля. На диаграммах эти эффекты видны наглядно (рис. 9, 10).

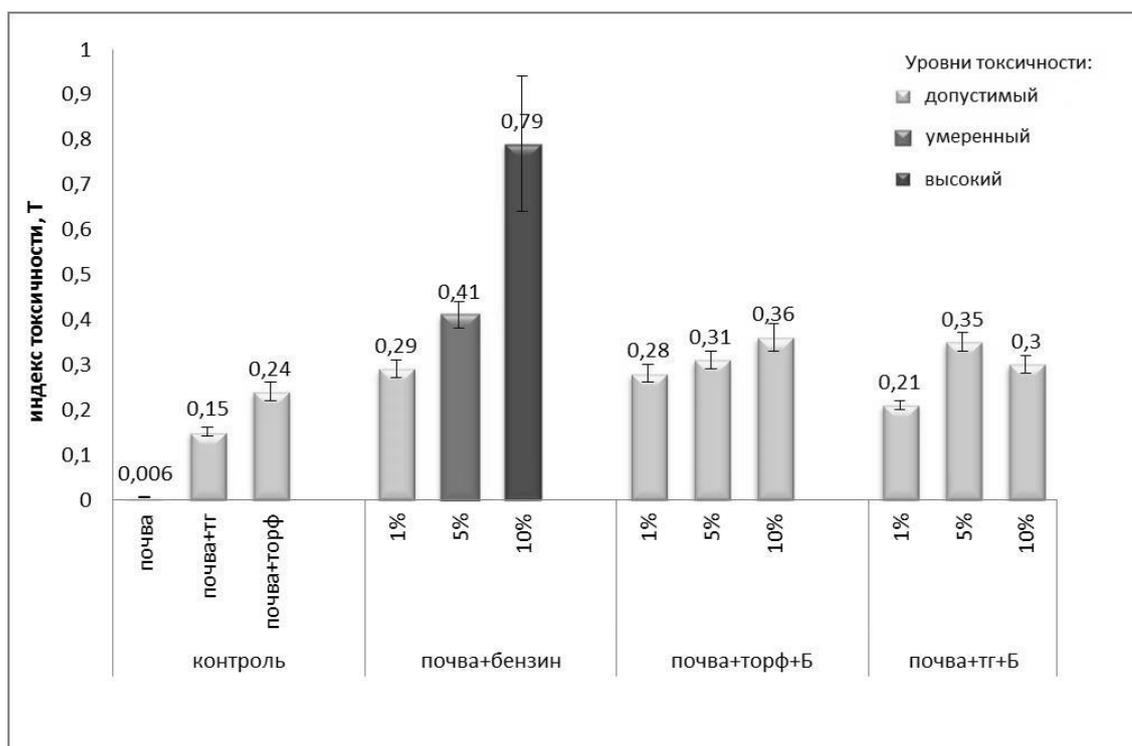


Рисунок 9 – Результаты биотестирования по изменению хемотаксиса инфузорий *P. caudatum*

Проба почвы с 5% бензина снижала индекс Т по инфузориям до II группы токсичности (умеренная степень), а в почве с 10% бензина угнетение происходило до III группы токсичности (высокая степень). Добавки торфа и торфогеля снижали токсичность загрязненных образцов: пробы соответствовали допустимому уровню токсичности, причем индексы Т снижались закономерно степени внесенного загрязнения (рис. 9). Вероятно, механизм снижения токсичности нефтезагрязненных образцов сводится к сорбции нефтепродуктов органическими веществами торфа и торфогеля [39].

При тестировании с помощью *E. coli* все пробы модельной почвы вызывали стимуляцию биолюминесценции бактерий: получены отрицательные индексы токсичности (рис. 10).

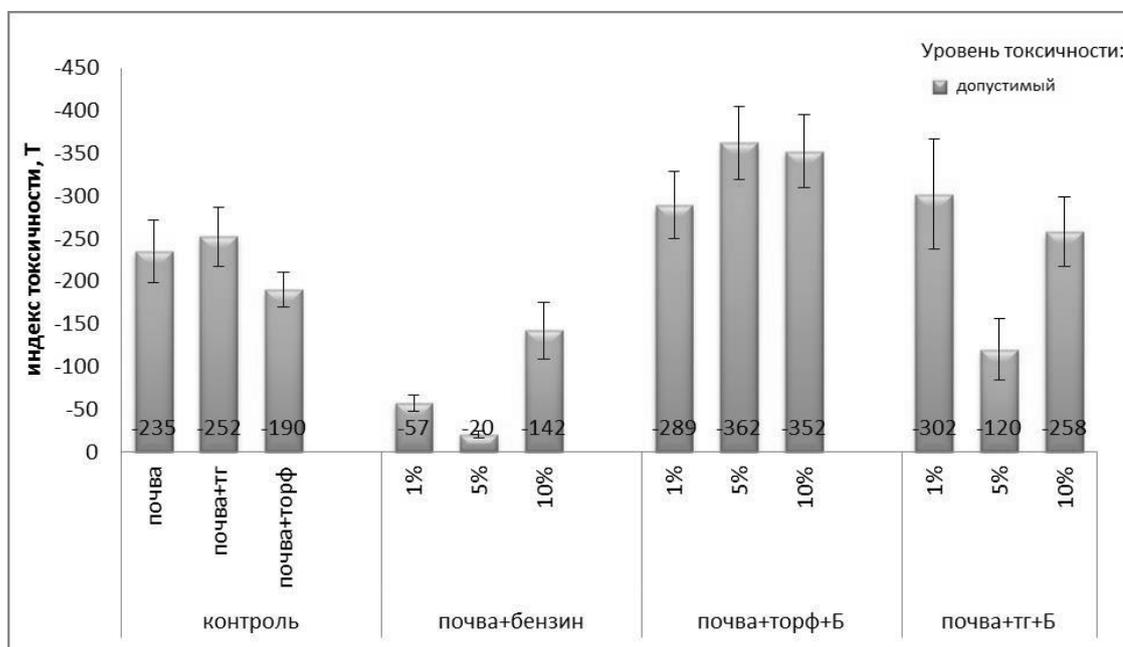


Рисунок 10 – Результаты биотестирования по изменению биолюминесценции бактерий *E. coli*

Контрольные образцы почвы, а также почвы с природными добавками, вызывали стимуляцию биолюминесценции бактерий (различия недостоверны, $p > 0,05$). Добавки бензина не приводили к положительным значениям индексов токсичности, но в то же время угнетали биолюминесценцию относительно значений, полученных для почвы без добавок (различия достоверны, $p < 0,05$). Добавки испытуемых сорбентов возвращали токсикологический показатель к контрольному уровню. При этом, согласно методике [17], независимо от величины отрицательного значения, индекс токсичности (Т) принимается за нулевое значение и делается вывод об отсутствии токсичности образца, что и отражено в таблице 23.

Таким образом, построен ряд снижения чувствительности биотестов к нефтепродуктам:

биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > билюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по гибели *C. affinis* = биотест по гибели *D. magna*.

Кроме того, исследования показали, что химический анализ определения нефтепродуктов методом ИК-спектрофотометрии может быть неинформативным в случае использования природных ремедиационных материалов, что связано с природными особенностями торфа и торфогеля, а не недостатками метода. При этом при биотестировании выявляется закономерный рост токсичности в ответ на возрастающее загрязнение нефтепродуктами, а также биотесты дают информацию об успешности ремедиационных мероприятий. С помощью биотестирования удалось показать эффективность применения торфа и торфогеля для ремедиации почв, загрязненных бензином. Сравнивая, эффективность торфа и торфогеля для целей детоксикации почв, загрязненных нефтепродуктами, стоит рекомендовать торфогель, так как его действующие добавки требуются в гораздо меньшем объеме.

Биотесты по гибели низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis* оказались неинформативны к загрязнению почвы НП в пределах 1–10% (в расчете на сухую массу почвы), но успешное использование этих тест-организмов для диагностики загрязнения и оценки ремедиационных мер возможно за счет перехода на учет сублетальных тест-функций. Нами показано, что биотесты по оценке двигательной активности *C. affinis* и *D. magna* оказались высоко чувствительны к загрязнению почвы бензином. Использование *C. affinis* является более предпочтительным, поскольку выявлена реакция на минимальное загрязнение (1%).

Чувствительности биотестов

в оценке безопасности поливинилхлоридных пластикатов

Высокомолекулярные соединения (ВМС) представленные пластмассами, резинами, синтетическими волокнами нашли широкое применение в быту, промышленности, медицине и других сферах жизни. Большинство ВМС в процессе использования контактируют с жидкими средами. При этом известно о возможности миграции вредных веществ, входящих в состав полимерных материалов, в жидкие и иные среды [266]. Это не только гигиеническая, но и природоохранная проблема. По окончании срока эксплуатации изделий из ВМС, они массово оказываются на свалках твердых бытовых отходов, где на них действуют факторы окружающей среды, в том числе дождевые и талые снеговые воды [172, 195].

Поливинилхлоридные (ПВХ) пластикаты являются одними из наиболее востребованных ВМС. Имеются сведения об уровне их использования свыше 30 млн. т в год [81]. ПВХ пластикаты используются в качестве изоляционных материалов, защитных оболочек кабелей, химически стойких прокладочных или герметизирующих материалов, отделочных материалов, а также для изготовления водопроводных труб, детских игрушек, тары для пищевых продуктов и других, значимых для населения изделий. С этих позиций установление чувствительности биотестов к веществам, способным мигрировать из ПВХ в водную среду, и поиск наилучших рецептур для изготовления качественных и безопасных изделий из ПВХ пластикатов, являются актуальными научно-практическими задачами [172, 185].

ПВХ пластикаты представляют собой термопластичный материал, полученный переработкой поливинилхлоридной композиции, рецептура которой может корректироваться в зависимости от поставленных задач.

В литературе обсуждаются вопросы токсичности ПВХ пластикатов и их составляющих. В настоящее время остро стоят вопросы выбора стабилизаторов, наиболее эффективные из которых содержат тяжелые металлы, и пластификаторов, многие из которых обладают токсичными

свойствами и требуют химико-технологической доработки [62]. Отметим, что миграция мономера винилхлорида на современном этапе исследования проблемы не считается фактором риска, в отличие от миграции пластификаторов [207].

Для исследования были взяты образцы пластифицированного поливинилхлорида, приготовленного по разным технологическим рецептурам. Образцы готовились путем поэтапного смешивания семи компонентов (табл. 24) в лабораторных условиях на диссольвере (смешивающее устройство). При этом контролировались следующие параметры: порядок ввода компонентов, влажность рабочей зоны, температура смеси, время смешивания, условная вязкость полученной пасты.

Таблица 24 – Состав пластикатов

Наименование компонента	Класс опасности	Доля компонента в образце, %		
		НПЛ	СПЛ	ВПЛ
ПВХ-полимер эмульсионный пастообразующий, K=70*	3	-	62	55
ПВХ-полимер микросуспензионный пастообразующий, K=70*	3	57	-	-
ПВХ-полимер суспензионный экстендер	3	10	-	-
Пластификатор ди(2-этилгексил)ортофталат (ДОФ)	2	27	34	39
Регулятор вязкости (смесь непредельных углеводов)	3	2,5	2,5	1,6
Эпоксидированное растительное масло	-	1,5	1,2	2,8
Комбинированная смазка (смесь сложноэфирных соединений)	-	1	0,5	0,7
Mg-Zn-термостабилизатор	-	0,8	0,5	0,6
Неорганические железистые пигменты, двуокись титана, хромофталь	2	0,2	0,3	0,3

Примечание: * - K – константа Финкентчера, характеризующая молекулярную массу полимера; НПЛ - низкопластифицированный образец, СПЛ – среднепластифицированный образец, ВПЛ – высокопластифицированный образец.

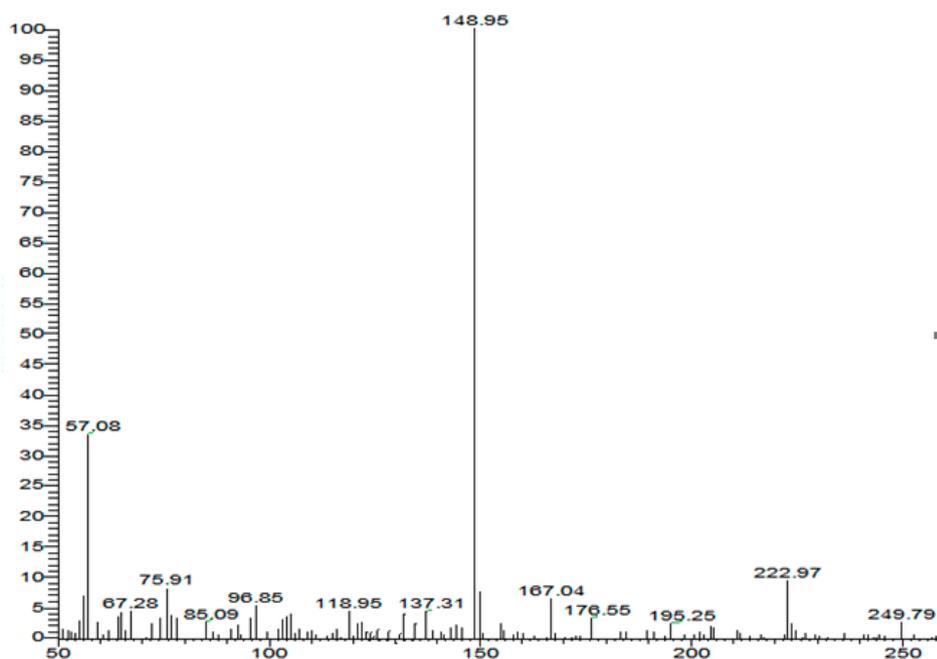
В итоге исследуемые ПВХ пластикаты принципиально отличались ПВХ-полимерной основой и количеством пластификатора ди(2-этилгексил)ортофталата (ДОФ), от доли которого зависит эластичность

изделий. Из высокопластифицированного образца (ВПЛ) изготавливают мягкие изделия, из среднепластифицированного (СПЛ) – среднежесткие, из низкопластифицированного (НПЛ) – полужесткие.

Пробоподготовка образцов заключалась в их измельчении на части диаметром 2–5 мм. Затем готовили водные вытяжки с соотношением твердой и жидкой фаз 1:10, что рекомендовано используемыми аттестованными методиками биотестирования [17, 22, 23, 24]. Одновременно моделировали воздействие холодных (20°C) и горячих вод (70°C). В качестве контроля, а также экстрагирующей жидкости использовали артезианскую воду питьевого качества, как в предыдущих опытах.

Определение действующего вещества в экстрактах их ПВХ пластикаторов. В рекогносцировочных исследованиях нами было показано, что воды, контактирующие с ПВХ пластикатами, оказывают ряд токсических эффектов вплоть до гибели организмов [172, 180]. Методом хромато-масс-спектрометрии определили вещества, присутствующие в пробе, которые могли вызвать токсичность. Анализ проводился на газовом хроматографе-масс-спектрометре DSQ. Спектры расшифровывались по библиотеке масс-спектрометрических спектров NIST (международный институт стандартов и эталонов) [364].

Все пики хроматограмм были проанализированы. Большинство из них характеризовали фазу внутри колонки [365]. Однако, были обнаружены также пики, отличающиеся от фазы. Максимальными они были при анализе вытяжек, приготовленных при 70°C. Пример такого пика для среднепластифицированного образца представлен на рисунке 11, время выхода – 15,3 минут.



По оси абсцисс: отношение массы иона к его заряду. По оси ординат: относительное количество ионов данного вида

Рисунок 11 – Спектр выделенного пика для водной вытяжки из среднепластифицированного ПВХ пластиката (экстрагирование при 70°C)

Данный пик относится к классу фталатов – диизобутилфталат с совпадением по библиотеке NIST 95,6% (синонимы: Phthalic acid, diisobutyl ester, Diisobutylester kyseliny ftalove). В составе композиции, составленной для приготовления ПВХ-пластизолей, источником данного вещества, по всей видимости, послужил ди(2-этилгексил)ортофталат, иначе – пластификатор ДОФ. Он относится ко 2-му классу опасности, поэтому в небольших концентрациях угнетает живые организмы. В ряде исследований доказана репродуктивная токсичность таких пластификаторов [321, 339, 356].

Таким образом, была доказана миграция пластификатора ДОФ при контакте водной среды с ПВХ пластикатами. Данный компонент в процессе полимеризации не подвергается химическому связыванию с молекулами полимера, а удерживается внутри образовавшегося пластиката вандерваальсовыми электростатическими силами. В литературе имеются данные о том, что пластификаторы могут мигрировать в процессе эксплуатации изделий из ПВХ на их поверхность, увлекая за собой и другие

ингредиенты композиции, например, термостабилизаторы [337]. Следовательно, дальнейшее биотестирование и оценка чувствительности используемых биотестов была направлена в основном на определение эффектов диизобутилфталата, присутствующих в водных вытяжках из ПВХ пластикаторов

Биотестирование экстрактов из ПВХ пластикаторов. Все особи низших ракообразных погибали в исходных экстрактах, приготовленных из трех испытуемых ПВХ образцов. Рачки *C. affinis* погибали в исследуемых средах в первые сутки опыта, а некоторые особи *D. magna* жили трое суток. Эти результаты говорят о наличии острой токсичности водных вытяжек образцов ПВХ всех трех типов жесткости. При сравнении чувствительности двух видов низших ракообразных, видно, что безвредная кратность разбавления исходных вытяжек больше для *C. affinis*, а *D. magna* оказались наиболее устойчивыми к исследуемому органическому загрязнению (табл. 25).

Разбавление экстрактов нивелировало токсичность для низших ракообразных, однако в биотестах с использованием микроорганизмов уровень токсичности остался высоким (III группа для всех вариантов). При этом в биотесте по изменению хемотаксиса *P. caudatum* в процессе последовательного разбавления исходной вытяжки наблюдалось закономерное снижение индекса токсичности, тогда как для бактерий препарата «Эколюм» индекс токсичности оставался максимально высоким (табл. 25). Это дало основание расположить бактерий *E. coli* на первом месте по чувствительности к водным экстрактам из ПВХ.

По этим результатам, полученным согласно общему алгоритму выбора биотестов для экологических исследований, был составлен ряд чувствительности биотестов к действующему веществу в ПВХ-композициях – солям ортофталевой кислоты.

**Таблица 25 – Результаты биотестирования водных экстрактов из образцов ПВХ пластикатов
(приготовление при 20 °С)**

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	0,98±0,04	95,3±1,3
	50	100	0,97±0,06	92,4±2,0
	25	0	0,88±0,02	90,5±2,5
	10	0	0,80±0,02	80,6±2,7
СПЛ	100	100	0,98±0,03	82,7±5,1
	50	0	0,98±0,07	86,2±6,1
	25	0	0,85±0,01	80,9±3,7
	10	0	0,72±0,1	85,2±3,8
ВПЛ	100	0	0,85±0,09	83,6±4,1
	50	0	0,77±0,05	85,2±5,6
	25	0	0,76±0,08	79,7±3,8
	10	0	0,71±0,04	81,4±5,2

Примечание: НПЛ - низкопластифицированный образец, СПЛ – среднепластифицированный образец, ВПЛ – высокопластифицированный образец; * - погрешность в пределах норматива методик [22, 23]; ** - все индексы Т относятся к III группе токсичности.

Далее устойчивость *D. magna* к загрязнению в вытяжках из ПВХ позволила дифференцировать образцы по степени безопасности. Одновременно тестировались экстракты, приготовленные «холодным» (20 °С) и «горячим» (70 °С) способами. В случае отсутствия острой токсичности, определялся показатель плодовитости за 24 дня. Результаты представлены в табл. 26.

Таблица 26 – Характеристики водных вытяжек из ПВХ пластикатов, установленные в биотесте на *D. magna*

Вариант / степень разбавления	Наличие острой токсичности (гибель за 96 часов)		Плодовитость за 24 дня		Гибель взрослых особей на 24 день, %		БКР**		
	20 °С	70 °С	20 °С	70 °С	20 °С	70 °С	20 °С	70 °С	
Контроль	-		13,5±1,5		0		-		
НПЛ	100	+	+	0	0	-	-	4	2
	50	+	-	0	6,0±5,2	-	100	-	-
	25	-	-	3,5±1,1*	2,6±0,8*	100	36,7	-	-
	10	-	-	9,9±4,0	2,9±1,3*	23,3	10	-	-
СПЛ	100	+	+	0	0	-	-	2	4
	50	-	+	9,0±0,4*	0	20	-	-	-
	25	-	-	7,4±2,5*	5,6±2,2*	3,3	40	-	-
	10	-	-	6,8±1,1*	3,9±2,3*	0	16,7	-	-
ВПЛ	100	-	-	16,6±3,0	4,8±1,1*	40	90	-	-

Примечание: НПЛ – низкопластифицированный образец, СПЛ – среднепластифицированный образец, ВПЛ – высокопластифицированный образец; * – отличия достоверны по сравнению с контролем; **БКР – безвредная кратность разбавления.

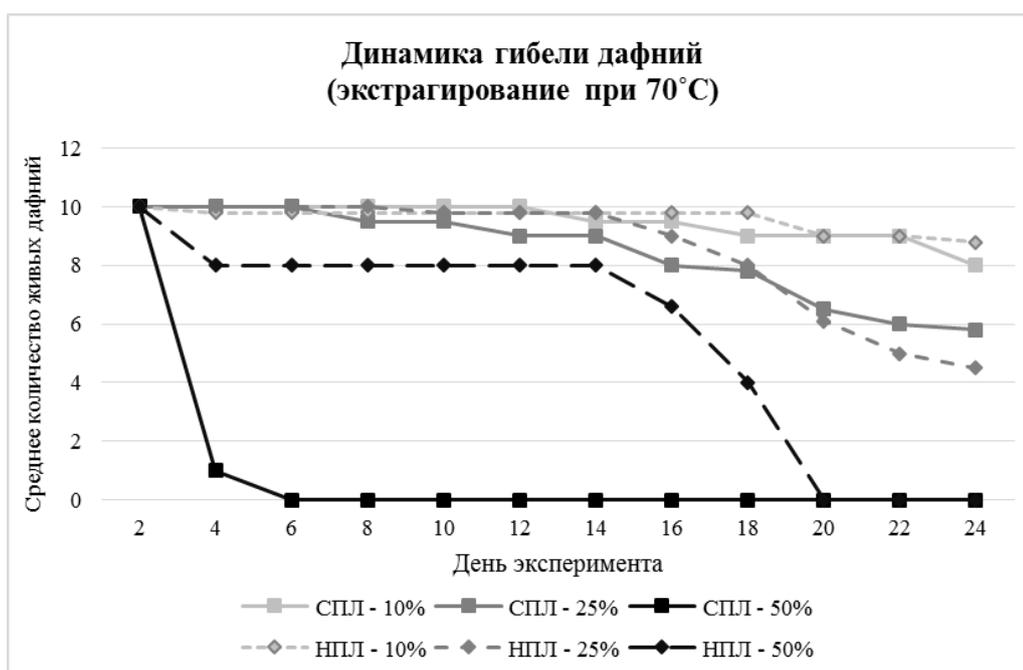
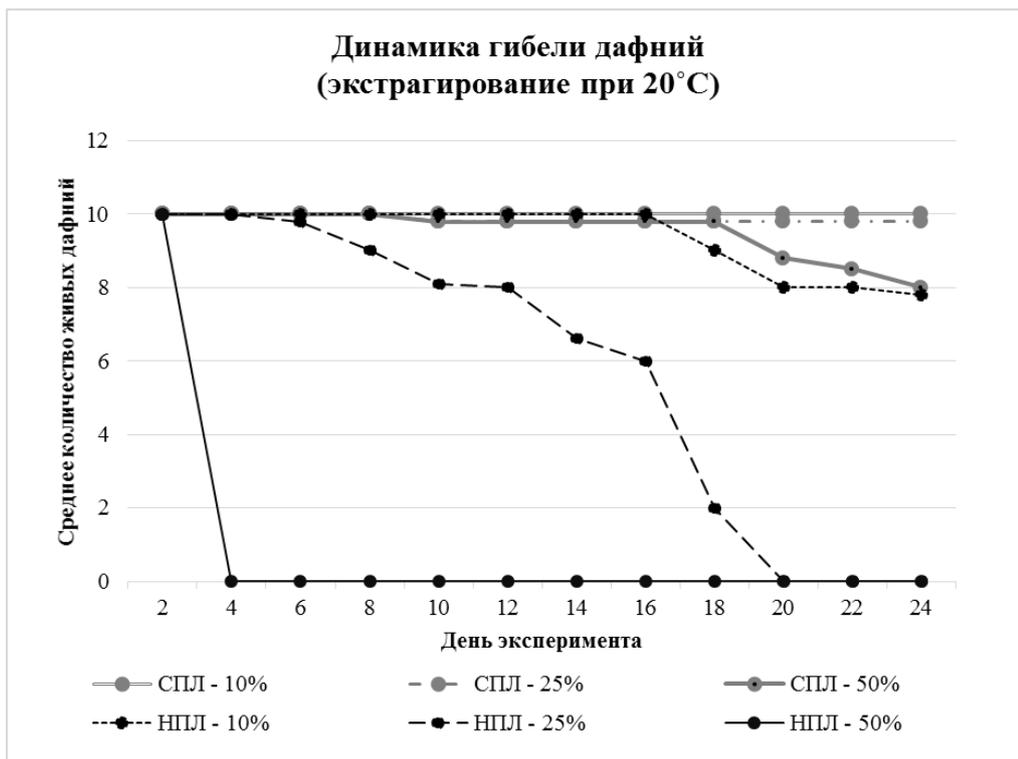
Самым безопасным следует признать высокопластифицированный образец. Водная вытяжка из него приготовленная как «холодным», так и «горячим» способом не потребовала установления безвредной кратности разбавления, так как в кратковременном эксперименте (96 ч.) не оказывала острого токсического действия на дафний. Однако, в долговременном эксперименте образец оказывал хроническое токсическое действие прежде всего по критерию гибели взрослых особей. При этом контакт ПВХ

пластиката с холодной водой не угнетал плодовитости ракообразных, а с горячей – достоверно снижал показатель почти в 3 раза.

При тестировании низко- и среднепластифицированных образцов установлена их острая токсичность. Только при разбавлении исходных вытяжек (100%) в 2–4 раза дафнии выживали в течение четырех суток. Сохраняется тенденция увеличения токсичности при воздействии на ПВХ пластикат горячей воды. Для низкопластифицированного образца установлена безвредная кратность разбавления (БКР) вытяжки при 20°C равная 4, а при 70°C – 2, но при анализе способности особей к размножению в данных вариантах наблюдается большее снижение плодовитости в вытяжке, приготовленной при нагревании.

Анализируя динамику смертности дафний на протяжении 24 дней, можно сделать вывод, что низкопластифицированный образец наиболее опасен, так как все рачки погибали в «холодной» вытяжке при её разбавлении в 4 раза, при разбавлении в 10 раз смертность также превышала допустимый критерий (рис. 12). В «горячей» вытяжке разбавление пробы в 10 раз позволило выжить большинству дафний на фоне снижения их плодовитости в 4,7 раза.

Контакт высокомолекулярных соединений с горячей водой в быту распространен. В то же время многие полимеры не рекомендуется использовать для горячих продуктов и жидкостей, что указывается производителем. В нашем эксперименте, направленном, в том числе, на выбор наиболее оптимальных рецептур пластикаторов, показано, что высокая температура может являться фактором увеличения токсичности ВМС. Вероятно, это связано с возрастанием скорости физико-химических процессов (диссоциация, растворение) при повышении температуры и, как следствие, миграцией некоторых компонентов в раствор. В работе [110] показано, что горячая вода усиливает миграцию из ПВХ-трубопроводов стабилизаторов на основе свинца.



По оси ординат: среднее количество живых дафний в тестируемом варианте «СПЛ-10%» и т.п. означает вид образца и степень разбавления водной вытяжки, %.

По оси абсцисс: день эксперимента

Рисунок 12 – Динамика гибели *D. magna* в водных экстрактах пластикатов

Таким образом, проведенные исследования показали, что из поливинилхлоридных пластиков возможна миграция вредных веществ в контактирующую среду, прежде всего фталатов (солей орто-фталевой кислоты), выполняющих роль пластификаторов. При этом наиболее безопасным оказался высокопластифицированный образец, содержащий максимальное количество ДОФ к композиции (39%);

Поскольку других веществ, кроме фталатов, в водных вытяжках из ПВХ материалов обнаружено не было, то можно утверждать, что выявлен ряд чувствительности биотестов именно к этим соединениям (от наиболее предпочтительного теста к менее чувствительному):

биолюминесцентный тест на *E. coli* > биотест по изменению хемотаксиса *P. caudatum* > биотест по гибели *C. affinis* > биотест по гибели *D. magna*.

В биотестах на *D. magna*, проявивших наибольшую устойчивость, показано, что водные экстракты из ПВХ пластиков угнетают способность рачков к размножению и повышают смертность особей в течение хронического эксперимента.

Повышение температуры создает условия для экстракции из пластиков токсичных веществ. Поиск безопасных рецептур необходимо вести в направлении оптимального соотношения ПВХ-полимера, пластификатора и термостабилизатора, а также замены составляющих композиции на безопасные вещества.

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

Многие регионы России и мира характеризуются загрязнением окружающей среды, превышающим допустимые нормативы её качества. При этом известно, что имеются природные механизмы снижения биодоступности загрязняющих веществ, например, в случае образования устойчивых комплексов, либо ослабления их токсического действия за счет протекторного действия эндо- или экзоагентов, многие из которых являются органическими лигандами [202, 211]. Данный факт формирует научную проблему поиска, выделения и изучения биологических протекторов, практическое применение которых в дальнейшем позволит решать природоохранные, санитарно-гигиенические и другие задачи [73, 196].

Исследованию биологически активных веществ и биопротекторов учеными всего мира уделяется огромное внимание. Это связано с тем, что они чаще всего полифункциональны, безопасны и эффективны. Такие группы биопротекторов как витамины, натуральные и синтетические антиоксиданты, аминокислоты уже активно используются в медицине, ветеринарии, природопользовании [104]. При этом имеются недостаточно исследованные и в то же время перспективные биологические регуляторы пептидной химической природы.

В данной части работы показано как алгоритм выбора биотестов для экологических исследований, описанный и апробированный в выше описанных экспериментах, можно применять для оценки действия веществ с потенциальным протекторным действием в условиях загрязнения среды обитания живых организмов. В этом случае цель реализации алгоритма аналогична первоначально поставленной – выбрать из перечня доступных биотестов именно те, которые обладают наибольшей чувствительностью, а, значит, и информативностью в отношении веществ с положительными свойствами.

3.1.4.1. Оценка протекторного действия восстановленного глутатиона

Перспективным протектором токсического влияния вредных для организмов веществ является глутатион [123]. К примеру, его роль в детоксикации ТМ отмечена многими авторами [312, 363, 366]. Однако, биологически активные вещества и глутатион, в частности, влияют на биодоступность ТМ [363], что может как усиливать, так и ослаблять токсический эффект. В этой связи нами была поставлена задача оценить протекторное действие восстановленного глутатиона (GSH) при токсическом действии ТМ (на примере меди) и определить безопасность данной добавки для гидробионтов в их среду обитания.

В первую очередь согласно предложенному алгоритму готовили потенциально токсичные для базового тест-организма (*D. magna*) растворы. В данной серии экспериментов в модельные растворы вводили сульфат меди (II) до концентрации ионов меди 1 мг/дм^3 , что соответствует 1000 ПДКр.х. ионов металла или 1 ПДК для питьевых вод. Ранее было показано (раздел 3.1.2), что такая концентрация меди является летальной для низших ракообразных. Далее в растворы добавляли восстановленный глутатион таким образом, чтобы мольное соотношение Cu:GSH было равно 0:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4. Использовался химически чистый препарат глутатиона.

Поскольку летальное действие исходных растворов меди было известно, на втором этапе эксперимента определяли острую и хроническую токсичность модельных растворов с внесением восстановленного глутатиона как потенциального биопротектора. Ответные реакции низших ракообразных *D. magna* в опытах по определению хронических токсических воздействий оценивались не только по изменению плодовитости особей, но и другим морфо-физиологическим отличиям от контрольного варианта. Основные результаты биотестирования исследуемых растворов отражены в табл. 27.

Таблица 27 – Характеристика токсичности растворов меди, определенная с помощью *D. magna* [310]

Соотношение Cu:GSH	Смертность, %		Плодовитость, % от контрольных значений	Морфологические и другие патологические изменения
	96 ч.	24-е сутки		
1:0	100	-	-	Изменения двигательной активности: замирание и резкие скачки. Быстрая гибель в течение первых суток
1:1	100	-	0	Иммобилизованные особи лежат на дне, дафнии «вздрагивают», гибель на вторые сутки
1:2	53,3	70	0	Торможение роста, крайне бледная окраска
1:4	0	3,3	101	Помутнение плазмы клеток в жаберных отростках; отставание развития некоторых особей

Примечание: «-» показатель не определялся, так как гибель организмов наступала ранее.

Данные таблицы 27 демонстрируют, что растворы, содержащие добавки меди, а также меди и глутатиона, равные соотношениям 1:1 и 1:2, оказали максимальный токсический эффект, проявляющийся в высокой смертности рачков за 96 часов эксперимента. Время гибели в опытах закономерно увеличивалось от нескольких часов до времени окончания острого опыта (96 ч.) в ряду «вариант 1:0 → вариант 1:1 → вариант 1:2». При этом в варианте Cu:GSH (1:2) по истечении 96 часов погибла только половина особей, следовательно, наблюдается защитное действие глутатиона. С оставшимися дафниями эксперимент был продолжен. Рачки имели значительное отставание в развитии по сравнению с контролем – наблюдалось уменьшение размеров тела, бледность покровов и исчезновение капель жира. Кроме того, дафнии были бесплодны, выводковые камеры не образовывались. В итоге в варианте «1:2» реализовались два основных критерия хронического токсического действия: гибель особей за 24 дня опыта значительно превысила 20 % (достигла 70 %), а также неспособность рачков к размножению [196, 310].

Добавка глутатиона, в мольном соотношении в 4 раза превышающая концентрацию токсиканта (Cu:GSH 1:4), не только нивелировала летальное

токсическое действие меди, но и позволила рачкам принести потомство. В хроническом опыте за 24 дня плодовитость была близка к контрольным значениям ($p < 0,05$). Такой результат свидетельствует о положительном биопротекторном действии восстановленного глутатиона в условиях загрязнения водной среды ионами меди. Динамика гибели *D. magna* в течение длительного эксперимента отражена на рисунке 13.

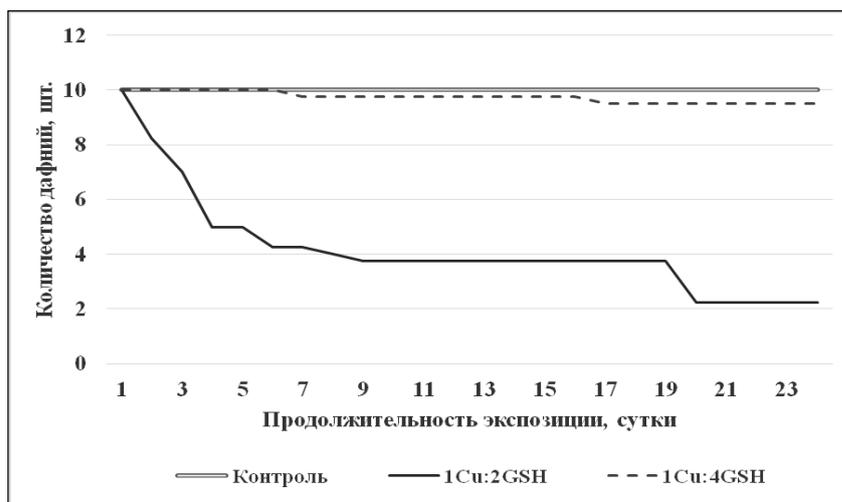


Рисунок 13 – Динамика гибели *D. magna* под влиянием добавок в тестируемую среду меди и глутатиона

Третьим этапом оценки протекторного действия восстановленного глутатиона, согласно алгоритму после его адаптации для подобных исследований, стало биотестирование модельных растворов по двум другим биотестам.

В экспресс-биотестах с использованием *P. caudatum* и бактериальной тест-системы «Эколюм» получены согласующиеся между собой результаты: раствор соли меди без глутатиона и с добавками меди и биопротектора 1:1 относятся к III группе токсичности (проба сильно токсична), раствор Cu:GSH 1:2 – II группа (проба средне токсична), Cu:GSH 1:4 – I группа (проба нетоксична) (табл. 28).

Таблица 28 – Индексы и группы токсичности растворов меди, установленные с помощью экспресс-методик биотестирования

Соотношение Cu:GSH	Токсичность по <i>P. caudatum</i>		Токсичность по <i>E. coli</i>	
	Индекс токсичности, у.е.	Группа токсичности	Индекс токсичности, у.е.	Группа токсичности
1:0	0,78±0,015	III	99,79±0,03	III
1:1	0,85±0,015	III	99,83±0,09	III
1:2	0,66±0,021	II	29,98±9,17	II
1:4	0,26±0,06	I	19,0±4,87	I

Примечание: обозначение групп токсичности указано в разделах 2.4.3 (табл. 2) и 2.4.4 (табл. 3).

Как и в опытах с *D. magna*, полученные результаты свидетельствуют о постепенном снижении токсичности ионов меди в ответ на увеличение доли глутатиона. Также отметим подтверждение того, что наиболее эффективна добавка глутатиона, превышающая количество токсичного вещества (в расчете на ион меди), в 4 раза.

В продолжение работы удалось раскрыть физико-химические механизмы выявленного протекторного действия GSH [72, 105]. Для этого в тест-организмах *D. magna*, после их экспозиции с модельными растворами, определяли содержание меди методом инверсионной вольтамперометрии [68, 218]. Было установлено, что накопление меди организмами рачков снижается в присутствии трипептида для вариантов растворов с соотношением ионов меди к глутатиону 1:2 и 1:4 (рис. 14). В указанных вариантах глутатион снижает биодоступность металла для исследуемых организмов, что может быть вызвано связыванием ионов меди в комплексные соединения и уменьшением активной концентрации ионов токсиканта в растворе [105].

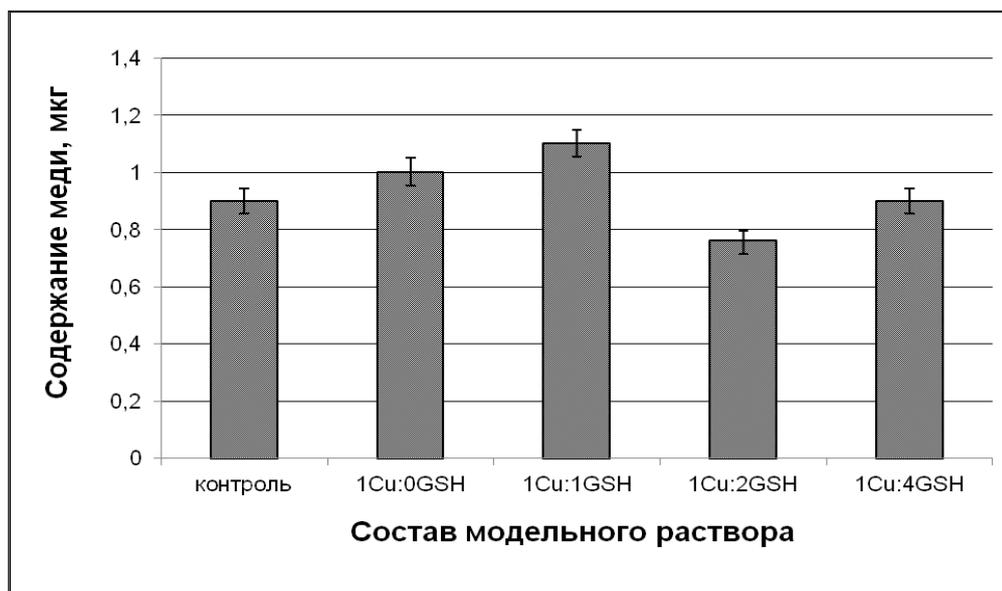


Рисунок 14 – Содержание меди в *D. magna*

Механизм совместного действия глутатиона и меди, вероятно, следующий. Составляющей хитинового карапакса *D. magna* является полисахарид хитозан, содержащий большое количество свободных аминогрупп, которые, приобретая избыточный положительный заряд, выступают в роли катионита и способны связывать и прочно удерживать Cu^{2+} . Глутатион не только снижает активную концентрацию меди в растворе, но и уменьшает ее количество на поверхности организмов, тем самым, снижая накопление [105, 222].

Таким образом, результаты исследований показывают, что восстановленный глутатион, внесенный в загрязненную водную среду обитания организмов, участвует в органо-минеральных взаимодействиях, снижая в итоге токсичность вод. Анализируя токсикодинамику гибели *D. magna* и обобщая эксперименты, проведенные с помощью других биотестов, можно утверждать, что глутатион оказывает протекторное действие, которое в наибольшей степени проявилось при соотношении Cu:GSH, равном 1:4.

Реализованный алгоритм оценки протекторного действия восстановленного глутатиона далее апробировался нами в отношении действия других веществ.

3.1.4.2. Оценка протекторного действия белковых биорегуляторов

Биорегуляторы (БР), исследуемые в данной части работы, были открыты сотрудниками Института элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова (г. Москва). Они выделяются из тканей животных и растений, имеют белковую природу. В настоящее время данные вещества выделены в отдельную группу мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ) по сходству их физико-химических свойств и характеру биологической активности [272]. От других молекул, участвующих в процессах тканевой и клеточной регуляции, биорегуляторы данной группы отличаются своей способностью в низких дозах стимулировать восстановление и репарацию в патологически измененных тканях. Было установлено, что в основе механизма действия данных биорегуляторов лежит их способность влиять на основные биологические процессы – клеточную адгезию, миграцию, дифференцировку, пролиферацию, а также активировать клеточные источники регенерации в тканях тех органов, которые являются источниками их выделения [210, 272].

Активность биорегуляторов данной группы характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Этот факт в совокупности с положительными результатами в отношении их различных биостимулирующих свойств, показанных авторами открытия для водных позвоночных и млекопитающих [272] позволил предположить активность МГТБ и для более низкоорганизованных форм жизни и, соответственно, расширить возможности их применения.

В природоохранной практике имеется острая необходимость разработки биоремедиационных мероприятий для водных объектов. Одним из перспективных и одновременно новых направлений в этой сфере является поиск и исследование природных защитных механизмов от негативных факторов, способов их активизации. В силу этого, представляется

актуальным исследование протекторных свойств пептидных биорегуляторов, действие которых ранее не было оценено для мезо- и микрогидробионтов. Поставленная задача решалась по алгоритму выбора оптимальных биотестов для оценки протекторного действия биологически активных веществ.

Поскольку методика выделения МГТБ не имеет прямого отношения к теме работы, то приводим здесь краткое описание получения исследуемых БР, выделенных из сыворотки крови крупного рогатого скота и листьев чистотела. Для выделения биорегулятора животного происхождения использовали сыворотку крови (ПанЭко, Россия). Растительный биорегулятор выделяли из чистотела *Chelidonium majus*. Свежесобранные нарезанные листья чистотела помещали в экстрагирующий раствор ($2,06 \times 10^{-2}$ М NH_4NO_3 ; $1,88 \cdot 10^{-2}$ М KNO_3 ; $3 \cdot 10^{-3}$ М $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $1,5 \cdot 10^{-3}$ М $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1,25 \cdot 10^{-3}$ М KH_2PO_4) на 4–5 часов при $+4^\circ\text{C}$ (на 500 г зеленой массы использовали 1000 мл раствора). Полученный экстракт отфильтровывали через несколько слоев марли, затем центрифугировали при 3000 g в течение 30 мин. Образовавшийся осадок отделяли от основного раствора, который далее очищали методом высаливания белков. Для этого к сыворотке крови или экстракту чистотела добавляли при перемешивании сульфат аммония (780 г/дм^3) и азид натрия ($0,1 \text{ г/дм}^3$), образовавшуюся суспензию оставляли на 5 суток при 4°C , центрифугировали (12000 g; 30 мин.), супернатанты и осадки собирали отдельно и диализовали против воды до полного удаления следов соли. Фракции супернатантов концентрировали в вакуумном роторном испарителе при 40°C и далее разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [73].

При исследовании протекторного действия биорегуляторов животного и растительного происхождения тестировали водные среды, загрязненные сульфатом меди с концентрацией ионов меди равной 0,1 и 0,01 мг/дм^3 , что соответствует 100 и 10 ПДК для вод рыбохозяйственных водоемов (ПДКр.х.). Летальные дозы ионов меди для базового тест-организма *D. magna*

использовали целенаправленно – в целях установления наличия или отсутствия защитного действия исследуемых биорегуляторов.

При последовательном биотестировании по апробируемому алгоритму было выявлено, что биорегуляторы изменяют ответные реакции организмов на тяжелые металлы. Результаты представлены в таблице 29.

Таблица 29 – Влияние биорегуляторов на токсический эффект меди (II)

Вариант		Результаты биотестирования		
		Плодовитость <i>D. magna</i> , % к контролю	Индекс и группа токсичности по <i>P. caudatum</i> , у.е.	Индекс и группа токсичности по <i>E. coli</i> , у.е.
0,01 мг/дм ³ (Cu ²⁺)	Без добавок биорегуляторов	0 (гибель особей)	0,95±0,02 Ш группа	94,4±7,2 Ш группа
	Сывороточный биорегулятор	0 (гибель особей)	0,41±0,05*	23,7±1,6*
	Биорегулятор из чистотела	0 (гибель особей)	0,44±0,09*	24,8±9,9*
0,1 мг/дм ³ (Cu ²⁺)	Без добавок биорегуляторов	0 (гибель особей)	0,90±0,02 Ш группа	81,0±1,5 Ш группа
	Сывороточный биорегулятор	114,5±3,3*	0,09±0,03* I группа	0* I группа
	Биорегулятор из чистотела	115,5±6,7*	0,18±0,04* I группа	13,5±0,8* I группа

Примечание: * - отличия достоверны по сравнению с раствором без добавок БР; обозначение групп токсичности указано в разделах 2.4.3 (табл. 2) и 2.4.4 (табл. 3).

Результаты, отраженные в таблице 29 свидетельствуют о том, что добавки биорегуляторов снижали токсический эффект ионов меди. В варианте с добавкой ионов меди, равной 0,1 мг/дм³ (100 ПДКр.х.), нивелировать летальный эффект для *D. magna* с помощью биорегуляторов не удалось. Однако результаты экспресс-биотестов показали, что снижение токсичности происходит с Ш до II групп токсичности ($p>0,05$).

В опытах с меньшими добавками ионов меди (10 ПДКр.х.) биорегуляторы, как животного, так и растительного происхождения, оказались эффективны в снижении токсичности для всех трех тест-организмов. Дафнии на фоне добавок БР принесли потомство. Более того, биорегуляторы стимулировали способность к размножению рачков в среднем на 15% ($p>0,05$), таблица 29. Данные экспресс-биотестов показали, что

токсичность для инфузорий и бактерий снизилась еще значительней по сравнению с предыдущим опытом – достигнута не опасная I группа токсичности.

Анализ результатов эксперимента с добавкой (Cu^{2+}), равной $0,01 \text{ мг/дм}^3$ (10 ПДКрх), позволил сделать вывод о том, что протекторный эффект сывороточного биорегулятора сильнее, чем данный эффект экстракта, выделенного из чистотела. Сывороточный БР снизил токсический эффект ионов меди до контрольных показателей как в опыте с *P. caudatum*, так и в тесте с использованием *E. coli*, тогда как БР из чистотела не снизил индексы токсичности до нулевых значений.

Выявленные закономерности в целом согласуются с научными данными, полученными ранее о действии изучаемых биорегуляторов. Показано, что БР, выделенный из чистотела, угнетает деление клеток злокачественных опухолей: он на 90–95% блокировал рост перевивной опухоли лимфосаркомы у мышей *in vivo*, а также снижает активность патогенных микроорганизмов (амеб и лямблий). Сывороточный БР обладает широким спектром действия. В первую очередь он направлен на репарацию соединительных и эпителиальных тканей. Известно его действие в отношении восстановления хрящевой, костной ткани, а также кожи, эпителия желудочно-кишечного тракта, роговицы глаза. Такое полифункциональное действие говорит о его выраженных протекторных и регенеративных свойствах [71, 272], что подтвердилось и для гидробионтов, используемых в данной работе.

Таким образом, исследована информативность методов биотестирования для оценки протекторного действия биорегуляторов: восстановленного глутатиона и мембранотропных гомеостатических тканеспецифических белков. Выявлено, что глутатион оказывает протекторное действие при высоком уровне загрязнения водной среды медью – 1 мг/дм^3 (1000 ПДКр.х.), которое в наибольшей степени проявилось при мольном соотношении $\text{Cu}:\text{GSH}$, равном 1:4. Биорегуляторы, выделенные из

сыворотки крови КРС и из чистотела, также снижали токсический эффект меди с предотвращением летального эффекта для *D. magna* в варианте с добавкой токсиканта, содержащего ионы Cu^{2+} , при концентрации соответствующей 10 ПДКр.х. В биотестах с микроорганизмами *P. caudatum* и *E. coli* защитный эффект установлен и при более высокой концентрации 0,1 мг/дм³ (100 ПДКр.х.).

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

Стратегия предварительного целевого выбора биотестов предназначена для исследования нативных сред в условиях установленного основного фактора токсичности. Чаще всего такие антропогенные ситуации встречаются в зонах воздействия промышленных предприятий с известным спектром выбросов и сбросов загрязняющих веществ, среди которых можно выделить основные по критериям опасности и/или по массе поступления ЗВ в окружающую среду.

Апробацию стратегии выбора целевого биотеста и полученных с ее помощью рядов чувствительности четырех аттестованных методик биотестирования провели на примере урбаноземов, отобранных вблизи предприятия «Электроцинк» (г. Владикавказ). В работе [106] с использованием метода атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) отмечено, что основной особенностью исследуемых урбаноземов является высокий уровень антропогенного загрязнения тяжелыми металлами (табл. 30).

Таблица 30 – Характеристика проб урбаноземов г. Владикавказа [106]

№ пробы	pH _{H2O}	pH _{KCl}	Содержание органического вещества, %	Валовое содержание ТМ, мг/кг					СПЗ
				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	26,5
2	6,55	5,53	7,3±0,7	31800±1000	44,4±0,6	30,1±0,8	1165±12	325,5±11	1,2
3	7,31	6,46	11,5±1,1	29660±320	62,5±0,7	31,1±1,5	1468±18	405±7	21,1
4	7,60	6,93	11,0±1,1	17080±210	100,5±0,8	28,4±0,9	1985±21	1240±110	57,6
5	6,60	6,06	5,0±0,7	35070±360	383,8±1,8	31,6±0,4	3750±90	2760±230	129,1
ПДК	–	–	–	25000*	55	85	100	30	–

Примечание: прочерк обозначает, что норматив отсутствует; жирным шрифтом выделены значения, превышающие норматив; СПЗ – суммарный коэффициент загрязнения почвы.

Максимальные превышения нормативов наблюдаются для валовых содержаний цинка и свинца: норматив превышен до 92 и 37,5 раз соответственно. В половине исследуемых проб установлено превышение содержания меди по сравнению с допустимыми нормами (табл. 30).

Согласно полученным рядам чувствительности биотестов была выдвинута гипотеза о том, что с помощью биотеста по хемотаксису *P. caudatum* мы получим наиболее информативные результаты, а биотест по *E. coli* можно исключить как не чувствительный к данному основному фактору токсичности. Для проверки гипотезы водные вытяжки из проб урбаноземов были протестированы с помощью всех четырех испытуемых методик биотестирования. Полученные результаты показаны в таблице 31.

Водные вытяжки из урбаноземов оказались токсичны только для инфузорий: в биотесте по изменению их хемотаксиса были получены высокие индексы токсичности. Показателей смертности дафний и цериодафний, значимо отличающихся от контрольных значений, установлено не было. Биотест с использованием *E. coli* показал стимуляцию биолюминесценции бактериального препарата. Следовательно, выдвинутая гипотеза и полученные ранее ряды информативности для диагностики загрязнения водных сред соединениями свинца и цинка верны.

Таблица 31 – Токсичность проб урбаноземов г. Владикавказа

№ пробы	<i>E. coli</i> , Т (у.е.)	<i>Paramecium caudatum</i> , Т (у. е.)	<i>Daphnia magna</i> , смертность (%)	<i>Ceriodaphnia affinis</i> , смертность (%)
1	(-39,9±3,0)* I группа	0,45±0,09 II группа	3,3	10
2	(-41±9)* I группа	0,43±0,09 II группа	0	0
3	(-39,9±3,0)* I группа	0,51±0,01 II группа	0	0
4	(-63±5)* I группа	0,32±0,05 I группа	0	0
5	(-37,6±1,1)* I группа	0,40±0,05 II группа	0	0

Примечание: * – стимуляция биолюминесценции; жирным шрифтом обозначены значения, соответствующие заключению «проба токсична».

Отсутствие гибели низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis*, а также стимуляция биолюминесценции *E. coli* объясняется сравнением соотношения валового содержания ТМ в пробах и их водорастворимых форм (табл. 32).

Таблица 32 – Значения соотношений валовых и водорастворимых форм ТМ в образцах урбаноземов

№ пробы	Zn _{вал.} /Zn _{вод.}	Pb _{вал.} / Pb _{вод.}
1	1735	106
2	1532	1550
3	772	2250
4	992	6200
5	572,5	6900

Примечание: Zn_{вал.} – валовое содержание цинка (мг/кг), Zn_{вод.} – содержание водорастворимых форм цинка; аналогичные обозначения применены для свинца.

Сравнение валового содержания ТМ с их водорастворимой фракцией, которая переходит в водную вытяжку из урбаноземов позволяет сделать вывод о том, что на тест-организмы воздействует менее 0,1% от количества валовых форм элемента. Цинк мигрирует в водный раствор в диапазоне 0,05–0,2%, медь 0,1–2,3% от валового содержания. Ионы никеля методом ААС в водной вытяжке не обнаружены.

Такое низкое содержание водорастворимых форм ТМ в водных вытяжках урбанозёмов объясняется возможным участием их в реакциях комплексообразования. Известно, что ионы ТМ имеют большое сродство к органическому веществу почвы [87, 134]. Для Pb, Cu и Ni учеными показаны высокие значения констант устойчивости их органоминеральных соединений с фульво- и гуминовыми кислотами [191]. Причем, чем ниже содержание металла, тем выше энергия их связывания [367].

В отношении анализируемых проб корреляционный анализ связи количества органического вещества и содержания водорастворимых форм металлов показал: накопление нелабильных форм меди наиболее тесно связано с долей органического вещества ($r < -0,7$). Для других металлов зависимость слабее, что объясняется химическими особенностями каждого элемента и его форм. Например, доказано, что цинк связывается с органическим веществом почвы неспецифически и более подвижен по сравнению со свинцом и медью [244]. Известны и другие механизмы снижения биодоступности ТМ в почве: сорбция на глинистых минералах, выпадение в осадок в жидкой фракции почвы, поглощение живыми организмами и т. д.

Итак, несмотря на выявленную особенность исследованных урбанозёмов – крайне низкую степень перехода ТМ в водную вытяжку – установлено, что ряды чувствительности биотестов, построенные на основе модельных опытов, соблюдаются и достоверно подтверждаются результатами исследований. Использование установленных закономерностей о чувствительности четырех испытанных аттестованных методов биотестирования позволяет на этапах планирования экологических исследований выбирать наиболее предпочтительные биотесты.

Таким образом, в разделе 3.1. в результате проведения серии экспериментов обоснована эффективность целевого выбора биотестов с использованием универсального алгоритма, для определения наиболее чувствительных и предпочтительных методов биотестирования водной среды, загрязненной минеральными и органическими токсикантами. Алгоритм направлен на четкую последовательность действий в определении чувствительности биотестов, их экспрессности и информативности для выявления токсического действия поллютантов.

Апробация проведена на модельных и нативных водных средах, загрязненных минеральными и органическими веществами: минеральными соединениями азота и фосфора, солями тяжелых металлов (Cu, Zn, Pb, Cd), нефтепродуктами (бензином), гербицидами трех составов, солями ортофталевой кислоты (в составе ПВХ композиций). Экспериментально определенные ряды чувствительности биотестов основаны 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 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*.

Для удобства использования алгоритма выбора биотестов составлена таблица, которая может служить опорным материалом при планировании экологических исследований на территориях, подверженных действию испытанных веществ (табл. 33).

**Таблица 33 – Ранжирование чувствительности биотестов
к минеральным и органическим токсикантам**

Токсикант			Уровень чувствительности биотестов			
			Смертность <i>D. magna</i>	Смертность <i>C. affinis</i>	Биолюми- несценция <i>E. coli</i>	Изменение хемотаксиса <i>P. caudatum</i>
Минеральные вещества	Cu ²⁺	Тяжелые металлы	+	++	++++	+++
	Cd ²⁺		+++	++	+	++++
	Pb ²⁺		++	+++	+	++++
	Zn ²⁺		+++	++	+	++++
	NO ³⁻	Минеральные формы азота	+++	++++	+	++
	NO ²⁻		+++	++++	+	++
	NH ₄ ⁺		+++	++++	++	+
	NO ³⁻ + NH ₄ ⁺		+++	++++	+	++
	NO ²⁻ + NH ₄ ⁺		+++	++++	++	+
	(P _x O _y) ^{z-}	Фосфаты и пиррофосфаты	+	++	++++	+++
Органические вещества	Клопиралид + пикорам	Гербициды	+	++	+++	++++
	Имазетапир C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃		+	++	+++	++++
	Имазамокс C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₄		+	++	+++	++++
	Нефтепродукты		+	++	+++	++++
	Ортофталаты		+	++	++++	+++

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

Стратегия целевого выбора биотестов адаптирована для оценки протекторного действия биологически активных веществ. Биотесты испытаны в условиях токсического действия на организмы с добавками биопротекторов и без них. Результаты, полученные в экспериментах с восстановленным глутатионом и мембранотропными гомеостатическими тканеспецифическими биорегуляторами, имеют научную и практическую ценность для дальнейшей разработки биоремедиационных мероприятий водных сред.

Предложенная стратегия биотестирования, включающая предварительный целевой выбор биотестов, предназначена для реализации непосредственно перед масштабными и/или долгосрочными экологическими исследованиями, в том числе при выполнении биодиагностической части программ экологического мониторинга. Процедура позволяет выбирать

наиболее чувствительные методы биотестирования (биотесты) к наиболее распространенным и опасным загрязняющим веществам в районе исследования и ориентироваться при интерпретации результатов именно на них.

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

При реализации экологических исследований распространенной является ситуация, когда невозможно выделить основной фактор токсичности – загрязняющее вещество, оказывающее токсический эффект на живые организмы, превалирующий над действием других веществ. Сочетанное действие химических веществ приводит к мало изученным явлениям коергизма. Многие органические соединения нестабильны в окружающей среде: вступают в химические реакции, нередко имеющие цепной характер. Минеральные вещества также существуют в составе нативных сред в виде различных форм, весьма различающихся по времени жизни в растворе, реакционной способности, биодоступности и другим свойствам, влияющим на проявление их токсичности для живых организмов. Совокупность указанных фактов говорит о необходимости включения в современную стратегию биотестирования таких методов, которые позволят получать как оперативные ответы о токсичности тестируемой среды, так и определять экологически значимые эффекты токсикантов при неустановленном факторе токсичности.

В мировой практике биотестирования задача оперативной, ранней диагностики загрязнения привела к разработкам и внедрению биологических систем раннего предупреждения (BEWS). Некоторые из них отличаются непрерывным отслеживанием физиологических или поведенческих реакций организмов для обнаружения внезапного увеличения концентрации загрязняющих веществ [285, 351]. Главный принцип разработки BEWS –

ориентация на учет предлетальных реакций организмов [403]. При этом ученые отмечают: «Редко, когда 2–3 суточные опыты адекватно характеризуют биологическую и экологическую угрозу конкретного загрязнения» [253]. Добавим, что оценка одной или двух ответных реакций организма на воздействие химического вещества, приводит к тому, что большинство токсических эффектов загрязняющих веществ остаются не учтенными и, следовательно, не влияют на итоговое заключение о токсичности исследуемой пробы.

Для решения поставленной задачи о сочетании оперативных оценок токсичности и выявлении экологически значимых эффектов загрязняющих веществ, в том числе отсроченных во времени действий токсикантов, нами предлагается системное биотестирование. Стратегия системного биотестирования заключается в оценке спектра откликов тест-организма: от проявляющихся в первую очередь предлетальных тест-функций до эффектов в ряду поколений подопытных организмов [153]. Целесообразно реализовывать такой подход с использованием базового тест-организма *D. magna*, обладающего искомым набором тест-функций [181].

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

Одним из первых функциональных ответов на изменение качества окружающей среды, ее биотических и абиотических свойств, диагностируемых при прямом визуальном наблюдении за мезо- и макрогидробионтами, является изменение их двигательной активности по сравнению с поведением в незагрязненной контрольной среде [276, 290]. У низших ракообразных *D. magna* двигательную активность можно использовать в качестве экспрессной тест-функции для биотестирования водных сред [175, 183, 292].

В мировой практике биотестирования уже есть успешные попытки оценки двигательной активности *D. magna*. Коллективом немецких

исследователей разработан метод определения двигательной активности рачков в части их скорости передвижения, расстояния между дафниями, с подсчетом их количества и определением индекса токсичности. Для этого используется специально разработанный программный продукт [369]. Фрактальный анализ сложности и характера движения рачков лежит в основе определения токсичности в подходе других авторов [331, 373].

Из многочисленных ответных реакций *D. magna* на воздействие химического фактора двигательная активность относится не только к предлетальным тест-функциям, доступным для оперативного учета, но и может быть оценена визуальным способом [177]. Возможность визуальной оценки ответной реакции тест-организма, наиболее распространенного в практике биотестирования по всему миру, позволяет методу быть конкурентоспособным по сравнению с новыми высокотехнологичными биотестами.

Получение оперативного ответа о токсичности тестируемой среды основано на способности тест-организмов *D. magna* реагировать на присутствие в водных средах веществ, оказывающих на них токсическое действие, которое проявляется в интегральной функционально-поведенческой реакции – изменении двигательной (моторной) активности.

Для регистрации двигательной активности *D. magna* нами было апробировано несколько вариантов выполнения измерений. При этом определяли [199]:

- оптимальную экспозицию подопытных организмов в тестируемой среде;
- время учета двигательной активности;
- минимально необходимый объем пробы для регистрации параметра;
- внешний вид палетки, на пересечении условных линий которой происходит регистрируемое событие.

В результате испытаний различных вариантов регистрации двигательной активности дафний, количественная оценка данной тест-

функции, производилась путем визуального подсчета количества пересечений рачком условных линий наблюдаемого поля зрения в течение 5 минут. Был подобран оптимальный размер ячеек палетки (5•5 мм). Параметр выражали в количестве пересечений линий (к.п.л.).

Алгоритм эксперимента:

1. В три химических стакана с объемом тестируемой среды 50 мл поместить по 3 рачка *D. magna* в возрасте не более 24 часов.

2. Спустя 1 час экспозиции в емкость для измерений с объемом тестируемой среды 15 мл поочередно перемещать каждую дафнию из каждой параллели опыта. Используется узкий высокий химический стакан объемом 50 мл.

3. Произвести подсчет количества пересечений рачком линий палетки в течение 5 минут. Учет параметра провести у каждой дафнии (всего 9 измерений).

4. Дафнии после учета двигательной активности возвращаются в исходные опытные емкости для продолжения эксперимента.

5. Повторить измерения через 24 часа. Для получения данных о динамике токсического процесса рекомендуется проводить измерения через 3 часа, а также 1, 2, 3, 4 суток экспозиции.

Полученные данные обрабатываются методами математической статистики с вычислением средних значений, стандартных отклонений и критерия Стьюдента для установления наличия математически значимой разницы с контрольными значениями. Критерием токсического действия является математически значимое различие показателя двигательной активности *D. magna* в пробе, не содержащей токсических веществ (контроль), и в анализируемой пробе (опыт).

Для подтверждения экспрессности и информативности предложенного биотеста проводили три серии экспериментов:

– оценку токсичности модельных растворов с витальными и летальными дозами ТМ,

– оценку токсичности водных вытяжек из урбаноземов, антропогенно загрязненных ТМ;

– оценку токсичности природных вод, пробы которых характеризовались высоким содержанием минеральных соединений азота.

3.2.1.1. Апробация экспресс-биотеста на модельных водных средах

В первой серии опытов тестировались растворы с добавками витальных и летальных доз ТМ. В таблице 34 представлены результаты, полученные при воздействии ионов меди на *D. magna*. Токсикантом служил медный купорос ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), дозы выражены в массовых концентрациях и приведены к предельно допустимым концентрациям для меди.

Таблица 34 – Влияние витальных и летальных доз ионов меди на двигательную активность *D. magna*

Вариант		Двигательная активность, к.п.л.	
		1 час	24 часа
Контрольные значения для витальных концентраций		161,7±17,6	140,7±10,1
Витальные дозы	0,001 мг/дм ³ 0,001 ПДКп=1 ПДКр.х.	164,3±16,3	169,0±20,4
	0,005 мг/дм ³ 0,005 ПДКп=5 ПДКр.х.	172,3±20,5	139,0±8,7
	0,01 мг/дм ³ 0,01 ПДКп=10 ПДКр.х.	172,0±28,6	119,7±5,5*
Контроль для летальных концентраций		190,3±11,6	139,5±9,8
Летальные дозы	0,1 мг/дм ³ 0,1 ПДКп=100 ПДКр.х.	176,0±23,6	181,0±15,6**
	0,5 мг/дм ³ 0,5 ПДКп=500 ПДКр.х.	149,3±17,8*	гибель через 3-5 ч.
	1 мг/дм ³ 1 ПДКп=1000 ПДКр.х.	153,7±4,2*	гибель через 1,5-2 ч.

Примечание: ПДКп – норматив для питьевых вод; ПДКр.х. – норматив для водоемов рыбохозяйственного назначения; * - достоверное уменьшение показателя по сравнению с контрольными значениями; ** - достоверное увеличение показателя по сравнению с контрольными значениями.

Витальные дозы меди через час экспозиции привели к недостоверной тенденции повышения двигательной активности рачков. Тяготение эффекта к стимуляции в данном диапазоне концентраций меди вполне закономерно, так как медь в микродозах является элементом, необходимым для большинства животных. Однако через сутки для максимальной витальной дозы было установлено достоверное угнетение подвижности рачков, что демонстрирует переход от положительного действия микроэлемента к проявлению его токсических свойств.

Летальные дозы, равные 500 и 1000 ПДКр.х., оказывали достоверное угнетающее действие на дафний. Их токсичность удалось диагностировать раньше, чем по показателю гибели. Воздействие выбранных концентраций демонстрирует незначительный временной разрыв между проявлением ответной реакции «двигательная активность» и «смертность», однако, это частные эффекты данного вещества в указанной концентрации. Для других веществ этот интервал времени может быть значительно больше (см. ниже). Кроме того, при тестировании реальных проб и проявлении эффектов совместного действия веществ этот интервал также может увеличиться.

Концентрация меди соответствующая 100 ПДКр.х. вызвала достоверный стимулирующий эффект в отношении двигательной активности дафний, но для вынесения заключения о токсичности пробы по стимуляции показателя необходимо провести масштабные испытания методики, которые позволят выявить объективный критерий наличия токсического действия при условии стимуляции анализируемой жизненной функции.

Аналогичные испытания были проведены с использованием в качестве модельного токсиканта сульфата цинка семиводного ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (табл. 35).

Таблица 35 – Влияние витальных и летальных доз ионов цинка на двигательную активность *D. magna*

Вариант		Двигательная активность, к.п.л.	
		1 час	24 часа
Контрольные значения для витальных концентраций		171,0±6,1	154,3±4,0
Витальные дозы	0,05 мг/дм ³ 0,01 ПДКп=1 ПДКр.х.	156,7±10,3	140,0±8,7
	0,5 мг/дм ³ 0,1 ПДКп=10 ПДКр.х.	153,0±25,9	114,7±9,5*
	5 мг/дм ³ 1 ПДКп=100 ПДКр.х.	147,3±11,5*	132,0±10,6*
Контроль для летальных концентраций		150,3±7,1	155,0±4,0
Летальные дозы	50 мг/дм ³ 10 ПДКп=1000 ПДКр.х.	131,3±5,7*	66,3±11,3* гибель через 30 ч.
	500 мг/дм ³ 100 ПДКп=10000 ПДКр.х.	128,7±9,5*	гибель через 15 ч.

Примечание: обозначения, как в таблице 34.

При добавке в культивационную воду модельного токсиканта кристаллогидрата сульфата цинка с наименьшей испытуемой концентрацией (0,05 мг/дм³) значимых отличий в двигательной активности не обнаружено, хотя результаты подтверждают общую тенденцию постепенного угнетения тест-функции. Увеличение добавки токсиканта до концентрации соответствующей 10 ПДКр.х. (0,5 мг/дм³) позволило выявить отличия от контроля через сутки, а на максимальную из витальных доз отклик был получен уже через час и сохранялся через сутки. Летальные концентрации цинка угнетали двигательную активность в еще большей степени.

Апробация методики с сульфатом цинка в качестве модельного токсиканта показала, что в определенных случаях летальное действие можно прогнозировать уже спустя час экспозиции.

3.2.1.2. Исследование нативных сред с использованием биотеста по двигательной активности *D. magna*

Апробация методики при оценке токсичности почв. Апробация методики была продолжена при исследовании интегральной токсичности урбаноземов, отобранных в районе воздействия металлургического предприятия г. Владикавказ. Пробы отличались комплексным антропогенным загрязнением ТМ. Кратность превышения ПДК для валовых форм цинка составляла от 12 до 37,5 раз, для соединений свинца от 1,2 до 92 раз [106].

Из проб урбаноземов готовились водные вытяжки с соотношением твердой и жидкой фаз 1:4. Далее проводили биотестирование полученных экстрактов. Двигательную активность *D. magna* измеряли 6 раз для выяснения стабильности в реагировании дафний через их моторную активность (табл. 36).

Таблица 36 – Двигательная активность *D. magna* в вытяжках из урбаноземов, загрязненных ТМ

Вариант	Экспозиция / двигательная активность, к.п.л.					
	1 час	3 часа	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки
К	129,1±6,9	132,7±6,9	130,8±7,0	139,9±6,7	148,3±5,7	156,0±2,2
№7	125,6±3,1	125,6±4,5	124,2±4,7	128±4,3*	128,6±5,5*	131,3±4,7*
№4	123,6±6,8	105,4±7,5*	104,7±5,7*	100,1±6,1*	101,2±8,4*	102,1±3,8*
№6	133,4±5,7	136,1±7,4	138,4±8,5	139,7±7,1	146,7±4,9	146,7±4,4*

Примечания: * - значения достоверно отличаются от контрольных ($p < 0,05$).

Статистически значимое угнетение двигательной активности в опытах с урбаноземами отмечалось для разных образцов, начиная с экспозиции 3 часа и заканчивая проявлением реакции на третьи сутки для разных проб. В любом случае, такая диагностика дает «ответ» о наличии токсичности раньше, чем 96 часов необходимой экспозиции для установления токсичности по гибели *D. magna*. Отметим также, что реакция остается стабильной в течение всего времени эксперимента по апробации: впервые зарегистрированное угнетение

двигательной функции, отмечается и при последующих измерениях тест-функции.

Для анализа чувствительности метода приводим таблицу 37.

Таблица 37 – Проявление тест-функций смертности и двигательной активности *D. magna* в зависимости от степени загрязнения пробы

Вариант	Смертность <i>D. magna</i> , %	Первая регистрация угнетения активности	Суммарный показатель загрязнения*
Контроль	0	-	-
Проба №4	6,7±1,5	через 3 часа	57,6 (опасное загрязнение)
Проба №7	0	через 2 суток	16,1 (умеренно опасное загрязнение)
Проба №6	0	через 3 суток	1,1 (допустимое загрязнение)

Примечание: * - Суммарный показатель загрязнения – суммарный показатель загрязнения, вычисленный с учетом концентраций ТМ, превышающих установленные нормативы [76, 417].

Полученные данные свидетельствуют о том, что с помощью тест-функции смертности *D. magna* часто не удается диагностировать токсичность даже в случае высоких уровней загрязнения. В то же время двигательная активность тех же организмов позволяет сделать адекватное заключение о токсичности, причем в короткие сроки эксперимента. Особо отметим, что низкая информативность *D. magna* в случае определения смертности особей, связана не с низкой чувствительностью тест-организма в целом, а с буферными свойствами почв и природных вод. Селективная сорбция ионов загрязняющих веществ твердыми частицами почвы и органическим веществом вод, а также их связывание в процессе комплексообразования приводит к значительному снижению биодоступности многих элементов, в том числе тяжелых металлов [106, 144, 205]. Этот процесс, в свою очередь, приводит к занижению показателей токсичности либо проявлению отсроченных эффектов, крайне опасных в реальных экосистемах [167]. Поэтому разработка методов биотестирования с использованием оценки сублетальных эффектов и включение их в системное биотестирование

является важным направлением для оценки экологически значимых эффектов токсикантов.

Апробация методики при оценке токсичности поверхностных вод.

В целях подтверждения эффективности методики для биотестирования природных вод, были исследованы пробы из водоемов техногенных ландшафтов, сформированных вокруг г. Кирово-Чепецка (Кировская область). Одними из наиболее распространенных загрязняющими веществами в данных пробах являются минеральные формы азота: ионы аммония и нитрат-ионы [98, 197].

Часть проб отличалась превышением норматива для культурно-бытовых вод по ионам аммония в сотни раз, по нитрат-ионам в десятки раз. Такие наиболее загрязненные пробы оказывали острое токсическое действие в биотесте на *D. magna* по показателю гибели. Однако были и такие пробы, в которых ПДКк.б. [1] для минеральных форм азота были превышены, но гибели рачков не наблюдалось [182]. Токсичность этих проб оценивали по изменению двигательной активности *D. magna*. Результаты представлены в таблице 38.

Таблица 38 – Результаты исследования поверхностных вод техногенного ландшафта вокруг г. Кирово-Чепецка

№ пробы	Двигательная активность, количество пересечений условных линий				Содержание минеральных форм азота, мг/дм ³	
	через 1 час		через 24 часа		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
	контроль	опыт	контроль	опыт		
6	159,0±6,2	151,1±5,9	177,0±4,8	128,2±7,5*	5,9±1,2	8,5±1,0
3	154,6±10,0	150±5,8	179,3±3,4	128,5±5,4*	6,1±1,3	62±7
4	158,7±7,7	151,1±4,5	171,6±3,8	136,0±3,3*	3,8±0,8	3,9±0,5
12	155,5±7,3	146,8±5,2*	172,7±6,2	143,5±3,2*	0,74±0,26	29,7±3,6
7	148,8±4,1	135,5±4,3*	175,1±4,6	106,1±4,7*	10900±2300	9800±1200
11	165,8±6,1	142,3±5,2*	175,6±6,81	147,7±4,8*	43±9	111±13
9	159,5±6,1	151,6±4,3*	170,0±4,5	132±3,5*	8,4±1,8	54±6
14	162,6±8,5	141,6±5,3*	173,7±5,6	144,1±4,4*	44±9	380±50

Примечания: * - значения достоверно отличаются от контрольных (p<0,05); ПДКк.б. для (NH₄⁺) по азоту 1,5 мг/дм³, для (NO₃⁻) – 45 [1].

По данным таблицам следует, что статистически значимое угнетение двигательной активности в большинстве проб наблюдается уже через час экспозиции. Через сутки все пробы снижают способность дафний активно двигаться. Привлекает внимание проба № 7, в которой содержание ионов аммония превышает норматив в 5646 раз, а нитрат-ионов в 218 раз. Данная проба оказывает летальное действие на *D. magna*, но после суток экспозиции. Оценка двигательной активности позволила сделать заключение о ее токсичности уже через 1 час [182, 199]. Для анализа полученных результатов приводим таблицу 39.

Таблица 39 – Степень угнетения двигательной активности *D. magna* и зависимость между содержанием минеральных форм азота и тест-функцией

№ пробы	Угнетение активности <i>D. m.</i> через 1 час, раз	Коэффициент корреляции между содержанием минеральных форм азота и тест-функцией через 1 час		Угнетение двигательной активности <i>D. m.</i> через 24 часа, раз	Коэффициент корреляции между содержанием минеральных форм азота и тест-функцией через 24 часа	
		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
6	1,1	-0,74	-0,53	1,4	-0,83	-0,23
3	0			1,4		
4	1,1			1,3		
12	1,1			1,2		
7	1,1			1,7		
11	1,2			1,2		
9	1,1			1,3		
14	1,2			1,2		

Угнетение двигательной активности через 1 час воздействия оказалось минимальным, но в большинстве случаев достаточным для заключения о наличии токсического действия: критерием являлось математически достоверное отличие от контрольных значений. Через сутки экспозиции замедление движений дафний становится более весомым. Максимальное снижение показателя наблюдаем для пробы №7, в которой высокое азотное загрязнение приводит впоследствии к 100%-ной гибели организмов.

Полученные коэффициенты корреляции Пирсона подтверждают информативность метода при исследовании вод с минеральным загрязнением. Наиболее тесная отрицательная зависимость проявилась между снижением двигательной активности и концентрацией ионов аммония, причем коэффициент корреляции возрастает через сутки воздействия. Зависимость между оцениваемой тест-функцией и содержанием нитрат-ионов напротив ослабляется через сутки. Эти результаты говорят о превалирующем вкладе ионов аммония по сравнению с нитрат-ионами в формирование токсических эффектов при их совместном присутствии.

Таким образом, проведенные испытания показали, что оценка предлетальной тест-функции, в нашем случае – двигательной активности дафний, оказывается предпочтительней, чем ориентация на учет смертности или иммобилизации организмов. Предложенный метод биотестирования является экспрессным и доступен для использования без специального оборудования.

D. magna является ценным тест-организмом с позиции множества предлетальных тест-функций, которые уже предложены и внедрены в практику биотестирования. Однако оценка этих тест-функций по отдельности не дает полной картины воздействия пробы или конкретного вещества на живой организм. В следующем разделе представлена разработка и апробация системного биотестирования, основанного на оценке нескольких основных тест-функций базового тест-организма. Такой подход приближает биотестирование к ответам на вопросы не только о токсичности исследуемого образца, но и о механизмах оказанного воздействия, а также позволяет выявлять экологически значимые эффекты токсикантов.

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

На международном симпозиуме в октябре 2016 г. «Биодиагностика и оценка качества природной среды...» О. Ф. Филенко и В. А. Терехова в числе методологических проблем биотестирования обозначили «давнее противоречие между потребностью в быстрых оценках токсичности и экологической надежностью этих оценок». «Редко, когда 2–3 суточные опыты адекватно характеризуют биологическую и экологическую угрозу конкретного загрязнения» [47, 253]. Действительно, в ряде случаев при исследованиях на первое место выходит не скорость проведения биотеста, а подробность и объективность получаемой информации. Поэтому неоправданное сокращение длительности испытаний не должно коснуться всей группы методов. Крайне необходимо развивать методы, позволяющие оценивать отдаленные биологические эффекты.

Не менее важно предложить пользователям методик биотестирования удобные во многих отношениях биотесты. Науке известны десятки чувствительных методов, не нашедших широкого применения по причинам сложности культивирования тест-организмов и алгоритмов самого биотеста. Поэтому использование низших ракообразных *D. magna*, представленных как базовый тест-организм, целесообразно для разработки стратегии биотестирования, включающей системное биотестирование по спектру ответных реакций подопытных организмов. Исследования, включающие разработку и апробацию системного биотестирования, представлены ниже.

3.2.2.1. Спектр тест-функций *D. magna* для системного биотестирования

Для реализации системного биотестирования были объединены несколько тест-функций *D. magna*, проявляющихся в разное время эксперимента в зависимости от токсичности действующих веществ и их химической природы [154, 161]. В системный биотест включили те реакции

D. magna, которые относительно легко диагностируются и являются распространенными в мировой практике биотестирования с помощью низших ракообразных [26, 28, 29, 30, 130, 154] (табл. 40). Тест-функции, основанные на изменении биохимических показателей рачков, напротив не использовали по причине высокой трудоемкости и необходимости более высокой квалификации исполнителей, а также дополнительных материальных затрат на материалы и реактивы.

Таблица 40 – Перечень тест-функций, используемых для комплексной оценки токсичности водных сред

Тест-функция	Способ учета	Необходимость специальных приборов	Необходимая экспозиция для учета тест-функции
Смертность	Визуальный	Нет	96 часов
Двигательная активность	Визуальный	Нет	3-96 часов
Трофическая активность	Приборный	ИПС-03 или спектрофотометр	5 суток
Задержка или стимуляция созревания особей (по выводковым камерам)	Визуальный + микроскопирование	Микроскоп	5-10 суток
Уменьшение линейных размеров	Микроскопирование	Микроскоп с микрометром	10 и 25 суток
Пигментация тела	Визуальный	Нет	25 суток
Задержка появления первого потомства	Визуальный	Нет	7-12 суток
Качество «молоди»	Визуальный + микроскопирование	Микроскоп с микрометром	25 суток
Плодовитость	Визуальный	Нет	25 суток
Доля абортивных яиц от общего количества молоди	Визуальный	Нет	Весь жизненный цикл
Средняя продолжительность жизни	Визуальный	Нет	Весь жизненный цикл
Смертность особей в поколениях F2 и F3	Визуальный	Нет	25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколения F2 и F3
Плодовитость в поколениях F2 и F3	Визуальный	Нет	25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколения F2 и F3
Доля абортивных яиц от общего числа молоди в поколениях F2 и F3	Визуальный	Нет	25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколения F2 и F3

Ряд указанных в таблице 40 тест-функций не требует дополнительных пояснений в части методов их регистрации. К таким тест-функциям относятся смертность, линейные размеры тела, задержка появления первого потомства, плодовитость. Другие тест-функции требуют точного указания алгоритмов учета. В научной литературе встречается использование этих показателей токсичности, но в большинстве случаев не описаны подробные методы их регистрации.

Учет трофической активности *D. magna*. Показатель трофической, иначе – фильтрационной активности низших ракообразных, используется в исследованиях качества окружающей среды [117, 135, 273, 299].

Принцип метода: рачков *D. magna* ежедневно кормят суспензией одноклеточных водорослей из расчета 1 мл суспензии и на 100 мл водной среды обитания. По способу питания дафнии относятся к фильтраторам. В случае снижения их пищевой (фильтрационной активности) клетки водоросли *S. quadricauda* будут окрашивать водную среду в слабо-зеленую окраску. Измерение различий в окраске контрольных и опытных растворов позволяет судить о наличии или отсутствии угнетения пищевой активности *D. magna*.

Необходимость специального оборудования: прибор типа спектрофотометр с возможностью установки длины волны 560 нм. Рекомендуется использовать прибор ИПС-03 (измеритель плотности суспензии), предназначенный для подобных измерений.

Операции биотестирования:

- постановка эксперимента согласно алгоритму аттестованной методики [23];
- ежедневное кормление контрольных и опытных рачков;
- на 5 сутки эксперимента тестируемые растворы планово меняются, дафнии пересаживаются в свежие среды;

– использованные растворы, освобожденные от рачков, перемешиваются стеклянной палочкой для перемещения клеток водорослей в толщу раствора;

– измеряется оптическая плотность в каждой параллели контроля и опыта;

– в случае гибели всех опытных рачков раньше этого времени показатель может быть измерен в момент прекращения эксперимента;

– рассчитывается абсолютное и относительное увеличение оптической плотности опытных растворов для каждой параллели опыта по формулам:

$$T_{\text{ф абс.}} = D_{\text{оп}} / D_{\text{к}},$$

$$T_{\text{ф отн.}} = (D_{\text{оп}} / D_{\text{к}}) \cdot 100\%, \text{ где}$$

$T_{\text{ф абс.}}$ и $T_{\text{ф отн.}}$ – показатели снижения трофической (фильтрационной) активности рачков в абсолютном и относительном выражении, $D_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытного раствора, $D_{\text{к}}$ – оптическая плотность контрольной среды;

– проводится стандартная обработка результатов (2.3.6).

– делается вывод о наличии/отсутствии угнетения пищевой активности *D. magna* под воздействием веществ в тестируемой пробе: если оптическая плотность опытных растворов выше, чем в контрольной в 2 и более раз, то наблюдается угнетение пищевой активности *D. magna*, если менее 2 раз – угнетения пищевой активности не наблюдается.

Учет двигательной активности. Оценка моторной (двигательной) активности *D. magna* известна в практике биотестирования [331, 369]. Предложенный нами метод отличается точная алгоритмизация действий оператора, использование элементарного математического аппарата для оценки наличия значимых отличий опытных значений от контрольных. В разделе 3.2.1 описаны этапы разработки метода и ее апробация.

Операции биотестирования для учета двигательной активности:

– учет двигательной активности может производиться у рачков опытных и контрольных модельных групп, сформированных для оценки

других тест-функций (смертности, трофической активности, плодовитости и т.д.). В этом случае для начальной постановки опыта используются алгоритмы аттестованной методики (см. раздел 2.3.1).

- если в задачу эксперимента входит только оценка токсичности водной среды по изменению двигательной активности, то для постановки опыта необходимо поместить по 3 рачка в 30 мл опытной и контрольной водных сред в широкие химические стаканы вместимостью 50 мл. Повторность опыта трехкратная, то есть для исследования одной пробы потребуется 18 рачков (9 для опыта и 9 для контроля). Возраст рачков – не более 24 часов;

- через 3 часа и 24 часа производится учет тест-функции (чаще – для анализа динамики процесса). Для этого используется регулярная палетка со стороной квадрата 5 мм;

- спустя указанное время экспозиции дафнии по одной отсаживаются в высокий химический стакан вместимостью 50 мл, диаметр стакана 4 см. В стакан предварительно наливается 15 мл тестируемой водной среды.

- стакан с дафнией устанавливается на палетку. Регулируется освещение: оно должно быть максимально равномерным, падающим сверху или со всех сторон, в ином случае дафния будет стремиться плавать в зоне максимального освещения, что может исказить результаты опыта;

- после пересадки рачка в стакан для измерения параметра до момента начала измерения должно пройти не менее минуты. В течение этого времени повышенная активность рачка в ответ на физический контакт приходит в норму;

- измерение двигательной активности проводится путем подсчета количества пересечений дафнией условных линий наблюдаемого поля зрения (палетки) в течение 5 минут;

- параметр выражается в количестве пересечений линий (к.п.л.);

- полученные данные обрабатываются методами математической статистики;

– критерием токсического действия считается математически значимое различие показателя двигательной активности *D. magna* в пробе, не содержащей токсических веществ (контроль), и в анализируемой пробе (опыт);

– ранжирование уровня токсичности по изменению тест-функции двигательной активности рассмотрено ниже.

Учет отклонений в развитии молоди («качество» молоди). В литературе описаны различные варианты морфологических отклонений от нормы, которые могут возникать у представителей рода *Daphnia* при воздействии химических веществ и биологических факторов [100, 301, 402]. Чаще всего изменчивость биологических параметров затрагивает размер тела, форму тела, форму переднего края головы, длину хвостовой иглы, диаметр глаза.

Мы предлагаем оценивать признаки молоди *D. magna* (возраст до 24 ч.), которые легко диагностируются визуально с помощью микроскопа. Измерений морфологических параметров не требуется, фиксируется количество появившихся отклонений от нормы в каждом опытном варианте.

Для оценки качества молоди проводятся следующие операции биотестирования:

– появившаяся молодь дафний оценивается в длительных экспериментах, нацеленных на установление хронических токсических эффектов. Постановка опыта описана в разделе 2.3.1;

– ежедневная отсадка молоди производится в химические стаканы или фарфоровые чаши, отдельные для каждой параллели опытных и контрольных вариантов;

– молодь просматривается под лупой с 5–10-кратным увеличением, выбирается 5–10 особей для оценки морфологических признаков под микроскопом;

– при выборе предпочтение отдадут молодым рачкам со слабыми движениями, мелкими размерами, бледными покровами для диагностирования возможных морфологических отклонений;

– визуально без микроскопирования определяется наличие мертворожденной молоди, у которой также просматриваются имеющиеся морфологические аномалии;

– диагностике и учету обязательно подлежат: деформации раковин, деформации хвостовой иглы (изогнутость, отсутствие), отсутствие щетинок на антеннах;

– в рабочем журнале фиксируется вид и количество выявленных отклонений в течение опыта;

– если количество отклонений, включая мертворожденную молодь, объединяемых в тест-функцию «качество молоди», превышает 10% от общего числа молоди для варианта, то делается вывод о потенциальном тератогенном действии пробы. Ранжирование степени проявления эффектов рассмотрено ниже.

Особо отметим, что изучение эмбриотоксических и тератогенных эффектов является сложной научно-исследовательской задачей, реализуемой в условиях специализированных токсикологических лабораторий, поэтому биотесты с *D. magna* могут служить основанием только для вывода о потенциальных эмбриотоксических и тератогенных эффектах. При необходимости данные эффекты должны подтверждаться в специальных тестах.

Учет абортивных яиц и расчет их доли от общего числа молоди.

Абортивные яйца – патологическое отклонение в развитии эмбрионов *D. magna*, которое может быть связано с недостатком корма, освещенности, колебанием температуры и качеством воды. Если условия культивирования *D. magna* оптимальны, то количество яиц в контроле не превышает 10%, а массовое появление абортивных яиц в опытных вариантах связано с действием химических веществ в пробе [12, 126].

В Приказе Росрыболовства от 04.08.2009 № 695 «Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения» предполагается установление эмбриотропного токсического действия, если «реальная плодовитость значительно снижена за счет абортивных яиц» [12]. При этом строгие критерии эмбриотоксического действия не введены.

Мы предлагаем выполнять следующие операции при биотестировании с помощью *D. magna* для учета и интерпретации количества абортивных яиц у модельных групп в токсикологическом эксперименте:

- постановка эксперимента и основные алгоритмы действий соответствуют проведению опыта на установление хронического токсического действия по изменению плодовитости *D. magna* [23];

- с момента начала партеногенетического размножения *D. magna* в контрольных и опытных вариантах эксперимента необходимо отлавливать и учитывать не только обилие приплода, но и количество абортивных яиц. Они хорошо видны невооруженным глазом, представляют собой мелкие круглые образования от светло-коричневого до темно-зеленого и черного цвета (см. Приложение 10);

- абортивные яйца вылавливаются из водной среды стеклянной трубочкой и отбрасываются вместе с молодью;

- учитываются как яйца, лежащие на дне сосудов (стаканов для опыта), так и те яйца, которые остаются в покровах рачков после линьки;

- в рабочих журналах количество абортивных яиц обозначается с буквенным шифром «Я»;

- в конце эксперимента (24 дня или полный цикл жизни рачков – в зависимости от задач опыта) подсчитывается суммарное количество абортивных яиц в каждой параллели опыта, высчитывается среднее значение

показателя для варианта и определяется доля абортивных яиц от общего числа молодежи по формуле:

$$E_{\text{отн.}} = (E_{\text{оп.}} / J_{\text{оп.}}) \cdot 100\%, \text{ где}$$

$E_{\text{отн.}}$ – доля абортивных яиц от общего числа молодежи в данном опытном варианте, $E_{\text{оп.}}$ – среднее количество абортивных яиц в данном опытном варианте за весь период эксперимента, $J_{\text{оп.}}$ – среднее количество молодежи, появившееся в данном опытном варианте за весь период эксперимента.

– критерием хронического токсического действия пробы эмбриотропного характера является превышение доли абортивных яиц от общего числа молодежи на 20% и более при условии, что в контрольном варианте абортивных яиц не более 10% от среднего числа молодежи для контрольных параллелей.

– чем выше значение показателя $E_{\text{отн.}}$, тем более выраженным эмбриотропным эффектом обладает проба.

Формирование генераций F2, F3...Fn при оценке токсических эффектов в ряду поколений. Многие загрязняющие вещества оказываются в окружающей среде в количестве, не приводящем к острым токсическим эффектам. При этом могут сохраняться отсроченные действия веществ, проявляющиеся, например, в сокращении продолжительности жизни особей, снижении жизнеспособности потомства, выявлении токсических эффектов в поколениях, появившихся после химического воздействия. Например, в работе [201] показано, что 50,0 и 25,0 мг/л раундапа (в пересчете на глифосат) негативно влияет на морфологические параметры *D. magna* только с IV поколения. Относительно короткий жизненный цикл *D. magna* позволяет исследовать возможные токсические эффекты в ряду нескольких поколений организмов.

В большинстве работ схемы формирования генераций дафний не описаны, несмотря на возможное разнообразие подходов: использование различных по времени появления приплодов в условном первом поколении, поддержание генераций, соответствующих параллелям опыта или варианту в

целом, помещение новых поколений рачков в тестируемую (загрязненную) среду или напротив – снятие с них нагрузки в условно чистой контрольной среде.

В Методических указаниях по разработке нормативов качества воды [12] рекомендуется использовать первый приплод дафний для формирования рядов их поколений. Нами предлагается иной подход, выработанный в ходе постановки многочисленных опытов по оценке эффектов в ряду поколений *D. magna*, апробированный в работе.

Операции биотестирования при оценке токсических эффектов в ряду поколений *D. magna*:

– в начале опыта действия соответствуют постановке эксперимента на установление хронического токсического действия. Регистрируется время созревания и первого приплода в каждой параллели опытных и контрольных вариантов. Первый приплод рачков учитывается в общей плодовитости, но не используется для формирования последующего поколения, что связано с его малочисленностью и возможными расхождениями на 1–2 дня в моменте появления первой молоди у подопытных организмов;

– из второго или третьего приплода формируется последующее опытное поколение рачков. Постановка такого эксперимента может быть осложнена снижением плодовитости дафний в тестируемых водных средах, поэтому допускается формирование модельных групп F2 (второго поколения) в течение двух суток. Данная возрастная разница впоследствии нивелируется и не искажает итоговый результат;

– молодь предыдущего поколения, например, F1 должна быть собрана в отдельные емкости (химические стаканы), наполненные тестируемой средой, каждая емкость должна соответствовать одной из трех параллелей опыта, то есть молодь, полученная в разных параллелях одного варианта не смешивается;

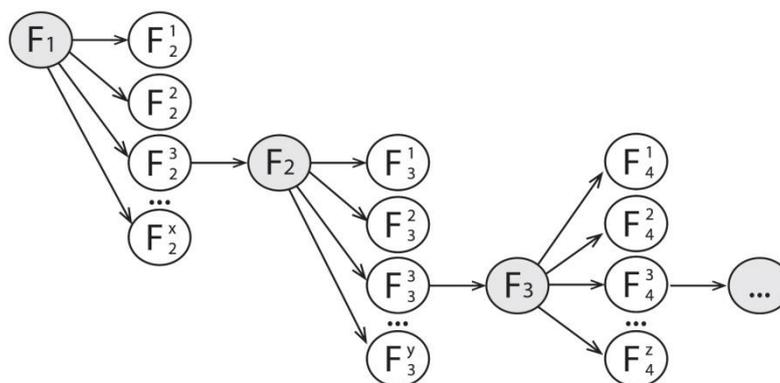
– постановка опыта с поколением F_n аналогична началу эксперимента с условным первым поколением (F1): рачки рассаживаются в тестируемые

среды объемом 100 мл по 10 штук. При выборе особей для следующей генерации исключаются наиболее слабые нежизнеспособные рачки – они могут быть использованы для изучения морфологических отклонений. В общем случае модельная группа формируется из наиболее типичных для наблюдаемой совокупности особей;

– последующие поколения формируются аналогично. Минимум генераций для оценки отсроченных эффектов в ряду поколений – 3, большее количество поколений наблюдается для решения конкретных научно-исследовательских задач;

– в ряду поколений минимально необходимым набором тест-функций являются смертность и плодовитость особей. Колебания значений этих тест-функций относительно контрольных величин могут быть ранжированы в зависимости от степени проявления эффекта (см. ниже);

– общая схема формирования второго и последующих поколений представлена на рисунке 14:



Обозначения: F_1 – первое поколение рачков, содержащихся в контрольных и опытных вариантах текущего опыта, полученное от синхронизированной культуры *D. magna*; F_2 – второе поколение *D. magna*, сформированное из молоди опытных и контрольных вариантов (и далее аналогично); верхний индекс – порядковый номер поколения *D. magna*, нижний индекс – порядковый номер параллели опыта

Рисунок 14 – Схема проведения токсикологического эксперимента с использованием *D. magna* в нескольких поколениях

Описанные методы учета разнообразных тест-функций *D. magna* далее включены в системное биотестирование с оценкой спектра тест-функций рачков и ранжированием степени токсичности тестируемых сред.

3.2.2.2. Разработка системного биотеста по последовательной оценке спектра тест-функций *D. magna*

В разработку системного биотеста по последовательной оценке спектра тест-функций *D. magna* входили:

- предварительный выбор тест-функций по критериям доступности для учета и их последовательного проявления во времени;
- создание опорной схемы комплексного биотестирования по реакциям *D. magna* как основы для разработки рабочих инструкций «на местах» (в аккредитованных и научно-исследовательских лабораториях);
- разработка порядка и алгоритмов реализации подхода;
- ранжирование степени проявления тест-функции для облегчения интерпретации результатов.

Проведение биотестирования в течение всего жизненного цикла условного первого поколения *D. magna* и 25 дней жизни рачков второго и третьего поколений позволяет отслеживать три основных вида эффектов в зависимости от продолжительности контакта тестируемой водной среды и организма (по классификации С. А. Куценко [125]):

- летальный эффект, проявляющийся при острой интоксикации, развивающейся в результате действия веществ в течение ограниченного периода времени (как правило, до нескольких суток);
- нелетальные эффекты, проявляющиеся при подострой интоксикации, развивающейся в результате непрерывного во времени действия токсиканта(-ов) продолжительностью до нескольких десятков суток;

– хронические и отсроченные эффекты, проявляющиеся при хронической интоксикации, развивающейся в результате продолжительного действия токсиканта(-ов).

Эффекты диагностируются по тест-функциям, последовательно проявляющимся в течение эксперимента. Разработанная шкала отражает время проявления тест-функций (рис. 15). В зависимости от установленных эффектов токсичность пробы может оцениваться не только качественно, но, по многим показателям, и количественно, а также ранжироваться по интенсивности их проявления.

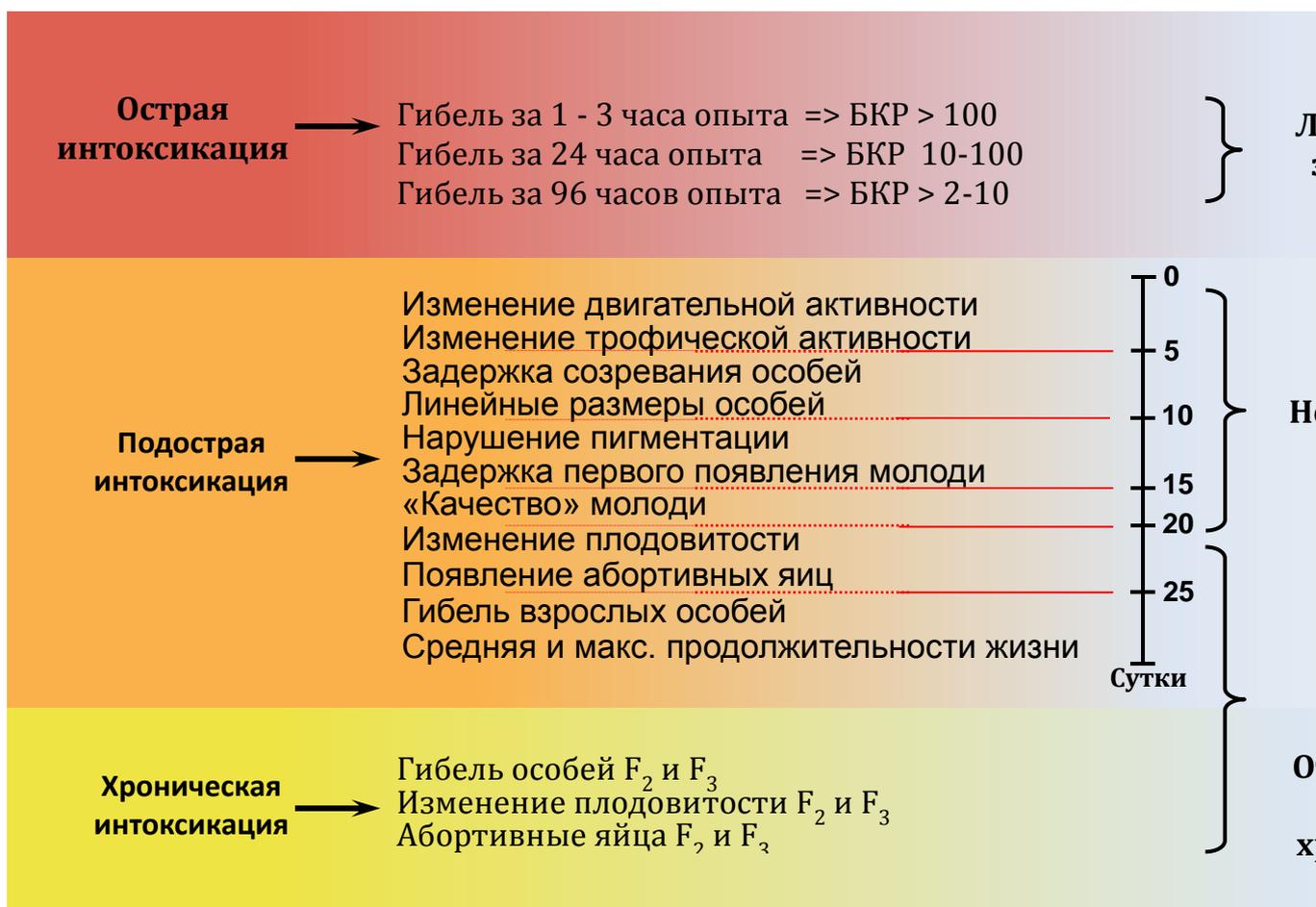


Рисунок 15 – Спектр тест-функций *D. magna* и оцениваемые эффекты для системного биотестирования

К достоинствам разработанной системы биотестов относим:

– возможность её широкого внедрения в практику биотестирования, поскольку тест-объект *D. magna* является наиболее распространенным в биодиагностике;

– возможность ранжирования степени токсичности тестируемых сред;

– оценка нелетальных, летальных, хронических и отсроченных эффектов;

– результаты оформляются по форме протокола, приведенного в Приложении 8.

Порядок проведения исследований согласно схеме на рисунке 15:

1. Постановка эксперимента для определения острой токсичности по тест-функции смертность (гибель) *D. magna* согласно алгоритму методики ФР.1.39.2007.03222 [23], кратко изложенному в главе 2. Опыт проводится в трех основных параллелях и одной дополнительной для дальнейшего определения линейных размеров особей. Учет тест-функции «смертность» производится каждый час первых суток эксперимента и далее ежедневно.

Расчет производится по формуле: $A = ((K - Оп) / K) \cdot 100\%$, где:

A – смертность, %

K – сумма живых особей *D. magna* в трех основных параллелях (стаканах) контроля, шт.

Оп – сумма живых особей *D. magna* в трех основных параллелях (стаканах) опыта, шт.

В случае установления острой токсичности пробы (по гибели более 50% особей), фиксируется время наступления эффекта, в зависимости от которого, согласно рисунку 15, определяется ориентировочная БКР:

– гибель всех опытных особей с течение 1–3 часов свидетельствует о необходимости разбавления токсичной пробы в 100 и более раз для нивелирования острого летального ответа рачков;

– гибель всех опытных особей в течение 4–24 часов включительно свидетельствует о необходимости разбавления токсичной пробы в 10–100 раз для достижения безвредной кратности разбавления;

– гибель всех опытных особей в период с 3-х по 4-е сутки опыта свидетельствует о необходимости разбавления токсичной пробы в 2–10 раз для достижения БКР.

Отметим, что данная шкала является ориентировочной для выбора степени разбавления пробы. БКР уточняется экспериментально. Предложенная градация позволяет сократить трудозатраты по определению показателя БКР по сравнению с методикой ФР.1.39.2007.03222 [23].

Дальнейшие действия проводятся с неразбавленной пробой, если она не является остро токсичной. В ином случае – опыт продолжается с пробой, разбавленной культивационной водой до отсутствия летальных эффектов в течение 96 часов.

2. Учет двигательной активности через 3, 24 и 96 часов с момента постановки опыта. При апробации метода показано, что двигательная активность, как достаточно экспрессная реакция на воздействие, может быть использована для прогноза наличия острой токсичности пробы (по тест-функции «гибель») или хронической токсичности (по тест-функции «плодовитость»), что отражено в таблице 41.

Таблица 41 – Интерпретация результатов учета двигательной активности *D. magna*

Отличия двигательной активности дафний в пробе по сравнению с контрольной средой	Группа токсичности по двигательной активности	Прогноз эффектов, свидетельствующих об острой или хронической токсичности пробы
Отличия не достоверны	I группа	Проба потенциально не токсична в остром и хроническом эксперименте
Отличия достоверны через 3-24 часа экспозиции (включительно)	II группа	Проба потенциально токсична в остром эксперименте
Отличия достоверны через 96 часов	III группа	Проба потенциально токсична в хроническом эксперименте

3. Учет трофической активности с помощью измерителя плотности суспензии (ИПС-03) или спектрофотометра. Определение показателя проводится на 5-е сутки эксперимента в момент смены тестируемых

растворов. В случае гибели всех опытных рачков раньше этого времени показатель может быть измерен в момент прекращения эксперимента.

Рассчитывается абсолютное и относительное увеличение оптической плотности опытных растворов для каждой параллели опыта (если эффект наблюдается). Согласно таблице 42 делается вывод о степени угнетения пищевой активности *D. magna* под воздействием веществ в тестируемой пробе.

Таблица 42 – Интерпретация результатов учета трофической активности *D. magna*

Снижение оптической плотности опытных растворов по сравнению с контрольной средой	Группа токсичности по трофической активности	Заключение о наличии токсического эффекта
Оптическая плотность тестируемой водной среды выше контрольной не более чем в 2 раза	I группа	Проба не обладает нелетальным токсическим действием по показателю угнетения трофической активности
Оптическая плотность тестируемой водной среды выше контрольной в 2–5 раз	II группа	Проба обладает средне выраженным нелетальным токсическим действием по показателю угнетения трофической активности
Оптическая плотность тестируемой водной среды выше контрольной более чем в 5 раз	III группа	Проба обладает высоко выраженным нелетальным токсическим действием по показателю угнетения трофической активности

Угнетение трофической активности *D. magna* по сравнению с контрольными показателями в 2 и более раза чаще всего приводит к последующему проявлению других негативных морфо-физиологических отклонений от нормы. Следовательно, фиксация снижения пищевой активности является как диагностическим признаком свершившегося токсического действия (нелетального), так и имеет прогнозное значение.

4. Определение наличия/отсутствия задержки или стимуляции созревания особей. Производится путем наблюдения за формированием выводковых камер, которые становятся заметны невооруженным взглядом в

контрольных (чистых) пробах, начиная с 5–6 дня эксперимента. При необходимости можно использовать лупу или микроскоп, помещая рачков в крупную каплю воды без травмирования организма. Факт наличия выводковых камер считается установленным при появлении признака у половины и более особей в варианте. В случае появления выводковых камер у рачков, обитающих в тестируемых пробах, на сутки раньше и более, чем в контрольных водах – делается вывод о наличии стимуляции созревания особей. Если выводковые камеры визуально стали заметны позже, чем в контроле на сутки и более, то делается вывод о наличии угнетения созревания дафний веществами пробы (табл. 43).

Таблица 43 – Интерпретация результатов определения задержки/стимуляции созревания *D. magna*

Срок задержки/стимуляции созревания особей	Группа токсичности по задержке/стимуляции созревания <i>D. magna</i>	Заключение о наличии токсического эффекта
Проба не вызывает задержку/стимуляцию созревания особей	I группа	Проба не обладает эмбриотоксическим действием
Проба вызывает задержку/стимуляцию созревания особей на 1–2 суток включительно	II группа	Проба потенциально* обладает эмбриотоксическим действием
Проба вызывает задержку/стимуляцию созревания особей более 2 суток	III группа	Проба потенциально* обладает эмбриотоксическим действием и хроническим токсическим действием

Примечание: * - потенциальность здесь трактуется как возможность проявления указанных токсических действий в ходе дальнейшего эксперимента. Потенциальное эмбриотоксическое действие может проявиться в виде эффекта увеличения доли абортивных яиц от общего количества молоди (см. пункт 10); потенциальное хроническое действие может проявиться в угнетении плодовитости и эффектах хронической интоксикации в поколениях F2 и F3.

5. Учет уменьшения линейных размеров особей *D. magna*: производится на 10-е сутки качественно (отмечено / не отмечено), на 25

сутки прямым измерением рачков дополнительной 4-й параллели опыта под микроскопом с микрометром. Подобные манипуляции всегда повышают риск травмирования особей и искажения дальнейших результатов эксперимента, поэтому для прямых замеров предусмотрена постановка отдельной параллели опыта. Критерий проявления токсического эффекта веществ в пробе по уменьшению размеров тела на 25 день опыта – достоверное отклонение опытных данных от контрольных с дальнейшим присвоением группы токсичности (табл. 44).

Таблица 44 – Интерпретация учета линейных размеров тела *D. magna*

Уменьшение линейных размеров рачков в опытных вариантах от контроля, %	Группа токсичности по тест-функции «линейные размеры тела»	Заключение о наличии токсического эффекта
Отличия не достоверны	I группа	Проба не обладает эффектом уменьшения размеров тела
Отличия достоверны: уменьшение размеров особей в опытных вариантах до 20% включительно	II группа	Проба обладает средне выраженным эффектом уменьшения линейных размеров тела
Отличия достоверны: уменьшение размеров особей в опытных вариантах свыше 20%	III группа	Проба обладает сильно выраженным эффектом уменьшения линейных размеров тела

6. Оценка пигментации *D. magna* на 10 день опыта и 24 день опыта. Эталонном необходимо считать окраску особей, содержащихся в контрольной среде, в случае отсутствия у них признаков отклонения от нормы (гибель контрольных особей более 10%, движения у поверхности воды, постоянное нахождение около дна емкости и т. д.). В зависимости от времени фиксации отклонений выделяются группы токсичности (табл. 45).

Таблица 45 – Интерпретация оценки пигментации *D. magna*

Визуальная диагностика пигментации рачков в опытных пробах по сравнению с контролем	Группа токсичности по тест-функции «пигментация»	Заключение о наличии токсического эффекта
Не отмечается в периоды учета (на 10 и 25 день опыта)	I группа	Проба не обладает эффектом изменения пигментации дафний
Отмечается на 25 день опыта	II группа	Проба обладает средне выраженным эффектом изменения пигментации дафний
Отмечается на 10 день опыта	III группа	Проба обладает сильно выраженным эффектом изменения пигментации дафний

7. Задержка или стимуляция первого появления молоди диагностируется по сравнению с контрольными данными. В зависимости от сезона года первая молодь в контроле появляется с 7 по 12 день эксперимента. Поскольку абсолютной «дружности» вымета молоди среди 10 самок опытного стакана не наблюдается, то отклонениями от текущей нормы следует считать двое и более суток, как в одну, так и другую сторону временной шкалы (табл. 46).

Таблица 46 – Интерпретация оценки задержки/стимуляции первого появления молоди у *D. magna*

Отличия времени первого появления молоди по сравнению с контролем, сут.	Группа токсичности по тест-функции задержки/стимуляции первого появления молоди	Заклучение о наличии токсического эффекта
Задержка/стимуляция на 1–2 суток включительно	I группа	Проба не обладает эффектом задержки/стимуляции появления первой молоди
Задержка/стимуляция от 3 до 5 суток включительно	II группа	Проба обладает средне выраженным эффектом задержки/стимуляции появления первой молоди
Задержка/стимуляция более 5 суток	III группа	Проба обладает сильно выраженным эффектом задержки/стимуляции появления первой молоди

8. Учет отклонений в развитии молоди («качество молоди») производится визуально с помощью лупы у всех рачков в приплоде, выборочно проводится микроскопирование у 5–10 молодых рачков из каждого приплода.

В рабочих журналах для каждой параллели опытов отмечается количество выявленных отклонений с их буквенным обозначением. Обязательному учету подлежат:

- мертворожденная молодь (М),
- деформации раковин (Р),
- деформации хвостовой иглы (И),
- отсутствие щетинок на антеннах (Щ),
- другие возможные отклонения.

В конце опыта подсчитывается общее количество выявленных отклонений для каждой параллели опыта и рассчитывается их доля от общего числа молоди в данном варианте опыта (табл. 47). Результат выражается в виде $M \pm S$.

Таблица 47 – Интерпретация результатов учета тест-функции «качество молоди» *D. magna*

Доля мертворожденной молоди и особей с морфологическими отклонениями от общего числа молоди	Группа токсичности по «качество молоди»	Заключение о наличии токсического эффекта
Менее 10%	I группа	Проба не обладает тератогенным действием
От 10 до 20 %	II группа	Проба обладает потенциальным тератогенным действием
Более 20%	III группа	Проба обладает потенциальным сильно выраженным тератогенным действием

9. Оценка изменения плодовитости по сравнению с контролем производится путем ежедневного подсчета количества рожденной молоди в

каждом контрольном и опытном стакане в течение всей жизни рачков. Расчет удельной плодовитости (на 1 взрослую самку) производится по двум периодам: с 1 по 25 день эксперимента и с 26 по 50 день эксперимента. В последующие периоды жизни *D. magna* удельная плодовитость не рассчитывается, так как при уменьшении количества взрослых особей могут наблюдаться всплески рождаемости, связанные с биотическими факторами, а не действием токсичных или биогенных веществ в пробе. Также подсчитывается средняя суммарная плодовитость рачков (по параллелям) в опытных и контрольном вариантах за весь их жизненный цикл. Для сравнения суммарной плодовитости учитывается общее количество потомства в контрольных и опытных вариантах за весь жизненный цикл рачков и рассчитывается отклонение опытных данных от контрольных (%).

Количественные данные о плодовитости рачков позволяют сделать выводы о наличии стимуляции или угнетения фертильности *D. magna*, что является одним из наиболее важных признаков хронической токсичности водной среды (табл. 48).

Таблица 48 – Интерпретация результатов учета плодовитости *D. magna*

Отличия плодовитости в опытных вариантах от контроля	Группа токсичности	Заключение о наличии токсического эффекта
Значимых отличий* от контрольных значений не обнаружено	I группа	Проба не обладает хроническим токсическим действием по тест-функции «плодовитость»
Значимые отличия от контрольных значений установлены по средней суммарной плодовитости за весь жизненный цикл дафний	II группа	Проба обладает слабо выраженным хроническим токсическим действием по тест-функции «плодовитость»
Значимые отличия от контрольных значений установлены по удельной плодовитости дафний за 50 дней опыта	III группа	Проба обладает средне выраженным хроническим токсическим действием по тест-функции «плодовитость»
Значимые отличия от контрольных значений установлены по удельной плодовитости дафний за 25 дней опыта	IV группа	Проба обладает сильно выраженным хроническим токсическим действием по тест-функции «плодовитость»

Примечание: значимыми отклонениями от контроля считаем угнетение плодовитости дафний более 20%, стимуляции – более 30%.

10. Учет абортивных яиц и расчет их доли от общего числа молодежи. Подсчет абортивных яиц производится в течение всего опыта. Они ежедневно удаляются вместе с приплодом, их количество записывается в рабочий журнал с шифром «Я». Подробное описание модификации метода учета абортивных яиц описано в разделе 2.3.5.

Критерием хронического токсического действия пробы является наличие абортивных яиц с ранжированием токсичности согласно таблице 49.

Таблица 49 – Интерпретация результатов учета количества абортивных яиц *D. magna*

Доля абортивных яиц от общего количества молодежи, %	Группа токсичности по тест-функции «абортивные яйца»	Заключение о наличии токсического эффекта
0 Яйца не обнаружены	I группа	Проба не обладает эмбриотоксическим хроническим действием по показателю «абортивные яйца»
От 0 до 20 включительно	II группа	Проба обладает эмбриотоксическим эффектом по показателю «абортивные яйца»
Более 20%	III группа	Проба оказывает значительный эмбриотоксический эффект по показателю «абортивные яйца»

11. Оценка средней продолжительности жизни по сравнению с контрольными показателями производится после гибели всех особей в контрольных и опытных вариантах. Из расчета исключается длина жизни последней живой дафнии в параллели (стакане), то есть расчет производится по 9 особям по формуле:

$$\text{СПЖ} = (n_1 \cdot t_1 + n_2 \cdot t_2 + \dots + n_i \cdot t_i) / 9, \text{ где:}$$

СПЖ – средняя продолжительность жизни рачков в параллели, n_1, n_2, \dots, n_i – количество рачков, проживших одинаковое время, t_1, t_2, \dots, t_i – время жизни рачков, объединенных по признаку одинаковой длины жизни.

Среднюю продолжительность жизни *D. magna* в каждом варианте рассчитывают как среднее арифметическое результатов, полученных в трех параллелях. Группы токсичности по тест-функции «продолжительность жизни» присваивают согласно таблице 50.

Таблица 50 – Интерпретация результатов определения средней продолжительности жизни *D. magna*

Снижение продолжительности жизни, % от контрольного значения	Группа токсичности по продолжительности жизни рачков	Заключение о наличии токсического эффекта
Отличия не достоверны	I группа	Проба не обладает хроническим токсическим действием по тест-функции «продолжительность жизни»
Снижение показателя до 20% включительно	II группа	Проба обладает хроническим токсическим действием по тест-функции «продолжительность жизни»
Снижение показателя свыше 20%	III группа	Проба обладает сильно выраженным хроническим токсическим действием по тест-функции «продолжительность жизни»

12. Учет смертности взрослых особей второго и третьего поколений *D. magna* под влиянием тестируемой водной среды: производится за счет постановки аналогичного эксперимента с использованием в качестве тест-организмов молоди, полученной в контрольных и опытных параллелях текущего опыта. Подробные операции для формирования второго и последующих поколений рассмотрены выше.

Смертность взрослых особей поколений F2 и F3 фиксируется за периоды 25 дней со дня постановки соответствующего опыта. Расчет показателя производится по формуле, приведенной в пункте 1. Группа токсичности присваивается пробе по шкале, отраженной в таблице 51.

**Таблица 51 – Интерпретация результатов учета
смертности в поколениях F2 и F3 *D. magna***

Смертность взрослых особей в поколениях F2 и F3, %	Группа токсичности	Заключение о наличии токсического эффекта
Менее 20% в поколениях F2 и F3 <i>D. magna</i>	I группа	Проба не обладает отсроченным летальным токсическим действием в поколениях F2 и F3 <i>D. magna</i>
Более 20 % включительно в поколении F2 <i>D. magna</i>	II группа	Проба обладает отсроченным летальным токсическим действием в поколении F2 <i>D. magna</i>
Более 20 % включительно в поколении F3 <i>D. magna</i>	III группа	Проба обладает отсроченным летальным токсическим действием в поколении F3 <i>D. magna</i>

13. Учет тест-функции «плодовитость в поколениях F2 и F3». В целях экономии времени и трудовых ресурсов учет плодовитости в поколениях F2 и F3 проводится до 25 дня эксперимента с каждым поколением включительно. Результат оценивается по таблице 52.

**Таблица 52 – Интерпретация результатов учета
плодовитости в поколениях F2 и F3 *D. magna***

Угнетение/стимуляция плодовитости в поколениях F2 и F3, %	Группа токсичности	Заклучение о наличии токсического эффекта
Угнетение менее 20% в поколениях F2 и F3 / Стимуляция менее 30% в поколениях F2 и F3	I группа	Проба не обладает отсроченным токсическим действием в поколениях F2 и F3 <i>D. magna</i> по тест-функции «плодовитость»
Угнетение более 20% в поколении F2 / Стимуляция более 30% в поколении F2	II группа	Проба обладает отсроченным токсическим действием в поколении F2 <i>D. magna</i> по тест-функции «плодовитость»
Угнетение более 20% в поколении F3 / Стимуляция более 30% в поколении F3	III группа	Проба обладает отсроченным токсическим действием в поколении F3 <i>D. magna</i> по тест-функции «плодовитость»

14. Учет абортивных яиц в поколениях F2 и F3 и расчет их доли от общего числа молодежи в соответствующих поколениях контрольных вариантов. Подсчет абортивных яиц производится в течение 25 дней опыта.

Критерием отсроченного эмбриотоксического токсического действия пробы считается превышение доли абортивных яиц от общего числа молодежи в соответствующих поколениях контроля на 20 % и более с ранжированием токсичности согласно таблице 53.

Таблица 53 – Интерпретация результатов учета количества абортивных яиц в поколениях F2 и F3 *D. magna*

Доля абортивных яиц от общего количества молодежи, %	Группа токсичности по тест-функции «абортивные яйца» в поколениях F2 и F3 дафний	Заключение о наличии токсического эффекта
Абортивные яйца не обнаружены в опытах «F2» и «F3»	I группа	Проба не обладает отсроченным эмбриотоксическим действием
Абортивные яйца обнаружены в опыте «F2»	II группа	Проба обладает отсроченным эмбриотоксическим действием в поколении F2
Абортивные яйца обнаружены в опыте «F3»	III группа	Проба обладает отсроченным эмбриотоксическим действием в поколении F3

Таким образом, разработана система последовательной оценки спектра тест-функций *D. magna*, обеспеченная:

- описанием операций биотестирования,
- опорной схемой системного биотеста по 14 реакциям *D. magna*,
- таблицами для интерпретации и ранжирования полученных показателей,
- формой протокола регистрации результатов биотестирования по предложенной системе (Приложение 8).

3.2.2.3. Апробация системного биотеста по последовательной оценке спектра тест-функций *D. magna*

Представленная выше система последовательной оценки спектра тест-функций *D. magna* апробировалась нами в модельном эксперименте. Поскольку многие эффекты классического модельного токсиканта бихромата калия уже подробно описаны [252], нами был выбран для моделирования загрязненных вод хлорид стронция $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Изучение его эффектов, в том числе отсроченных во времени, представляет для нас региональный интерес: в районе потенциального воздействия группы химических предприятий г. Кирово-Чепецка в пробах природных вод неоднократно устанавливалось высокое содержание стронция [98, 197, 198].

Изучение эффектов стронция актуально и для других регионов. Нерадиоактивный стронций является спутником кальция, поэтому загрязнение им природных вод наблюдается близ гипсоносных отложений, доломитов, известняков [204]. Также он может выщелачиваться из сырья и отходов химических производств, включаясь в комплексное загрязнение промышленных районов. Негативное влияние стронция на организм человека доказано [208]. Есть сведения о его токсичном действии на растения, в частности блокирование K^+ -каналов клеток корня [93].

В качестве токсичного агента в $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ выступает ион стронция. Его превалирующий токсический эффект над действием хлорид-ионов подтверждается нормативами: ПДК для совокупности всех растворимых в воде форм стронция в водных объектах рыбохозяйственного значения составляет всего $0,4 \text{ мг/дм}^3$, тогда как хлорид-ионов – 350 мг/дм^3 .

Модельные водные среды готовились с использованием артезианской воды питьевого качества, как и в других выше описанных экспериментах. Согласно порядку проведения исследований последовательно определялся выбранный спектр тест-функций *D. magna*. Результаты приводим в виде

протокола наблюдений. Форма протокола, разработанная для учета 14-ти тест-функций *D. magna* приведена в Приложении 8.

1. Тест-функция «гибель». Экспозиция 96 часов.

Определение острой токсичности
пробы без разбавления / концентрированного тестируемого раствора

Вариант	Экспозиция, часы / количество живых особей, шт.							А,%
	1	2	3	4	24	72	96	
Контроль	10	10	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	10	10	
20 мг/дм ³ (50 ПДКр.х.)	10	10	10	9	3	0	0	100
	10	10	10	9	3	0	0	
	10	10	10	10	2	0	0	

Примечание: А – смертность, %

Рекомендуемая БКР: 10–50 раз.

Использованная кратность разбавления: 10 и 20 раз.

Определение острой токсичности
пробы с разбавлениями / разбавленного тестируемого раствора
по гибели *D. magna*

Вариант	Экспозиция, часы / количество живых особей, шт.							А,%
	1	2	3	4	24	72	96	
Контроль	10	10	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	10	10	
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	10	10	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	10	10	
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	10	10	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	10	10	

Заключение № 1: проба «раствор хлорида стронция 20 мг/дм³» оказывает острое токсическое действие, при разбавлении пробы в 10 и 20 раз острого токсического действия не наблюдается.

2. Тест-функция «двигательная активность». Экспозиция 96 часов.

Определение токсичности пробы без разбавления / пробы с разбавлением
по двигательной активности *D. magna*

Вариант	Экспозиция, часы		
	Двигательная активность дафний за 5 минут, к.п.л		
	3	24	96
Контроль	115,1±8,3	130,7±6,8	166,0±7,7
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	128,0±11,2	119,4±8,1	121,3±5,5*
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	106,2±9,0	113,2±12,6	112,8±6,7*

Примечание: к.п.л. – количество пересечений линий; * отмечается достоверное отклонение от контроля, значение без * - отличия по сравнению с контролем не достоверны, $p < 0,05$.

Заключение №2: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» относятся к III группе токсичности по двигательной активности – проба потенциально токсична в хроническом эксперименте.

3. Тест-функция «трофическая активность». Экспозиция 5 суток.

Определение предлетальной токсичности
пробы без разбавления / пробы с разбавлением
по трофической активности *D. magna*

Вариант	Оптическая плотность водной среды	Относительная оптическая плотность, % к контролю	Снижение трофической активности, раз	Группа токсичности
Контроль	0,003±0,0006	-	-	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	0,018±0,001	600	6	III группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	0,02±0,002	667	6,7	III группа

Заключение № 3: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладают высоко выраженным нелетальным токсическим действием по показателю угнетения трофической активности *D. magna*.

4. Тест-функция «Задержка/стимуляция созревания особей». Экспозиция 5–10 суток.

Определение времени массового появления выводковых камер у *D. magna*

Вариант	Время появления выводковых камер, сут.	Сдвиг созревания, сут.	Группа токсичности
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	5	0	I группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	7	+2	II группа

Заключение №4: проба «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» не обладает эмбриотоксическим эффектом для *D. magna*; проба «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладает потенциальным эмбриотоксическим эффектом для *D. magna*.

5. Тест-функция «линейные размеры тела». Экспозиция 10 и 25 суток.

Показатели линейных размеров *D. magna*

Вариант	Экспозиция, сут. / линейные размеры тела, мм		Группа токсичности
	10	25	
Контроль	-	4,2±0,1	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	не отмечено	3,9±0,2	I группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	не отмечено	4,0±0,2	I группа

Примечание: * отмечается достоверное отклонение от контроля, значение без * - отличия по сравнению с контролем не достоверны, $p < 0,05$.

Заключение №5: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» не обладают эффектом уменьшения линейных размеров *D. magna*.

6. Тест-функция «пигментация». Экспозиция 10 суток и 25 дней.

Определение отличий в пигментации тела опытных особей *D. magna* и контрольных

Вариант	Экспозиция, сут. / отметка о наличии нарушения пигментации		Группа токсичности
	10	25	
Контроль	-	-	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	не отмечено	не отмечено	I группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	не отмечено	отмечена бледная окраска тела	II группа

Заключение №6: проба «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» не обладает эффектом изменения пигментации особей *D. magna*; проба «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладает средне выраженным эффектом изменения пигментации тела особей *D. magna*.

7. Тест-функция «задержка/стимуляция первого появления молодежи». Экспозиция 7–12 дней.

Определение времени первого появления молодежи у *D. magna*

Вариант	Время появления первой молодежи, сут.	Сдвиг созревания, сут.	Группа токсичности
Контроль	8	-	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	9	+1	I группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	11	+3	II группа

Заключение №7: проба «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» не обладает эффектом задержки первого появления молодежи *D. magna*; проба «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладает средне выраженным эффектом задержки первого появления молодежи *D. magna*.

8. Тест-функция «качество молодежи». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольных и опытных пробах.

Морфологические отклонения у молодежи контрольных и опытных групп *D. magna* и наличие мертвой молодежи

Вариант	Диагностический признак / доля отклонений от общего числа молодежи, %				Группа токсичности
	Деформация раковины	Деформация задней иглы	Отсутствие щетинок	Мертвая молодежь	
Контроль	0	0	0	0	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	0	0	0	12,4±3,1	II группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	0	0	0	14,6±3,9	II группа

Заключение №8: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладают потенциальным тератогенным эффектом для *D. magna*.

9. Тест-функция «плодовитость». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольной и опытных пробах.

Плодовитость *D. magna*

Вариант	Удельная плодовитость, количество особей на 1 взрослую самку		Количество молоди за весь жизненный цикл, шт.	Количество молоди за весь жизненный цикл, % от контроля	Группа токсичности
	1 – 25 сутки	26 – 50 сутки			
Контроль	13,4±2,3	15,4±2,9	428±81,4	-	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	9,4±0,6*	7,0±0,4*	247±49,3*	57,7	III группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	9,4±0,6*	7,2±1,1*	209±32,0*	48,8	III группа

Примечание: * отмечено значимое отличие от контрольных значений – угнетение тест-функции более, чем на 20%.

Заключение №9: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладают сильно выраженным хроническим токсическим эффектом по показателю угнетения плодовитости *D. magna*.

10. Тест-функция «доля abortивных яиц от общего числа потомства». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольных и опытных пробах.

Учет abortивных яиц *D. magna*

Вариант	Количество abortивных яиц за весь жизненный цикл, шт.	Доля abortивных яиц от общего числа молоди, %	Группа токсичности
Контроль	0		-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	44±14	17,8	II группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	39±9	18,7	II группа

Заключение №10: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладают эмбриотоксическим эффектом для *D. magna* по тест-функции «abortивные яйца».

11. Тест-функции «продолжительность жизни». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольных и опытных пробах.

Учет продолжительности жизни *D. magna*

Вариант	Средняя продолжительность жизни, сут.	Снижение/увеличение продолжительности жизни, % от контрольного значения	Группа токсичности
Контроль	105±14	-	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	86±12	-18,1	II группа
2 мг/дм ³ (5 ПДКр.х.)	77±9	-26,7	III группа

Примечание: отрицательные значения означают снижение продолжительности жизни на указанную величину относительно контрольных значений; положительные значения – увеличение продолжительности жизни на указанную величину относительно контрольных значений.

Заключение № 11: проба «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладает хроническим токсическим действием по тест-функции «продолжительность жизни»; проба «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладает сильно выраженным хроническим токсическим действием для *D. magna* по тест-функции «продолжительность жизни».

12. Тест-функция «смертность в поколениях F2 и F3». Экспозиция – 25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколений F2 и F3.

Учет смертности в поколениях F2 и F3 *D. magna*

Вариант	Смертность, %	Группа токсичности
Контроль	F2	0
	F3	0
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	F2	6,7
	F3	13,3
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	F2	10
	F3	23,3

Заключение № 12: проба «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» не обладает отсроченным летальным токсическим действием в поколениях F2 и F3 *D. magna*; проба «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладает отсроченным летальным токсическим действием в поколении F3 *D. magna*.

13. Тест-функция «плодовитость в поколениях F2 и F3». Экспозиция – 25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколений F2 и F3.

Учет плодовитости в поколениях F2 и F3 *D. magna*

Вариант		Плодовитость, %	Группа токсичности
Контроль	F2	10,2±1,5	-
	F3	11,3±0,5	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	F2	7,8±1,1	III группа
	F3	2,5±0,5*	
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	F2	8,4±1,2	III группа
	F3	2,3±0,5*	

Заключение №13: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладают отсроченным токсическим действием в поколениях F3 *D. magna* по тест-функции плодовитость.

14. Тест-функция «доля abortивных яиц от общего числа потомства в поколениях F2 и F3». Экспозиция – 25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколений F2 и F3.

Учет abortивных яиц *D. magna*

Вариант		Количество abortивных яиц за 25 дней, шт.	Доля abortивных яиц от общего числа молоди, %	Группа токсичности
Контроль	F2	0	-	-
	F3	0	-	-
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	F2	9±3	8,8	II группа
	F3	12±4	10,6	
1 мг/дм ³ (2,5 ПДКр.х.)	F2	10±2	9,8	II группа
	F3	16±5	14,2	

Заключение №14: пробы «раствор хлорида стронция 1 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» и «раствор хлорида стронция 2 мг/дм³ (по иону Sr²⁺)» обладают отсроченным эмбриотоксическим действием в поколениях F2 и F3 для *D. magna* по тест-функции плодовитость.

Итоговое заключение о токсичности растворов хлорида стронция, протестированных в дозах 20, 2, 1 мг/дм³ (в расчете на ион Sr²⁺):

– раствор хлорида стронция 20 мг/дм³ обладает летальным токсическим действием для *D. magna* с гибелью более 50% подопытных особей через 24 часа эксперимента; при разбавлении пробы в 10 и 20 раз (до 2 мг/дм³ и 1 мг/дм³ соответственно) острого токсического действия не выявлено;

– пробы «1 мг/дм³» и «2 мг/дм³» угнетают двигательную активность *D. magna* через 96 часов опыта, что свидетельствует об их потенциальной хронической токсичности. Прогноз подтвердился по тест-функциям «плодовитость», «продолжительность жизни», «доля абортивных яиц от общего числа молодежи» (в поколениях F1, F2, F3);

– пробы «1 мг/дм³» и «2 мг/дм³» обладают высоко выраженным нелетальным токсическим действием по угнетению трофической активности, что свидетельствует об их потенциальной способности патологически изменять морфологические признаки *D. magna*. Прогноз подтвердился для тест-функции «пигментация» при тестировании пробы «2 мг/дм³» в экспозиции 25 суток;

– проба «1 мг/дм³» не вызывала задержку созревания особей и первого появления потомства, проба «2 мг/дм³» тормозила созревание особей на 2 суток и появление первой молодежи на 3 суток, что свидетельствует о потенциальной способности пробы угнетать плодовитость *D. magna*. Прогноз подтвердился;

– пробы «1 мг/дм³» и «2 мг/дм³» не вызывали таких морфологических отклонений у молодежи *D. magna* как деформация раковин, деформация задней иглы, отсутствие щетинок на антеннах, но вызывали появление мертворожденной молодежи, что свидетельствует о потенциальном появлении патологических отклонений в последующих поколениях. Прогноз подтвердился по тест-функции «плодовитость» и «появление абортивных яиц» в поколениях F2, F3;

– пробы «1 мг/дм³» и «2 мг/дм³» вызывали достоверное угнетение плодовитости *D. magna* за периоды учета 25 и 50 дней опыта, что было спрогнозировано по тест-функциям, оцениваемым ранее;

– пробы «1 мг/дм³» и «2 мг/дм³» характеризуются как эмбриотоксичные по показателю наличия абортивных яиц как в поколении F1, так и в последующих поколениях F2 и F3;

– проба «1 мг/дм³» оказывала хронический токсический эффект – достоверно сокращала среднюю продолжительность жизни особей *D. magna* по сравнению с контрольными значениями, проба «2 мг/дм³» сокращала среднюю продолжительность жизни особей *D. magna* более чем на 20% по сравнению с контрольными значениями – оказывала сильно выраженный хронический токсический эффект по данному признаку;

– пробы «1 мг/дм³» и «2 мг/дм³» обладают отсроченным токсическим действием: угнетают плодовитость особей *D. magna* и вызывают появление абортивных яиц (по результатам опытов с особями поколений F2 и F3).

Таким образом, в разделе 3.2. представлена новая стратегия биотестирования, включающая экспресс-биотест и системное биотестирование по ответным реакциям *D. magna*, позволяет выявлять предлетальные, летальные и отсроченные эффекты загрязняющих веществ и ранжировать их по степени проявления. Сочетание экспресс-биотестов и системного биотестирования позволяет более эффективно проводить диагностику загрязнения водных сред в условиях неустановленного состава химических веществ, их сочетанного действия, и определять экологически значимые эффекты, в том числе отсроченные во времени. Также достигнуты следующие результаты:

– разработан системный биотест по последовательной оценке спектра тест-функций *D. magna*, обеспеченный описанием операций биотестирования, опорной схемой комплексного биотеста по 14 реакциям *D. magna*, таблицами для интерпретации и ранжирования полученных показателей, формой протокола регистрации результатов биотестирования по предложенной системе. Биотест направлен на детальную токсикологическую характеристику водных сред, апробирован на примере модельного загрязнения водной среды хлоридом стронция с демонстрацией заполнения протокола исследования, вынесением заключений по 14 тест-функциям и итоговым заключением;

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

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

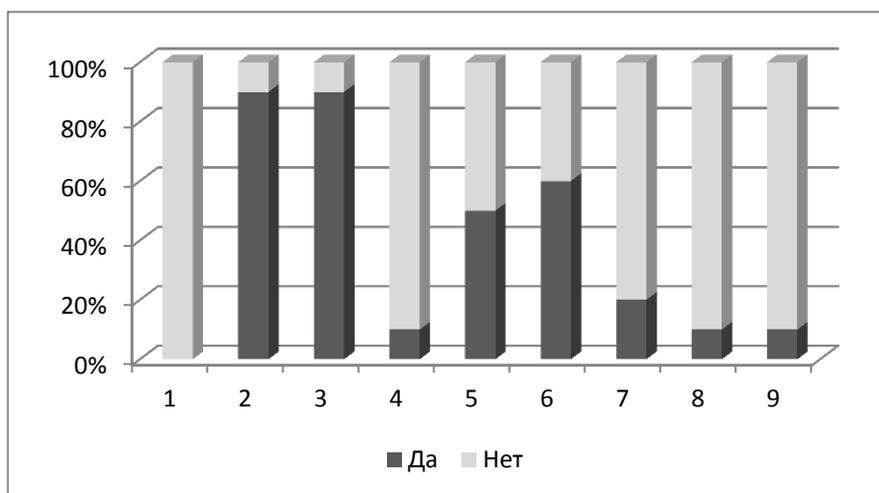
3.3.1. Анализ проблем культивирования и проведения биоанализов на примере *D. magna*

Около 100 лет использования методов биотестирования в экологических и других исследованиях сформирована не только научно-методологическая база определения токсичности среды по ответным реакциям тест-организмов, но и накоплено множество вопросов, возникающих при реализации методов [156, 168]. Эти вопросы активно обсуждаются на специализированных конференциях и симпозиумах [42, 46, 47, 48, 53, 90].

Для выявления наиболее проблемных вопросов, возникающих в ежедневной работе с биотестами, нами было проведено анкетирование сотрудников из 10 разных лабораторий, имеющих подразделения биотестирования. Опросный лист и обобщения ответов приведены в Приложениях 6 и 7.

На первом, ознакомительном, этапе опроса ключевым вопросом был: «Какой тест-организм Вы назвали бы базовым (основным) для определения токсичности водных сред?». Все респонденты сошлись во мнении, что базовым тест-организмом можно считать *D. magna*. Уточним, что один опрошиваемый ответил «*D. magna* в сочетании с одноклеточными водорослями»; сотрудник другой лаборатории указал «дафнии, цериодафнии». По всей видимости, у респондентов были объективные причины назвать базовым тест-организмом *D. magna*, поскольку лишь одна лаборатория (со статусом аттестованная) имеет в распоряжении только культуру *D. magna*, 3 лаборатории используют более 4 тест-организмов, остальные от 2 до 4. Следовательно, сотрудники, обладая опытом работы с несколькими тест-организмами, все-таки выбирают *D. magna*.

На втором этапе анкетирования ставилась задача выяснить, имеются ли какие-либо проблемы у респондентов при содержании *D. magna* и проведении токсикологических экспериментов с помощью этих низших ракообразных. Результаты опросов показали, что при использовании культуры *D. magna* могут периодически возникать некоторые проблемы, в частности, несоответствие чувствительности организмов заданному методикой диапазону, наличие сезонной динамики чувствительности организмов, периодическое снижение плодовитости культуры и т. д. Распределение ответов на вопросы о проблемах культивирования *D. magna* и проблемах, возникающих при проведении экспериментов, с помощью этих рачков отражено на рисунках 16 и 17.



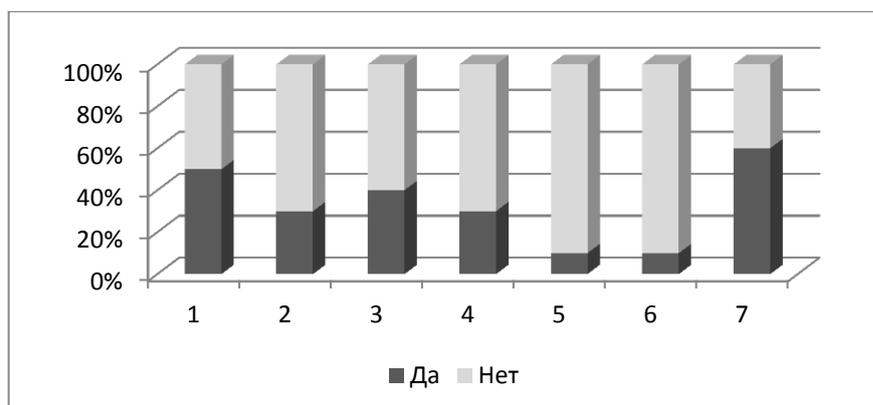
Примечание: цифры означают:

- 1 – стабильное снижение плодовитости синхронизированной и маточной культур;
- 2 – периодическое (сезонное) снижение плодовитости культуры;
- 3 – морфо-физиологические отклонения у дафний в культуре (уменьшение размеров тела, бледность покровов, розовая или красноватая окраска, движения только у поверхности сосуда, движения только у дна сосуда, иное);
- 4 – регулярное наличие абортивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры;
- 5 – периодическое наличие абортивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры;
- 6 – снижение пищевой активности рачков в культуре, диагностируемое по появлению зеленого осадка при одинаковом ежедневном объеме кормления;
- 7 – гибель молоди в культуре;
- 8 – массовая гибель взрослых особей в культуре;
- 9 – появление самцов.

Рисунок 16 – Проблемы, возникающие при культивировании *D. magna*

Утвердительные ответы («да») считаются негативными, свидетельствующими о наличии определённых проблемных ситуаций. Сотрудники лабораторий биотестирования, вспоминая об особенностях культивирования *D. magna* в своих подразделениях, на 4 вопроса из 9 ответили утвердительно в 50% случаев и более. Такие ответы говорят о том, что у культуры *D. magna* периодически наблюдаются признаки ее ослабления. Это подтверждают и ответы на вопрос о соответствии чувствительности молоди *D. magna* к модельному токсиканту: 9 из 10 респондентов признают, что это требование выполняется не всегда (Приложение 7).

В опросе о проведении экспериментов негативных ответов («да») встретилось меньше (рис. 17), что связываем с тем, что в опыте, даже хроническом, наблюдения за тест-организмами ведутся более короткое время, чем за синхронизированной культурой.



Примечание: цифры означают:

- 1 - смертность контрольных особей выше 10%;
- 2 - появление первой молоди в контроле при определении хронического токсического действия позднее 12 суток со дня начала эксперимента;
- 3 - морфо-физиологические отклонения у дафний в контроле (уменьшение размеров тела, бледность покровов, розовая или красноватая окраска, движения только у поверхности сосуда, движения только у дна сосуда, иное);
- 4 - появление абортивных яиц в хроническом эксперименте;
- 5 - стабильное (долговременное) снижение плодовитости контрольных особей относительно условной лабораторной нормы;
- 6 - сезонное снижение плодовитости контрольных особей относительно условной лабораторной нормы;
- 7 - снижение пищевой активности рачков в контроле, диагностируемое по появлению зеленого осадка при одинаковом ежедневном объеме кормления.

Рисунок 17 – Проблемы, возникающие при проведении экспериментов с *D. magna*

Анализ ответов, представленных на рисунках 16 и 17, а также остальных ответов опрашиваемых (Приложение 7) показывает, что у большинства лабораторий периодически появляются однотипные проблемы с культурой *D. magna*. В основном это сезонные колебания чувствительности к модельному токсиканту, периодические морфо-функциональные отклонения у взрослых рачков в синхронизированной культуре, снижение пищевой активности рачков и их плодовитости, то есть разнообразные характеристики тест-культуры, которые выше обобщены нами в понятии «здоровье тест-организмов» (см. раздел 1.2.3.1.).

Колебания различных характеристик тест-культуры ставят вопрос о надежности ответных реакций организмов, безусловно, зависящих от здоровья подопытных особей. Классическим приемом контроля пригодности тест-организмов к токсикологическим анализам является регулярная проверка их чувствительности к модельному токсиканту, однако эта процедура не дает гарантий адекватного реагирования выбранных организмов на другие вещества [88, 155, 168]. Экспериментальное определение критериев здоровья тест-организмов позволит проводить стандартизацию тест-культур по расширенному перечню показателей для установления их пригодности к токсикологическим анализам.

В связи с этим, нами были спланированы и проведены серии модельных экспериментов, демонстрирующих влияние условий культивирования на здоровье лабораторной культуры. Кроме этого, в итоговые задачи экспериментов входило создание рекомендаций для создания стандартных условий культивирования *D. magna* и контроля здоровья этой базовой тест-культуры.

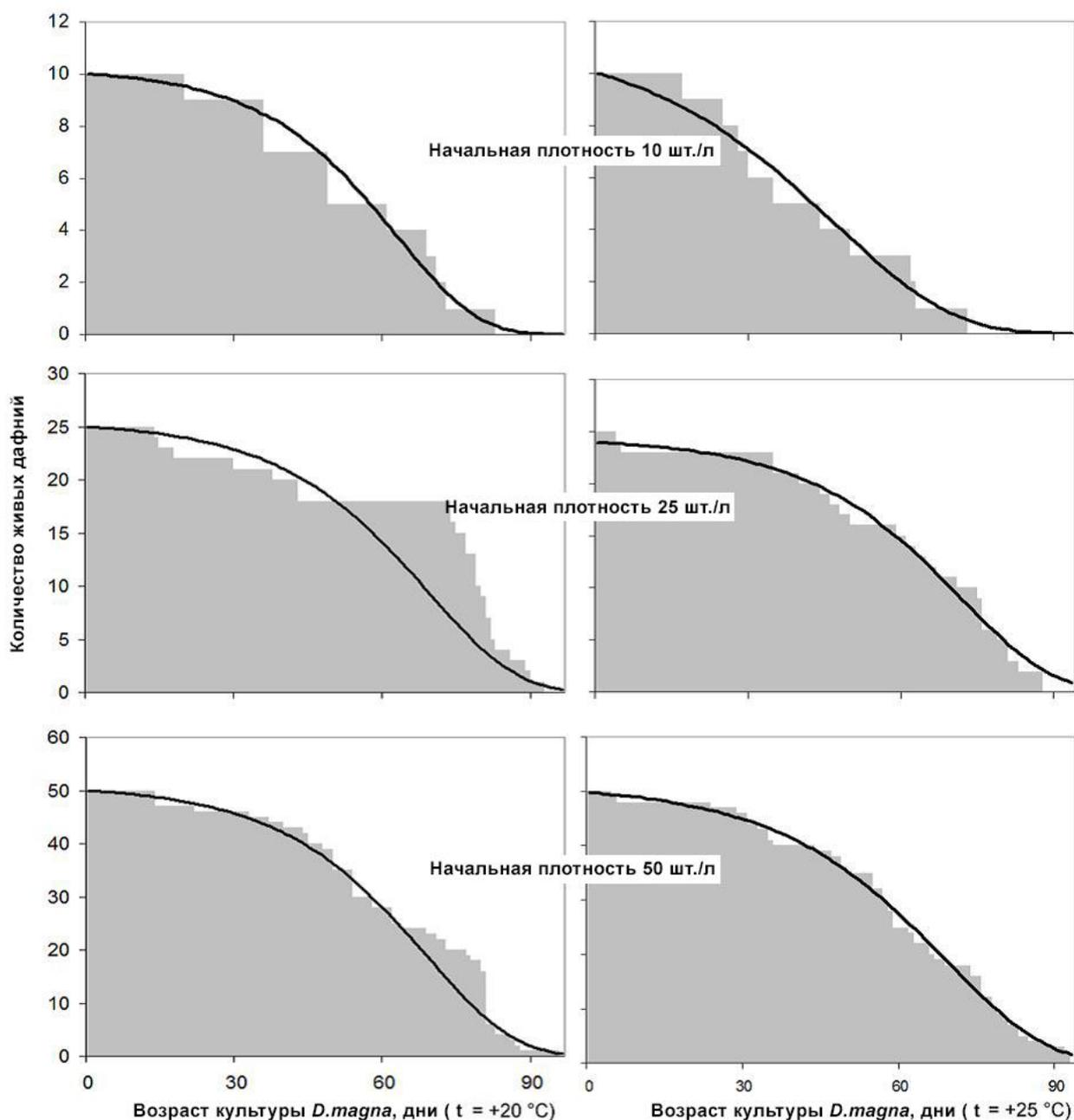
3.3.2. Экспериментальное определение количественных параметров здоровья тест-культуры на примере *D. magna*

Для выявления показателей здоровья тест-культуры на примере *D. magna* были проведены эксперименты с вариациями их плотности посадки и температуры культивирования. Идея состояла в том, что продолжительность жизни и способность особей к размножению – универсальные критерии благополучия популяции. По модельным группам, продемонстрировавшим лучшие показатели, далее выявлялись и другие количественные критерии здоровья особей *D. magna* [165].

Были сформированы 6 опытных вариантов с разной плотностью посадки (10, 25, 50 особей/л) и двумя температурными условиями (20°C и 25°C). Температурные условия и светопериод 12 часов создавался в климатостате. Каждый опытный вариант имел три повторности. Ежедневно вели подсчет основных особей группы, после созревания которых также подсчитывали молодь. Молодь ежедневно удаляли. Оставшихся взрослых особей кормили, рассчитывая объем корма на количество организмов. Кормом служила суспензия одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. После достижения рачками зрелости, 2 раза в неделю к основному рациону добавляли хлебопекарные дрожжи. Опыт продолжался до конца жизни последней особи в группе.

Влияние плотности синхронизированной культуры и температуры содержания на естественную смертность *D. magna*. В данной части работы исследовалось значение разной плотности модельных групп *D. magna* и температуры их содержания для показателей естественной смертности рачков. Естественная смертность – одна из базовых характеристик культуры тест-организмов. Анализ этого показателя направлен на оценку жизнеспособности и пригодности для биотестирования лабораторных тест-организмов.

На рисунке 18 показана динамика естественной смертности в модельных группах с различной плотностью посадки рачков *D. magna* на одинаковый объем среды обитания.



Обозначения: серая область представляет уменьшающееся количество живых дафний, черная кривая представляет собой график уравнения Гомпертца с параметрами a и b , полученными методом наименьших квадратов (показаны на графиках)

Рисунок 18 – Сравнение экспериментальных данных естественной смертности *D. magna* с расчетом по уравнению Гомпертца

Мы провели поиск математической модели, наиболее подходящей для описания экспериментальных данных. В результате, было установлено, что результаты эксперимента хорошо согласуются с уравнением Гомпертца, описывающим смертность в популяциях животных с большим потомством [335]. Графики уравнения Гомпертца с параметрами, рассчитанными методом наименьших квадратов на основе экспериментальных данных, также показаны на рисунке 18.

Уравнение Гомпертца можно представить в виде $N(t) = N_0 \times e^{a(1-e^{bt})}$, где N_0 - число дафний в начале эксперимента, $N(t)$ – количество живых дафний в течение t дней, параметры a и b выражаются через постоянную составляющую естественной смертности S_0 и коэффициент суточной смертности k : $b = \ln k$, $a = \frac{S_0}{b}$.

Демографические параметры, рассчитанные по уравнению Гомпертца, и другие параметры модельных групп представлены в таблице 54.

Таблица 54 – Влияние условий культивирования *D. magna* на демографические параметры модельных групп рачков

Вариант/ показатели	Начальная плотность особей и температура культивирования					
	10 особей/дм ³		25 особей/дм ³		50 особей/дм ³	
	20 °С	25 °С	20 °С	25 °С	20 °С	25 °С
Постоянная составляющая естественной смертности (S_0)	1,1·10 ⁻⁵ –2,6·10 ⁻³		4,7·10 ⁻⁵ –3,9·10 ⁻⁴		1,9·10 ⁻⁴ –2,0·10 ⁻³	
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
Средняя продолжительность 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
Максимальная продолжительность жизни особей, дни	68,3±9,3	72±9,8	114±1,7	87,0±1,3	100,7±10,2	92±9,1

Как наиболее благополучная, выделяется группа с начальной плотностью 25 особей на литр при температуре 20°С: показатели средней и максимальной продолжительности жизни при этом варианте

культивирования оказались максимальными. Данную группу приняли за условно эталонную.

Дальнейший анализ результатов показал, что параметр «постоянная составляющая естественной смертности» (S_0) варьирует в широких пределах. Такие флуктуации этого параметра возможны из-за случайных факторов, например, генетических мутаций. Напротив, второй параметр «коэффициент суточного прироста смертности» (k) очень стабилен. Он воспроизводится с высокой точностью независимо от плотности модельных групп и температуры выращивания: 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 здоровья ее особей.

Несмотря на аналогичные коэффициенты суточной естественной смертности, динамика смертности в модельных группах различна (рис. 18). Средняя продолжительность жизни особей в группах из 10 рачков достоверно меньше, чем в группах с большей плотностью ($p < 0,05$). Например, средняя продолжительность жизни в группах из 25 дафний при 20° С больше на 51,5%, а в группах из 50 рачков средняя продолжительность жизни на 26,4% больше, чем в группах из 10 особей. Максимальная продолжительность жизни в группах с низкой плотностью также короче. Эти факты можно объяснить высокой плодовитостью *D. magna* при низкой плотности посадки (табл. 55). Такое стимулирование размножения истощает ракообразных, что нежелательно при лабораторном культивировании.

Таблица 55 – Влияние условий культивирования *D. magna* на их размножение

Вариант/ параметры	Начальная плотность особей и температура культивирования					
	10 особей/дм ³		25 особей/дм ³		50 особей/дм ³	
	20 °С	25 °С	20 °С	25 °С	20 °С	25 °С
День появления первой молоди	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

Продолжительность жизни рачков зависела от температуры культивирования *D. magna*. Во всех модельных группах повышение температуры от 20°С до 25°С привело к сокращению средней и максимальной продолжительности жизни. В группе из 10 особей повышение температуры привело к снижению продолжительности жизни на 20,7%, в группе из 25 особей – на 26,2%, в группе из 50 рачков – на 11,4%. Снижение продолжительности жизни в более теплых условиях объясняется повышенной плодовитостью *D. magna* при более высокой температуре. Это может быть нежелательной причиной ослабления культуры низших ракообразных.

Влияние плотности синхронизированной культуры *D. magna* и температуры содержания на показатель плодовитости в модельных группах. Способность особей к размножению – второй наиболее важный показатель условной популяции после продолжительности жизни особей, способный сообщить о благополучии или напротив отклонении от нормы состояния здоровья организмов.

Различия в фертильности самок *D. magna* в группах, находящихся в разных условиях, начали проявляться с периода созревания рачков. Появление яиц в выводковых камерах визуально диагностировалось значительно раньше у представителей групп, состоящих из 10 и 25 особей. Повышение плотности до 50 особей на 1 дм³ тормозило созревание рачков,

что отразилось на показателях «день появления первой молодежи» и «день первого массового приплода» (табл. 55, см. выше).

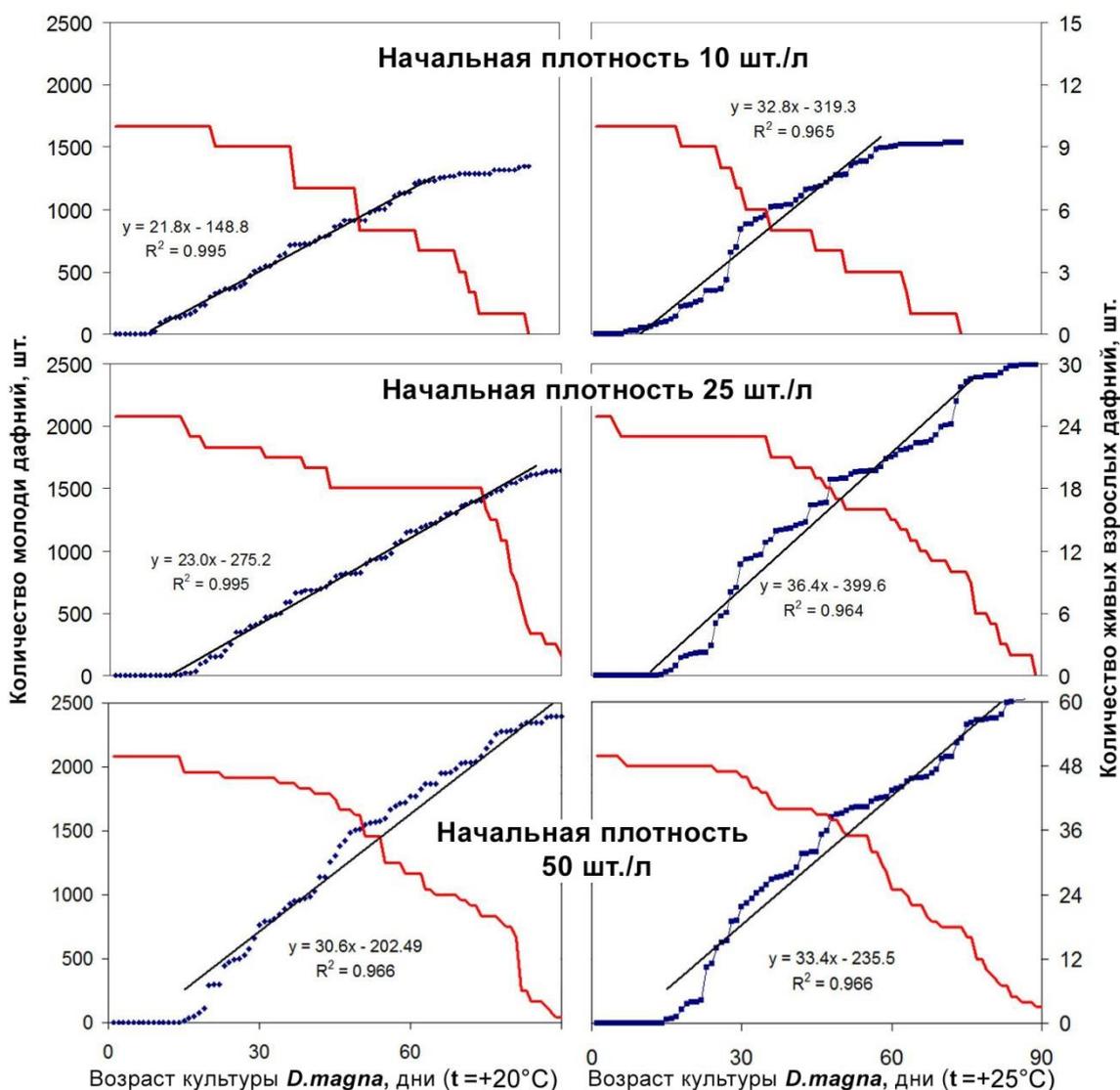
При плотности 10 и 25 особей на 1 дм³ первое появление потомства происходило с 8 по 12 день, то есть в пределах биологической нормы (Brown, 1929). В группе из 50 рачков наблюдали сдвиг первого вымета молодежи на 15 (25°C) и 17 (20°C) день. Торможение плодовитости еще более очевидно при анализе времени первого массового приплода. В группе из 25 особей это событие произошло позже на 8 дней по сравнению с группой из 10 дафний как при культивировании при 20°C, так и при 25°C. Для группы с наибольшей плотностью этот сдвиг увеличился до 10–11 дней.

Увеличение плотности посадки дафний значительно снижало удельную плодовитость особей в модельных группах. При оптимальной температуре содержания (20°C) удельная плодовитость группы из 25 особей снизилась в 1,8 раз, а группы из 50 особей в 2,8 раза – по сравнению с группой из 10 рачков. Повышение температуры в одинаковых по плотности группах стимулировало плодовитость. Известно, что благоприятные температурные условия в пределах экологического оптимума вызывают увеличение количества потомства *D. magna* [302, 393]. Однако, как показано выше, такая стимуляция уменьшает среднее время жизни рачков (табл. 54, 55).

Была проанализирована естественная смертность *D. magna* и их суммарная плодовитость за весь жизненный цикл. Анализ показал, что постепенное снижение плотности модельных групп вследствие естественной смертности влечет за собой увеличение плодовитости оставшихся самок, то есть естественная смертность взрослых особей компенсируется увеличением фертильности оставшихся партеногенетических рачков. На графиках этот эффект выражается линейной зависимостью увеличения общего числа молодежи во времени от уменьшения числа взрослых рачков (рис. 19). Такие эффекты известны в экологии популяции [390]. Графики также показывают типичные «волны», связанные с 3–4 дневным циклом всплесков рождений [345].

Выявленные закономерности показывают, что эта способность проявляется у *D. magna* практически на протяжении всей жизни: от появления первого потомства до очевидного старения наиболее длительно живущих 3–4 особей группы.

Повышение температуры культивирования до 25°C искажает картину развития модельных групп: появляются пики плодовитости, связанные с температурной стимуляцией, вслед за которыми можно видеть пики смертности.



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

Эти закономерности приводят к выводам, которые важны для успешного длительного культивирования лабораторной культуры *D. magna* и получения объективных результатов биотестирования с помощью этих ракообразных. Плотность посадки чрезвычайно влияет на состояние культуры *D. magna* и, прежде всего, на её основные тест-функции: смертность и плодовитость. В исследуемом температурном диапазоне плотность посадки равная 50 особей/дм³ является ограничивающим фактором для максимального проявления плодовитости культуры. Повышение температуры, несмотря на стимулирование удельной плодовитости *D. magna*, увеличивает естественную смертность рачков, что может отрицательно повлиять на дальнейшую объективность результатов токсикологических экспериментов.

Среди показателей, связанных с фертильностью особей, «день появления первой молодежи и день появления первого массового приплода» проявляются первыми и не требуют наблюдения за полным жизненным циклом особей, поэтому предлагаем считать их оперативными критериями оценки здоровья культуры *D. magna*. Удельная плодовитость отнесена к пожизненным показателям, которые необходимо контролировать 1 раз в полугодие.

Вопрос об условной норме плодовитости партеногенетических особей *D. magna*, содержащихся в оптимальных условиях, остается актуальным. При анализе данных различных авторов этот показатель варьирует в широких пределах. В некоторых работах сообщают о суммарной плодовитости в расчете на одну самку от 30,3 до 74,6 особей [74]. В экспериментах Г. Н. Мисейко с соавторами [137] плодовитость варьировала от 17 до 67 экземпляров молодежи на одну самку. В обоих случаях плодовитость *D. magna* определяли в оптимальных для культуры условиях, при этом различия результатов объясняются разными условиями проведения экспериментов. Согласно первой работе [74], в процессе культивирования помещали по 5

особей в 250 мл воды, тогда как по второй методике [137] дафнии содержались индивидуально в 150 мл воды.

Таким образом, экспериментально показано, что наилучшие показатели здоровья особей *D. magna*, связанные с продолжительностью жизни и способностью рачков к размножению, наблюдаются при температуре 20°C и плотности посадки 25 особей/л. 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 $79,7 \pm 1,0$ дней, максимальный срок жизни особи в группе, равный $114,0 \pm 1,7$ дней и удельная плодовитость особей $74,3 \pm 2,4$.

Показано, что естественная смертность *D. magna* описывается уравнением Гомпертца, что характерно для многоплодных животных. Из двух параметров уравнения «коэффициент суточного прироста смертности» (k) воспроизводится с высокой точностью, независимо от плотности группы рачков и температуры. Следовательно, расчет данного коэффициента можно рекомендовать для контроля здоровья лабораторной культуры *D. magna*.

Продолжительность жизни дафний снижается в ответ на повышенную температуру и увеличенную плотность особей. В этом заключается механизм потери пригодности культуры *D. magna* для биотестирования при отклонении условий ее культивирования от оптимальных параметров – 20°C и 25 особей/л. Этот эффект выявлен как по параметру средней продолжительности жизни рачков, так и по их максимальной продолжительности жизни.

3.3.3. Влияние химического состава культивационной воды на результат биотестирования

Качество культивационной водной среды для содержания *D. magna* имеет особое значение для получения объективных результатов биотестирования. Химический состав природной воды, используемой для культивирования тест-организмов, влияет на общее состояние биообъектов, их чувствительность и устойчивость к различным соединениям. Состав природных вод в разных регионах значительно отличается.

Разнообразие культивационных вод, используемых в качестве контрольного эталона в лабораториях по всему миру, остается нерешенной проблемой. Её аспекты рассматриваются учеными давно. Еще в 1981 г. работе М. А. Lewis и А. W. Maki показано, что культивирование в водах с повышенной жесткостью приводит к стимуляции воспроизводства *D. magna* [357].

Требования к культивационным водам в мировых стандартах имеют широкий диапазон по всем параметрам [23, 26, 27, 29, 30]. При этом известно, что физико-химические свойства водной среды влияют на состояние гидробионтов, например, их чувствительность к токсикантам (см. раздел 1.2.1.2). Попыткой отказа от непосредственного культивирования рачков в природной воде является микробиотесты Daphtoxkit FTM magna и Microtox® [315, 409], предусматривающие использование в биотестировании эфипий (покоящихся яиц рачков). Однако в научной литературе отмечают недостаток данных по использованию этого микробиотеста [346]. Искусственные водные среды для культивирования дафний разработаны, но применяются не часто [32, 294] (см. раздел 1.2.1.2). Обсуждение этого вопроса приведено в разделе 1.2.3.1. Классическое культивирование *D. magna* до сих пор преобладает.

Нами была поставлена задача исследовать влияние химического состава культивационных вод на чувствительность рачков *D. magna* к

модельному токсиканту дихромату калия. Задача решалась в процессе содержания культуры *D. magna* в одинаковых условиях, но с использованием культивационных вод различного происхождения и химического состава. Обе водные среды были представлены артезианскими водами питьевого качества, при этом отличались по количеству минеральных солей и, соответственно, электропроводности (в 2 раза). Эксперимент продолжался в течение 2 лет с периодической калибровкой суточной молоди культуры.

В процессе калибровки чувствительности молоди двух культур *D. magna* установили, что среднелетальная концентрация (LD_{50}) калия двухромовокислого для них различалась: в экспериментах с более минерализованными водами, воздействие модельного токсиканта проявлялось слабее (табл. 32). Содержание организмов и периодическую калибровку проводили в течение двух лет, поэтому LD_{50} в таблице 56 представлена интервалом значений.

Таблица 56 – Влияние состава культивационной воды на чувствительность *D. magna* к модельному токсиканту – калию двухромовокислому

Характеристика культивационной воды	Содержание ионов, мг/дм ³				Электропроводность, μ S/см	LD_{50} , мг/дм ³ K ₂ Cr ₂ O ₇
	катионы		анионы			
Артезианская вода централизованного водоснабжения (Кировская обл.)	Na ⁺	42.8±6.4	Cl ⁻	19.9±2.0	610±30	1.2 - 1.8
	K ⁺	0.74±0.1	NO ₃ ⁻	21.8±3.3		
	Mg ⁺	28.7±2.9	PO ₄ ³⁻	<0.2		
	Ca ⁺	29.1±2.9	SO ₄ ²⁻	22.2±2.2		
Питьевая артезианская вода (г. Киров)	Na ⁺	12.8±1.9	Cl ⁻	22.7±2.3	320±25	0.9 - 1.3
	K ⁺	<0.1	NO ₃ ⁻	6.6±1.0		
	Mg ⁺	7.5±0.7	PO ₄ ³⁻	<0.2		
	Ca ⁺	25±2.5	SO ₄ ²⁻	3.9±0.4		

Полученные данные подтверждают то, что химический состав культивационных вод влияет на ответные реакции *D. magna*. Влияние химического состава природных вод на их токсичность отражено во многих работах [146, 298, 329, 354].

Полученные результаты позволили сформулировать следующие рекомендации. При адаптации культуры к новым лабораторным условиям, в частности к смене культивационной воды, необходимо вести усиленный контроль чувствительности культуры (1 раз в месяц) по отношению к модельному токсиканту в течение 6 месяцев. При получении положительных результатов, то есть стабильном соответствии молодежи *D. magna* требованиям к ее чувствительности, периодичность контроля сокращают до 1 раза в квартал. Параллельно с калибровкой чувствительности культуры рекомендуется проводить химический анализ используемой воды на предмет стабильности химического состава.

Отметим, что культивационная вода используется для приготовления серий разбавлений тестируемой среды, и, таким образом, влияет на итоговое заключение о токсичности пробы. Эта проблема может быть решена с использованием искусственной культивационной среды, но этот метод имеет свои недостатки и ограничения.

Таким образом, химический состав культивационных вод влияет на ответные реакции *D. magna*, что показано в тестах на чувствительность рачков к модельному токсиканту дихромату калия. При выборе или замене культивационной воды необходимо ориентироваться на количественный химический состав водной среды обитания в совокупности с адекватными реакциями синхронизированной молодежи *D. magna* на модельный токсикант. При получении стабильных реакций *D. magna* на модельный токсикант необходимо определить пригодность тест-организмов к анализам по показателям здоровья.

3.3.4. Влияние сезона года на чувствительность тест-организмов

Лабораторные тест-культуры несмотря на длительное содержание в стандартизированных оптимальных условиях имеют биологические ритмы, накладывающие свой отпечаток на результат проводимых экспериментов [159, 162].

Чувствительность лабораторной культуры *D. magna* к стандартным токсикантам – одна из важнейших ее характеристик. В соответствии с российскими протоколами токсикологических исследований калибровка чувствительности *D. magna* проводится каждый квартал календарного года. В качестве эталонного токсиканта используется двуххромовокислый калий ($K_2Cr_2O_7$) в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5 мг/дм³ [23].

Установление чувствительности культуры *D. magna* к эталонному токсиканту двуххромовокислему калию проводилось нами регулярно в течение 4 лет в каждый сезон года. Для модельного эксперимента по определению среднелетальной концентрации токсиканта использовалась молодежь дафний в возрасте от 6 до 24 часов, полученная от синхронизированной по возрасту культуры. Результаты 2016 года приведены в таблице 56 (см. предыдущий раздел).

В течение всех четырех сезонов года чувствительность дафний соответствовала пределам, установленным государственной методикой (0,9–2,0 мг/л). Однако в зимний период чувствительность рачков повышается. За анализируемый период с 2013 по 2016 гг. смертность дафний была выше зимой, чем в остальные сезоны. Такая тенденция каждый год выражалась в минимальных значениях среднелетальной концентрации в зимний период и максимальных летом. Показатель LD_{50} и его колебания в течение 4 лет отражены на рисунке 20.

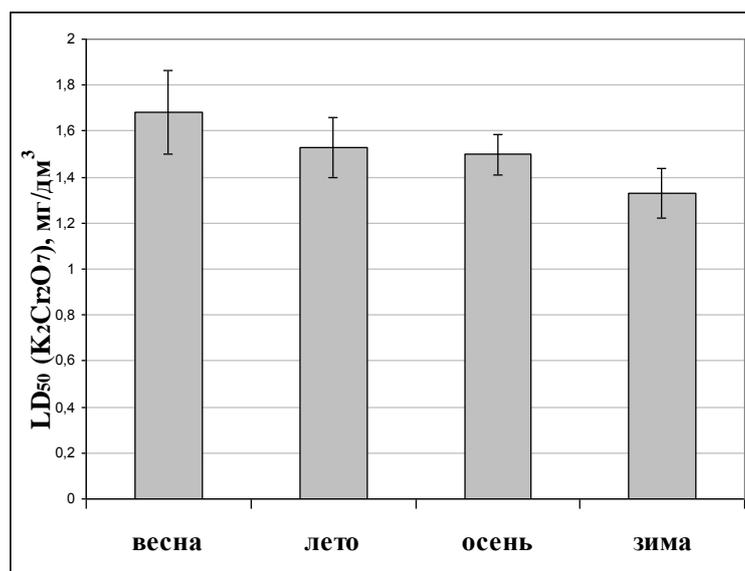


Рисунок 20 – Изменение чувствительности *D. magna* к модельному токсиканту K₂Cr₂O₇ в зависимости от сезона года

Максимальные различия между показателями LD₅₀ наблюдаются зимой и весной ($p=0,02$). Различия чувствительности *D. magna* в другие сезоны оказались не достоверны. Повышение чувствительности рачков в зимний период можно объяснить наступлением периода относительного покоя, свойственного для животных континентального климата. Лабораторные тест-организмы, лишённые естественных колебаний температурного фактора, сохраняют биоритмы, вероятно, за счёт естественного освещения, дополняющего искусственный свет климатической камеры.

Таким образом, долговременный эксперимент показал влияние сезонных ритмов на чувствительность *D. magna*, максимальная чувствительность к дихромату калия у рачков наблюдалась в зимний период. Этот факт необходимо учитывать при планировании исследований и интерпретации результатов. В каждой лаборатории необходимо иметь представление о сезонной динамике чувствительности собственной культуры, поскольку выявленные нами закономерности могут не соблюдаться в силу множества факторов.

3.3.5. Рекомендации по культивированию и контролю здоровья тест-культур на примере *D. magna*

Здоровье тест-культур, используемых в биотестировании – залог получения объективных и достоверных результатов проводимых с их помощью исследований. Требования к содержанию каждого биологического вида специфичны, однако можно выделить основные факторы, контроль которых позволит иметь удовлетворяющую условиям биотестирования культуру:

1. Культивационная вода – это наиболее важный фактор, формирующий здоровье и ответные реакции на загрязняющие вещества у гидробионтных тест-организмов.

2. Поддержание оптимальных и стабильных абиотических и биотических условий содержания тест-культуры.

3. Наблюдение и корректировка качественных и количественных критериев здоровья тест-культуры.

Описанные выше эксперименты позволили сформулировать следующие рекомендации для содержания и контроля здоровья *D. magna* в лабораторных популяциях согласно трем указанным факторам.

1. Процедуры выбора, подготовки и замены культивационной воды для *D. magna* представлены на опорной схеме (рис. 21).



Рисунок 21 – Выбор и подготовка культивационной воды для содержания *D. magna*

На рисунке 21 показано, что наиболее предпочтительная вода для лабораторного содержания *D. magna* – природная артезианская. Биологизация воды как способ подготовки культивационной воды с использованием высшей водной растительности имеет свои достоинства и недостатки. Замена воды и выбор новой культивационной воды – это мероприятие, которое необходимо проводить, если культура *D. magna* долгое время находится в неудовлетворительном состоянии по критериям здоровья (см. ниже) и не соответствует требуемой чувствительности к модельному токсиканту. Такая вынужденная процедура требует соблюдения ряда условий:

– новая культивационная вода должна быть исследована как минимум по показателям уровня pH, содержания растворенного кислорода, общей жесткости и содержанию основных загрязняющих веществ (тяжелые металлы, нефтепродукты, минеральные формы азота, специфические для региона загрязняющие вещества и т. д.). Пример полного и сокращенного

химического анализа культивационной воды для *D. magna* приведен в Приложениях 1 и 2:

– культуру *D. magna* как маточную, так и синхронизированную, нужно разделить на две части: одну часть содержать на уже известной культивационной воде, другую – на новой, проводя при этом сравнительные наблюдения по качественным и количественным признакам (см. ниже);

– при проведении наблюдений необходимо учитывать важную особенность смены культивационной воды: в большинстве случаев процедура приводит к положительному стимулирующему эффекту. В первые 2–3 месяца может увеличиться размер особей и появляющейся молоди, нормализуется цвет покровов дафний, увеличивается плодовитость рачков, снижается чувствительность к модельному токсиканту. К сожалению, не всегда первичный положительный результат стабильно сохраняется. Вероятно, такая стимуляция связана с тем, что со сменой воды устраняется причина ухудшения состояния дафний, поступают микроэлементы, находившиеся в недостатке в «старой» воде. Одновременно свойства «новой» воды еще не успели оказать в полной мере влияние на рачков;

– при адаптации культуры к новой культивационной воде, необходимо вести усиленный контроль чувствительности (1 раз в месяц) по отношению к модельному токсиканту в течение 6 месяцев. Это позволит наблюдать описанный выше эффект (или его отсутствие) и дальнейшую стабилизацию состояния культуры. При получении положительных результатов периодичность контроля сокращают до 1 раза в квартал.

2. Для рачков *D. magna* кроме химического состава культивационной воды наиболее важным абиотическим фактором поддержания их здоровья является температура, а биотическим – плотность посадки (при условии достаточности кормления). Изучение сочетания этих факторов привели к следующим рекомендациям:

– культуру *D. magna* необходимо содержать при 20°C. Культивирование рачков в более теплых условиях (25°C) стимулирует их

плодовитость, но сокращает продолжительность жизни, то есть ухудшает здоровье особей;

– оптимальная плотность посадки *D. magna* в среду обитания 25 особей на 1 дм³. Низкая плотность посадки приводит к высокой плодовитости, истощающей культуру. Эффект аналогичен культивированию в теплых условиях: происходит сокращение длины жизни. Высокая плотность посадки вызывает задержку развития особей даже в условиях оптимальной температуры и достаточного питания. Это приводит к уменьшению удельной плодовитости.

3. Дополнительными критериями здоровья тест-культуры и ее пригодности для биотестирования, кроме чувствительности к модельному токсиканту, предлагаем считать качественные параметры, диагностируемые визуально, и несколько количественных параметров. Их учет необходимо проводить следующим образом:

– визуальные наблюдения за здоровьем тест-культуры должны быть ежедневные, они представлены на рисунке 22.

Признаки здоровья *D. magna*

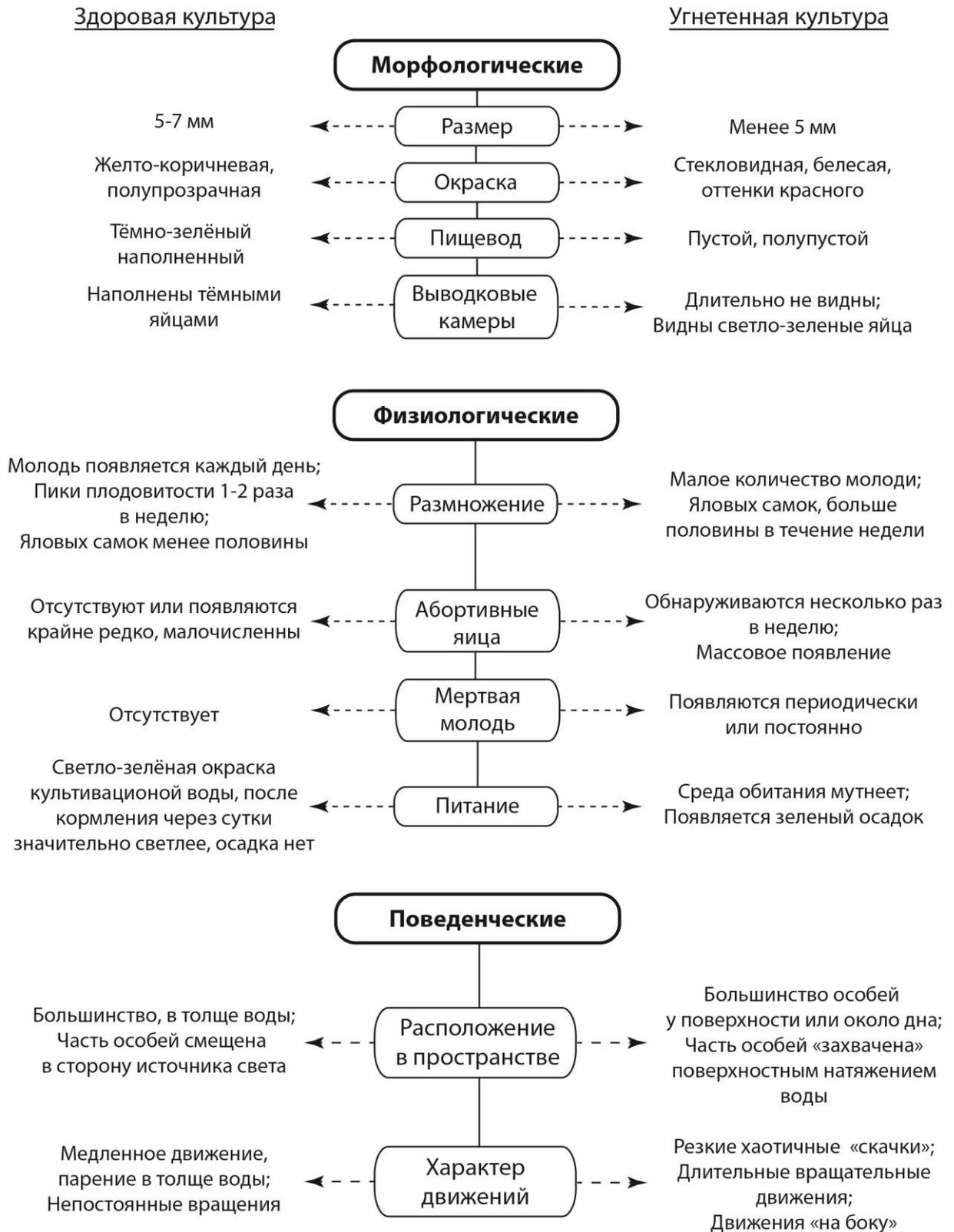


Рисунок 22 – Опорная схема для визуальных наблюдений за здоровьем *D. magna*

Данная схема может быть основой документированных процедур, которые сейчас активно внедряются в аккредитованных лабораториях,

разрабатываемых для внутреннего аудита и контроля качества лабораторных работ;

– продолжительность жизни и способность особей к размножению – универсальные критерии здоровья для многих животных. На них основаны количественные параметры для оценки здоровья культуры *D. magna*: день появления первой молоди, день первого массового приплода, средняя и максимальная продолжительность жизни, плодовитость в расчете на 1 самку, количество абортивных яиц.

Нет необходимости вести такую статистику у всех одновозрастных групп дафний постоянно. Для контроля здоровья культуры достаточно у каждой новой группы *D. magna* для получения синхронизированного потомства фиксировать день появления первой молоди, и один раз в полугодие наблюдать за полным жизненным циклом трех модельных популяций для оценки остальных указанных показателей здоровья тест-культуры. День первого приплода отмечается, когда в культивационном сосуде отмечена хотя бы одна дафния, родившаяся в этот день. День первого массового приплода фиксируется, когда обнаруженное количество молоди в 2 и более раз больше, чем плодящихся самок. Суть учета других параметров ясна, исходя из их названия;

– «день появления первой молоди» – критерий для наиболее оперативной оценки состояния культуры *D. magna*, требующий учета у каждой новой синхронизированной культуры *D. magna*. Этот показатель может иметь индивидуальные пределы для каждой лаборатории и зависит от сезона года. Однако его отклонение от среднего значения более чем на 5 дней будет свидетельствовать о проблемах с воспроизводством культуры и снижением надежности тест-функции «плодовитость»;

– выявленные в проведенных экспериментах количественные значения средней и максимальной продолжительности жизни, а также плодовитости в расчете на 1 самку у культуры *D. magna* можно считать лишь условными ориентирами, поскольку установление нормы для таких показателей

осложняется многофакторностью их формирования, и, прежде всего, – различием в используемых культивационных водах. В этой ситуации приемлемым выходом является наблюдение за культурами *D. magna* в созданных для них условиях в рамках рекомендуемых и накопление данных о состоянии их здоровья. Так в лабораториях будут накапливаться собственные средние значения наиболее важных показателей состояния культуры, с которыми можно будет вести сравнение. Как правило, отклонение биологического показателя от исторического значения на 20% свидетельствует о качественных изменениях состояния организмов;

– наличие абортивных яиц при содержании дафний является нежелательным явлением. Их количество свыше 20% от суммарного количества молодежи будет свидетельствовать о резком ухудшении здоровья лабораторной популяции;

– как сказано выше, пригодность культуры *D. magna* к биотестированию нужно определять не только по чувствительности к модельному токсиканту, поскольку данный тест оценивает адекватность острых эффектов. При использовании культуры *D. magna* в хронических экспериментах нами предлагается 1 раз в год отслеживать коэффициент суточного прироста смертности в специально созданных модельных группах рачков (25 шт./дм³ в 3 повторностях). Этот параметр стабилен и равен 1,1 с коэффициентом вариации от 1,5% до 8%. Значительные отклонения от параметра укажут на проблемы «здоровья» культуры.

Таким образом, в каждой лаборатории внутренний контроль качества работ должен идти по пути совершенствования и оптимизации. В области биотестирования одно из важнейших направлений, требующих внедрения дополнительных механизмов контроля, – состояние тест-культуры, ее пригодность к биотестам. За здоровьем тест-культур нужно вести непрерывные наблюдения. Использование единственного параметра – чувствительности к модельному токсиканту, недостаточно для контроля состояния культуры и выяснения причин отклонения от условной нормы.

При долговременном культивировании тест-организмов необходимо вести контроль качества химического состава культивационной воды, контроль чувствительности культуры к модельному токсиканту, контроль качественных и количественных параметров здоровья культуры, а также учитывать сезонные колебания указанных характеристик.

3.3.6. Использование стратегии стандартизации тест-культуры и определения её пригодности к биоанализам в лаборатории биотестирования

Стандартизация тест-культур связана с трудностями, исходящими из сути работ с живыми организмами, которые своей генетической изменчивостью, наличием биоритмов и других факторов чувствительности к химическим веществам, неминуемо создают некоторую вариативность [165]. При сравнении культур одинакового биологического вида у двух лабораторий, можно обнаружить, по меньшей мере, морфологические отличия особей данных искусственных популяций. Переход к повышенным требованиям стандартизации тест-культур необходим для получения результатов, воспроизводимых по унифицированному методу в любой лаборатории.

Разработанный контроль пригодности тест-культуры по критериям ее здоровья, как элемент новой стратегии планирования и проведения биотестирования, апробировали в лаборатории специализированной инспекции аналитического контроля (СИАК) КОГБУ «Областной природоохранный центр» (г. Киров), не являющейся базой наших основных экспериментов. Наблюдение вели за модельными группами *D. magna*, содержащимися в оптимальных условиях: плотности посадки 25 особей/л, температура культивирования 20°C, световой период 12 часов, уровень освещения 1000 лк, ежедневный уход в соответствии с общепринятой методикой [23]. В качестве оперативных критериев здоровья тест-организмов определяли показатели «день появления первой молодежи» и «день первого массового приплода».

Эксперимент проводился до конца жизни последней особи в группе для расчета таких показателей как средняя и максимальная продолжительности жизни особей, удельная плодовитость и количество абортивных яиц. Опыт проводили в трехкратной повторности.

В качестве условного эталона указанных характеристик культуры *D. magna* использовали наилучшие параметры здоровья, установленные для культуры научно-исследовательской экоаналитической лаборатории (НИЭЛ) в экспериментах с варьированием абиотических и биотических факторов содержания дафний [165, 408]. Полученные результаты приведены в таблице 57.

Таблица 57 – Показатели здоровья двух лабораторных культур *D. magna* (плотность 25 особей на 1 дм³, 20°С)

Показатели	НИЭЛ	СИАК
День первого приплода	10±2	17±2
День первого массового приплода	18±2	27±3
Средняя продолжительность жизни, дни	79,7±1,0	46,6±2,3
Максимальная продолжительность, жизни, дни	114,0±1,7	74,0±2,1
Средняя плодовитость шт./1 взрослую самку	74,3±2,4	21,4±3,5
Коэффициент суточного прироста смертности (<i>k</i>)	1,07±0,02	1,04±0,02
Количество абортивных яиц, шт.	0	3±1

Примечание: НИЭЛ – научно-исследовательская экоаналитическая лаборатория ВятГУ (г. Киров); СИАК - специализированная инспекция аналитического контроля (СИАК) КОГБУ «Областной природоохранный центр» (г. Киров).

Сведения в таблице 57 показывают, что развитие дафний в культуре лаборатории СИАК происходит с задержкой. Согласно литературным данным первое появление потомства у *D. magna* должно происходить с 7 по 12 сутки жизни особей [23, 302, 408]. Средняя и максимальная продолжительности жизни снижены в 1,7 и 1,5 раза соответственно по

сравнению с показателями ракообразных НИЭЛ. Значительно снижена средняя плодовитость рачков, что приводит к заниженным результатам учета плодовитости в контрольных вариантах экспериментов, что подтверждаются анализом журналов наблюдений лаборатории СИАК.

Известно, что одним из главных условий длительного успешного содержания аквакультур и получения надежных воспроизводимых результатов биотестирования является тщательный выбор культивационной среды и регулярный контроль ее качества [294]. Поэтому для выяснения причин неудовлетворительного состояния культуры *D. magna* в лаборатории СИАК в течение года проводили контроль химического состава культивационной воды, параллельно с калибровкой чувствительности культуры к модельному токсиканту. Таких токсикантов как ТМ, фенолы, НП обнаружено не было, поэтому приводим ионный состав (табл. 58).

Таблица 58 – Физико-химические характеристики и ионный состав культивационной воды, лаборатория СИАК, 2016-2017 гг. [224]

Сезон	Э	pH	Ж	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
зима	1063	7,6	10,6	54±8	49±5	131±13	1,9±0,3	50±5	53±8	117±12
весна	1043	7,5	9,5	59±9	41±4	123±12	1,7±0,3	50±5	45±7	106±11
лето	666	7,4	8,2	58±9	40±4	123±12	2,3±0,4	58±6	50±8	101±10
осень	1043	7,4	10,8	48±7	41±9	149±15	2,0±0,3	54±5	51±8	105±11
Н-1	-	-	-	120,0	40,0	180,0	50,0	300,0	40,0	100,0
Н-2	-	6-9	7	200,0	50	-	-	350,0	45,0	500,0

Примечание: Н-1 – нормативы качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения [12]; Н-2 – нормативы для воды водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования [1]; прочерк означает, что показатель не нормируется; pH – показатель кислотности, в относительных единицах; Ж – общая жесткость (определена расчетным методом), ммоль/л; для ионов приведена массовая концентрация в мг/л; жирным шрифтом выделены значения, превышающие норматив.

По данным таблицы 58 видим, что согласно гигиеническим нормативам культивационная вода по большинству показателей, кроме содержания нитрат-ионов, удовлетворяет требованиям ГН 2.1.5.1315-03 [1]. Содержание нитратов находится на границе норматива с учетом

стандартного отклонения между параллельными измерениями параметра в пробе. Рыбохозяйственные нормативы, как известно, по многим показателям являются более строгими. Для анализируемых проб это приводит к заключению о превышении ПДК для ионов, участвующих в формировании жесткости – ионов магния и сульфат-ионов. Однако, установленные превышения даже относительно более строго норматива не существенны и находятся в пределах ошибки метода. Этого нельзя сказать о содержании нитрат-анионов: превышения относительно рыбохозяйственного норматива, наиболее приемлемого для тест-организмов, являются значимыми.

Нами установлена чувствительность *D. magna* к нитратам на уровне 10 ПДК в 24-дневном эксперименте по показателю достоверного угнетения плодовитости [160, 182]. Также нельзя исключать влияния более низких доз нитратов в условиях увеличенной экспозиции. Предположение о возможном влиянии нитратов на чувствительность рачков было проверено путем расчета коэффициента корреляции Пирсона (табл. 59).

Таблица 59 – Влияние содержания нитрат-анионов на чувствительность *D. magna* к модельному токсиканту

Сезон	Превышение содержания (NO ₃ ⁻)	LD ₅₀ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	Коэффициент Пирсона
Зима	1,30	0,95	-0,9
Весна	1,10	1,9	
Лето	1,25	1,5	
Осень	1,28	1,1	

Рассчитанный коэффициент корреляции (-0,9) свидетельствует об обратной зависимости между содержанием нитрат-ионов и среднелетальной концентрацией дихромата калия для *D. magna*. Следовательно, чем выше содержание нитрат-ионов, тем более чувствительными становятся низшие ракообразные. Этот пример наглядно демонстрирует причину ослабления культуры, выявленную по набору критериев здоровья тест-организмов.

Исследованная культивационная вода относится к природным подземным водам. Ее источник – родник с выходом на поверхность в черте города Кирова. Антропогенное влияние, складывающееся в городских

условиях, является наиболее вероятной причиной выявленной особенности химического состава данной воды, сохраняющейся по сезонам года.

В описанном случае химический агент, влияющий на состояние тест-культуры, был выявлен среди соединений макроэлемента. Не редко встречаются подземные воды, по большинству показателей относящиеся к питьевым, но вследствие геохимических причин обогащенные микроэлементами. Выяснить это позволяет только наиболее полный химический анализ культивационной воды. Примеры результатов полного химического анализа и ежемесячного химического анализа воды, используемой в наших экспериментах для культивирования *D. magna*, *C. affinis*, *P. caudatum* приведены в Приложениях 1 и 2.

Таким образом, контроль показателей здоровья тест-культуры *D. magna* в опытной лаборатории показал проблемы ее состояния, что не было обеспечено в полной мере контролем ее чувствительности к модельному токсиканту. Сезонное наблюдение за организмами и химическим составом культивационной воды выявили причину ухудшения здоровья культуры. Лаборатории СИАК предложены рекомендации по поддержанию и контролю здоровья тест-культуры *D. magna*, описанные в разделе 3.3.4 настоящей работы.

Таким образом, в разделе 3.3. экспериментально установлено влияние факторов культивирования на основные параметры жизнедеятельности модельных групп *D. magna* и выявлены условия стандартизации данной тест-культуры для определения ее пригодности к токсикологическим анализам. Показано, что при оптимальных условиях культивирования – температуре 20°C и плотности посадки 25 особей/дм³ – оперативными критериями здоровья тест-организмов *D. magna* являются «день первого появления молодежи» (10±3 дня) и «день первого массового приплода» (18±3). Критериями, определяемыми за полный цикл жизни особей *D. magna*, являются средняя продолжительность жизни 79,7±1,0 дней, максимальный срок жизни особи в группе, равный 114,0±1,7 дней и удельная плодовитость особей 74,3±2,4.

Следовательно, по результатам проведенных экспериментов подтверждена эффективность стратегии биотестирования с учетом стандартизации тест-культуры, 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.

Разработанный и апробированный вариант стандартизации тест-культур применим для большинства видов тест-организмов при использовании принципа: регулярное отслеживание параметров жизнедеятельности на протяжении всего жизненного цикла организмов.

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

Увеличение числа выполняемых биотестов, не всегда приводит к получению объективных экологически значимых результатов. В задачи современной методологии биотестирования входит не только разработка новых методов биотестирования, но и создание единого процесса получения объективных результатов об экологическом состоянии тестируемых сред. Данный процесс должен объединять этапы планирования экологических исследований, подготовку тест-культур к биоанализам, пробоподготовку, проведение биотеста, обработку полученных результатов и их интерпретацию.

При планировании экологических исследований с использованием методов биотестирования необходимо учитывать особенности подлежащих тестированию сред. Например, часто природные подземные воды и сточные воды содержат большое количество минеральных солей – отличаясь высокой минерализацией (выше 15–30 г/дм³). Такая ситуация требует либо постепенной адаптации тест-культур к осолоненным средам, либо использования в качестве тест-организмов галофилов. Известно, что эвригалинные гидробионты мало пригодны для биотестирования [262].

Природные поверхностные воды в большей степени различаются по насыщенности взвешенным и растворенным органическим веществом, что учитывается при выборе соответствующих уровню сапробности тест-организмов либо включением в процесс биотестирования дополнительных процедур пробоподготовки.

Этап отбора проб и их подготовки к биотестированию крайне важен для получения объективных достоверных результатов об экологическом состоянии исследуемой территории. Методологическая основа реализации этих этапов в биотестировании заимствована в основном из документов по количественному химическому анализу проб. При этом могут быть упущены

особенности, влияющие на реакции организмов – живых датчиков информации. Так, образцы почвы могут содержать растительные остатки, способные значительно влиять на функции многих организмов: валериану лекарственную *Valeriana officinalis*, вех ядовитый *Cicuta virosa*, олеандр обыкновенный *Nerium oleander* и другие [176].

Оценка чувствительности тест-культур является обязательным, но не единственным элементом их подготовки к биотестированию проб. Во многих лабораториях биотестирования утверждаются документированные процедуры контроля стабильности химического состава культивационных вод, вводятся внутренние регламенты содержания и разведения организмов в дополнение к рекомендациям методик, ведутся наблюдения за сезонными ритмами организмов, способными повлиять на результат биоанализа [157]. При этом специалистами и учеными отмечается важность дальнейшей работы по стандартизации подготовки культур к биотестированию [217, 294, 376].

Центральным звеном в цепочке необходимых процедур биотестирования является проведение биотеста – оценка в строго определенных условиях действия вещества или комплекса веществ на водные организмы путем регистрации изменений того или иного биологического (физиолого-биологического) показателя исследуемого объекта по сравнению с контролем [254]. Методики биотестирования содержат наиболее подробные описания этого этапа, однако не редко у специалистов возникают вопросы.

Заключительный этап биотестирования – интерпретация полученного результата. Фактически он состоит из двух частей. Во-первых, разработчик методики дает указания по вынесению заключения о наличии или отсутствии токсичности, в ряде методик – о степени токсичности. Во-вторых, часто требуется установить взаимосвязь между установленными токсическими эффектами и загрязнением исследуемой среды.

Каждый этап биотестирования насыщен научно-методологическими вопросами, не имеющими однозначных ответов в силу сложности и чрезвычайной многогранности процесса. В таблице 60 приведены примеры ситуаций, снижающих качество токсикологических анализов, проанализированы основные причины их возникновения и даны приемы оптимизации целостного процесса биотестирования, включая элементы стратегии планирования и проведения биоанализов, разработанных и апробированных в работе.

Таблица 60 – Оптимизация планирования и проведения процедур биотестирования

Ситуации снижения качества токсикологических анализов	Причины их возникновения	Классические приемы решения проблемных ситуаций	Использование качественной стратегии биотестирования
Ухудшение состояния тест-культур при их длительном культивировании	- Несоблюдение оптимальных условий культивирования тест-организмов; - контроль здоровья тест-организмов и их пригодности к биоанализам по единственному критерию – чувствительности к модельному токсиканту	Строгая регламентация условий содержания тест-организмов	Использование дополнительных критериев для контроля здоровья тест-организмов
Колебания чувствительности тест-культуры к модельному токсиканту	- Нестабильный состав культивационной воды; - биологические ритмы тест-организмов; - изменение показателей здоровья тест-культуры вследствие действия биотических и абиотических факторов	Параллельный контроль качества культивационной воды и калибровка чувствительности тест-культуры с выявлением возможных факторов риска	- Внедрение дополнительных мероприятий по контролю здоровья культуры; - Определение естественных сезонных флуктуаций чувствительности тест-организмов

Продолжение таблицы 60			
Низкая чувствительность тест-организмов при высоком уровне загрязнения среды	Снижение биодоступности токсичных элементов за счет различных физико-химических процессов (комплексобразования, органо-минеральных взаимодействий, адсорбции на поверхности крупных частиц и т. д.)	Увеличение «батареи биотестов»	- Оценка токсичности по предлетальным тест-функциям; - системное биотестирование с определением спектра ответных реакций базового тест-организма
Отсутствие прямой закономерности между уровнем загрязнения и ответными реакциями тест-организма	- Различные формы соединений элементов, отличающиеся лабильностью и биодоступностью; - явления взаимного синергизма и антагонизма веществ при совместном присутствии в растворе	Увеличение «батареи биотестов»	Выявление и использование целевых биотестов, отличающихся повышенной чувствительностью к наиболее распространенным токсикантам
Стимуляции тест-функций организмов веществами, присутствующими в тестируемых водных средах	- Проявление начальной стадии токсического эффекта действующего вещества; - стимулирующее действие биогенных и эссенциальных элементов в тестируемой среде; - явления взаимного синергизма и антагонизма веществ при совместном присутствии в растворе.	Увеличение «батареи биотестов»	Системное биотестирование, включающее оценку хронических и отдаленных эффектов

Таким образом, элементы разработанной и апробированной в работе стратегии планирования и проведения биотестирования способствуют решению наиболее распространенных в практике биотестирования проблем и позволяют реализовать подход к оценке токсичности водной среды с учетом множества факторов, влияющих на результат биотеста.

Для внедрения предложенных мероприятий в менеджмент качества результатов биотестирования разработана функциональная модель научно-обоснованной стратегии единого процесса планирования и проведения биотестирования (рис. 23).

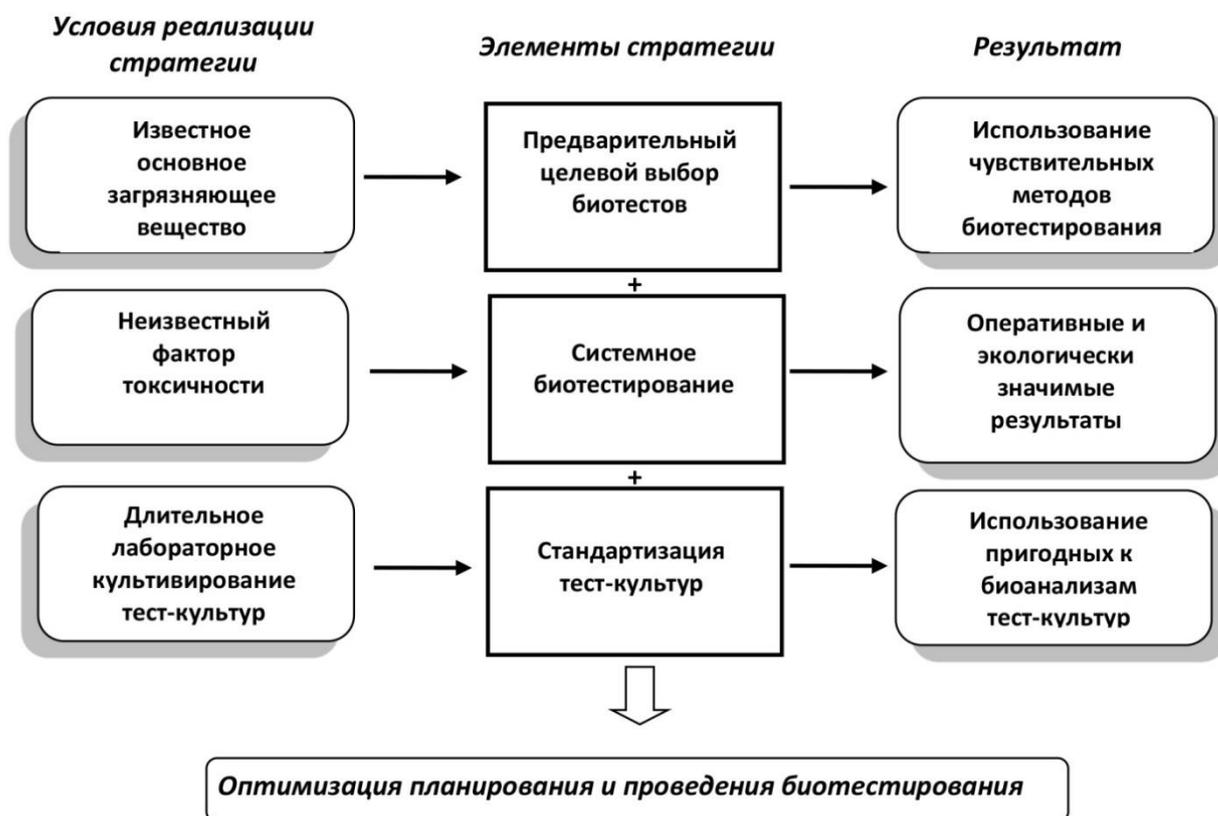


Рисунок 23 – Функциональная модель научно-обоснованной стратегии планирования и проведения биотестирования

Согласно модели научно-обоснованной стратегии биотестирования при планировании экологических исследований с использованием методов биотестирования необходимо определить сложившиеся условия, включить в план работ реализацию соответствующего элемента стратегии биотестирования, приводящего к искомому результату:

1. Загрязняющее вещество, формирующее основной фактор токсичности определяется в предварительных аналитических исследованиях либо посредством анализа данных экологического мониторинга исследуемой территории. Таковым признаётся вещество, преобладающее по массе

выброса (сброса) над другими и/или имеющее высокий класс опасности. Такая ситуация требует целевого выбора биотеста, максимально чувствительного к данному виду загрязнения.

2. При неустановленном факторе токсичности, проявляющемся в том числе отсрочено и/или в результате сочетанного действия веществ, в план экологических исследований необходимо включить системное биотестирование, заключающееся в оценке спектра реакций базового организма *D. magna* с установлением предлетальных, летальных и хронических эффектов. Это позволит получить как оперативные результаты экспрессно проявляющихся тест-функций, так и данные об отсроченных во времени эффектах, имеющих высокую ценность для прогнозирования процессов, происходящих в реальных экосистемах при сложившемся антропогенном прессе.

3. Продолжительные экологические исследования такие, как реализация программ экологического мониторинга и работы, направленные на выявление сезонной динамики природных процессов, требуют длительного культивирования тест-организмов, которые должны сохранять одинаковую чувствительность к токсикантам для получения с их помощью достоверных воспроизводимых результатов биотестирования. Стандартизация культур по расширенному перечню критериев здоровья тест-организмов даст гарантии их пригодности к серии токсикологических анализов.

Таким образом, биотестирование – это сложный процесс, начинающийся с планирования исследований и приводящий к получению объективной информации о токсичности тестируемых сред. В связи с особенностями выполнения исследований с помощью живых организмов, в методологии биотестирования остаются нерешенные научные проблемы. Общим принципом их решения является комплексный учет факторов, влияющих на ответные реакции тест-организмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные в работе результаты, сформулированные подходы и положения являются частью общенаучной тенденции в сфере биодиагностики экологического состояния окружающей среды, заключающейся в необходимости совершенствования, оптимизации и унификации ее методологических основ. В результате разработки новой стратегии биотестирования обоснована эффективность целевого выбора биотестов при загрязнении водных сред минеральными и органическими токсикантами, показано диагностическое и прогнозное значение системного биотестирования по комплексу последовательно проявляющихся ответных реакций тест-организмов, предложен новый подход к контролю пригодности тест-культур по показателям, зависящим от стандартизируемых абиотических и биотических условий содержания организмов. Апробация результатов проведена с учетом особенностей воздействия на живые организмы наиболее распространенных и специфических для многих территорий загрязняющих веществ: соединений азота, фосфора, тяжелых металлов, нефтепродуктов, гербицидов, фталатов.

Предложенная стратегия биотестирования, учитывающая многофакторность ответных реакций тест-организмов, апробирована, внедрена и продолжает использоваться при исследованиях природных и антропогенно трансформированных территорий Кировской области: в зоне воздействия завершившего функционирование объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский», на территории вблизи комплекса химических предприятий г. Кирово-Чепецка, в районе Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов, на территориях городских урбосистем.

Практическое применение результаты исследований нашли в научных центрах и аккредитованных лабораториях при разработке программ экологического мониторинга, организации и оптимизации процедур биотестирования по современным научным и аккредитационным

требованиям, в том числе при организации аудита качества испытаний, проводимых методами биотестирования. Теоретические аспекты работы включены в ряд учебных пособий, учебно-методических комплексов дисциплин бакалавриата и магистратуры «Экология и природопользование», программ повышения квалификации специалистов.

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/дм³. 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/дм³ за счет стимуляции размножения избытком жизненного пространства. Снижение удельной плодовитости особей в 1,5 раза в группах с плотностью посадки, увеличенной до 50 особей/дм³, обусловлено торможением процессов созревания и дальнейшего размножения дафний.

7. Установлено, что при оптимальных условиях культивирования: температуре 20°C и плотности посадки 25 особей/дм³, оперативным критерием здоровья тест-организмов *D. magna* является «день первого появления молоди» – 10 ± 3 дня. Критериями, определяемыми за полный цикл жизни особей *D. magna*, являются средняя продолжительность жизни,

составляющая $79,7 \pm 1,0$ дней, максимальный срок жизни особи в группе, достигающий $114,0 \pm 1,7$ дней при удельной плодовитости особей – $74,3 \pm 2,4$ 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия
- БКР – безвредная кратность разбавления
- БР – биорегулятор
- ВМС – высокомолекулярные соединения
- ВПЛ – высокопластифицированный образец
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДОФ – пластификатор ди(2-этилгексил)ортофталат
- ЗВ – загрязняющее вещество
- ИПС – измеритель плотности суспензии
- МГТБ – мембранотропный гомеостатический тканеспецифический биорегулятор
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НП - нефтепродукты
- НПЛ - низкопластифицированный образец
- ПВ – предельное выпадение
- ПВХ – поливинилхлорид (ный)
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СДГ – сукцинатдегидрогеназа
- СПЛ – среднепластифицированный образец
- ТМ – тяжелые металлы
- ФОВ – фосфорорганические отравляющие вещества
- ЧСС – частота сердечных сокращений
- GSH – восстановленный глутатион

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Нормативно-правовая и нормативно-техническая документация

1. ГН 2.1.5.1315-03. Предельно-допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования : действ. с 15.06.2003 : с изм. от 13.07.2017. – Текст : электронный // Российская газета. – 2003. - № 119/1. – Режим доступа: норматив.-техн. система «Техэксперт».

2. ГОСТ 17.1.5.05-85. Охрана природы (ССОП). Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков : действ. с 01.07.1986. – Текст : электронный // Контроль качества воды : сб. ГОСТов. – Москва : Стандартинформ, 2010. – Режим доступа: норматив.-техн. система «Техэксперт».

3. ГОСТ 17.4.4.02-2017. ССОП. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа : действ. с 01.01.2019 / разработ. Ассоц. "НП КИЦ СНГ". – Москва : Стандартинформ, 2018. – Режим доступа: норматив.-техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

4. ГОСТ 31861-2012. Вода. Общие требования к отбору проб : действ. с 01.01.2014 / разработ. ООО «Протектор», ЗАО «Центр исследования и контроля воды». – Москва : Стандартинформ, 2019. – Режим доступа: норматив.-техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

5. ГОСТ 32424-2013. Классификация опасности химической продукции по воздействию на окружающую среду. Основные положения (с Поправкой) : действ. с 01.08.2014 / разработ. ФГУП "ВНИЦСМВ". – Москва : Стандартинформ, 2014. – Режим доступа: норматив.-техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

6. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий : действ. с 01.09.2019 / разработ. Гос. предприятием «БГЦА». – Москва : Стандартинформ, 2019. – Режим доступа: норматив.-техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

7. ГОСТ Р 8.563-2009. ГСИ. Методики (методы) измерений : действ. с 15.04.2010 / разработ. ФГУП "ВНИИМС". – Москва : Стандартинформ, 2019. – Режим доступа: норматив.-техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

8. О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами : Федер. закон от 19.07.1997 № 109-ФЗ ; ред. от 27.12.2019. – Текст : электронный // Российская газета. – 1997. - № 142. – Режим доступа: справ.-правовая система «КонсультантПлюс».

9. О техническом регулировании : Федер. закон от 27.12.2002 N 184-ФЗ ; ред. от 28.11.2018. – Текст : электронный // Российская газета. – 2002. - № 245. – Режим доступа: справ.-правовая система «КонсультантПлюс».

10. Об утверждении Критериев аккредитации, перечня документов, подтверждающих соответствие заявителя, аккредитованного лица критериям аккредитации, и перечня документов в области стандартизации, соблюдение требований которых заявителями, аккредитованными лицами обеспечивает их соответствие критериям аккредитации : Приказ Минэкономразвития России от 30.05.2014 N 326 ; действ. с 07.09.2014 ; с изм. от 19.08.2019. – Текст : электронный // Российская газета. – 2014. - № 193. – Режим доступа: справ.-правовая система «Консультант Плюс».

11. Об утверждении Критериев отнесения отходов к I–V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду : Приказ Минприроды России № 536 от 4.12.2014 ; действ. с 11.01.2016. – Режим доступа: справ.-правовая система «Консультант Плюс». – Текст : электронный.

12. Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения : Приказ Росрыболовства от 04.08.2009 № 695 ; ред. от 22.12.2016. – Текст : электронный // Бюллетень нормативных актов федеральных органов

исполнительной власти. – 2009. – N 43. – Режим доступа: справ.-правовая система «Консультант Плюс».

13. Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения : Приказ Минсельхоза России от 13.12.2016 N 552 ; ред. от 12.10.2018 ; действ. с 16.04.2017. – Режим доступа: справ.-правовая система «Консультант Плюс». – Текст : электронный.

14. ПНД Ф 14.1:2:4.3-95. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации нитрит-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Грисса / разработ. ФБУ "ФЦАО". – Москва : ФБУ "ФЦАО", 2011. – Режим доступа: норматив.- техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

15. ПНД Ф 14.1:2:4.4-95. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации нитрат-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с салициловой кислотой : с Изм. и доп. № 1 / разработ. ФБУ "ФЦАО". – Москва : ФБУ "ФЦАО", 2011. – Режим доступа: норматив.- техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

16. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. Количественный химический анализ почв. Методика измерения массовой доли нефтепродуктов в почве и донных отложениях методом ИК-спектрометрии / разработ. Тюмен. Гос. ун-т, ФБУ "ФЦАО". – Москва, 2005. – Режим доступа: норматив.- техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

17. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04, Т 16.1:2.3:3.8-04. Токсикологические методы анализа. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биоллюминесценции тест-системой "Эколюм" /

разраб. ЗАО "НВО "Иммунотех". – Москва, 2010. – Режим доступа: норматив.- техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

18. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06, Т 16.1:2:2.3:3.9-06. Токсикологические методы контроля. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета / разраб. ФГОУ ВПО "Сибирский федеральный университет". – Москва, 2014. – Режим доступа: норматив.- техн. система «Техэксперт». – Текст : электронный.

19. ФР 1.31.2005.01724. Методика выполнения измерений массовой концентрации фторид-, хлорид-, нитрат-, фосфат- и сульфат-ионов в пробах питьевой, минеральной, столовой, лечебно-столовой, природной и сточной воды методом ионной хроматографии : свидетельство №19-08 от 04.03.2008. - URL : <http://www.prochrom.ru/ru/?id=4&idp=met&mode=mdesc> (дата обращения: 27.03.2020). – Текст : электронный.

20. ФР 1.31.2005.01738. Методика выполнения измерений массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, магния, кальция, стронция в пробах питьевой, минеральной, столовой, лечебно-столовой, природной и сточной воды методом ионной хроматографии : Свидетельство №18-08 от 04.03.2008. URL: <http://www.prochrom.ru/ru/?id=3&idp=met>.
<http://www.prochrom.ru/ru/?id=3&idp=met> (дата обращения: 27.03.2020). – Текст : электронный.

21. ФР 1.31.2012.135739. Методика выполнения измерений массовых долей токсичных металлов в пробах почв атомно-абсорбционным методом. – Москва : Акварос, 2012. – 40 с. – Текст : непосредственный.

22. 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 : действ. с 17.10.2005 / разраб. ООО Акварос. – URL :

<https://meganorm.ru/Index2/1/4293842/4293842244.htm> (дата обращения: 27.03.2020). – Текст : электронный.

23. 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 : действ. с 17.10.2005 / разработ. ООО Акварос. – URL : <https://meganorm.ru/Index2/1/4293842/4293842234.htm> (дата обращения: 27.03.2020). – Текст : электронный.

24. 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» : действ. с 15.12.2014 ; отменен с 15.02.2020 / разработ. ООО Спектр-М. – URL : <https://meganorm.ru/Index2/1/4293758/4293758204.htm> (дата обращения: 27.03.2020). – Текст : электронный.

25. ФР 1.39.2015.19243. Методика определения токсичности проб почв, донных отложений и осадков сточных вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер» : действ. с 15.12.2014 ; отменен с 15.02.2020 / разработ. ООО Спектр-М. – URL : <https://meganorm.ru/Index2/1/4293758/4293758202.htm> (дата обращения: 27.03.2020). – Текст : электронный.

26. Biological test method: Acute lethality test using *Daphnia* spp : Report EPS 1/RM/11 (with May 1996 amendments) / Government of Canada. – Ottawa ; Ontario, 1990. – (Environmental protection series). – ISBN 0-662-18076-3. – 75 p. – URL: <https://www.canada.ca/content/dam/eccc/migration/main/faunescience-wildlifescience/dfad4a5b-4216-4ed8-af90-98a6de8f7b6b/rm11e.pdf>. (accessed: 15.03.2020). – Text : electronic.

27. Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga : Report EPS 1/ RM/25 / Method Development and Applications Section Environmental Science and Technology Centre Science and Technology Branch

Environment Canada. – 2-nd ed. – Ottawa ; Ontario, 2007. – (Environmental protection series). – ISBN 978-0-662-45505-9. – 78 p. – URL: <https://www.canada.ca/content/dam/eccc/migration/main/faunescience-wildlifescience/afa6529f-02c5-429c-a507-c2cf6eadeb0a/rm25-202nded-algaeenglish.pdf> (accessed: 07.04.2020). – Text : electronic.

28. ISO 10706-2000. Water Quality – Determination of Long Term Toxicity of Substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) : applicable from 01.04.2000 / International Organization for Standardization. – Geneva, 2000. – 17 p. – Text : unmediated.

29. ISO 6341-1996. Water Quality – Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute Toxicity Test : withdrawn / International Organization for Standardization. – Geneva, 1996. – 7 p. – Text : unmediated.

30. ISO 6341-2012. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test : applicable from 15.10.2012 / International Organization for Standardization. – Geneva, 2012. – 22 p. – Text : unmediated.

31. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms : EPA 821/R-02/012 / US Environmental Protection Agency (USEPA). – 5th ed. – Washington DC, USA, 2002. – 275 p. – URL: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf (accessed: 09.04.2020). – Text : electronic.

32. Test No. 202. *Daphnia sp.* acute immobilisation test : adopted 23.11.2004 / OECD. – 12 p. – DOI 10.1787/9789264069947-en. – Text : electronic // OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2. – URL: <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en> (accessed: 08.04.2020).

33. Test No. 211. *Daphnia magna* reproduction test : adopted 02.10.2012 / OECD. – 25 p. – DOI 10.1787/9789264185203-en. – Text : electronic // OECD

Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2. – URL: <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en> (accessed: 08.04.2020).

34. Test No. 219. Sediment-water chironomid toxicity using spiked water : adopted 13.04.2004 / OECD. – 21 p. – DOI 10.1787/9789264070288-en. – Text : electronic // OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2. – URL: <https://doi.org/10.1787/9789264070288-en> (accessed: 08.04.2020).

Научная литература

35. Авакян, З. А. Сравнительная токсичность тяжелых металлов для некоторых микроорганизмов / З. А. Авакян. – Текст : непосредственный // Микробиология. - 1967. - № 3. - С. 805-807.

36. Агбальян, Е. В. Оценка устойчивости озерных экосистем Ямало-Ненецкого автономного округа к кислотным выпадениям / Е. В. Агбальян, В. Ю. Хорошавин, В. Е. Шинкарук. – Текст : непосредственный // Вестник Тюменского государственного университета. - 2015. - Т. 1, № 1(1). - С. 45-54.

37. Актуальные вопросы в сфере обращения с отходами биопластиковой индустрии / В. А. Терехова, Н. Г. Рыбальский, Т. О. Попутникова [и др.]. – Текст : непосредственный // Использование и охрана природных ресурсов в России. – 2018. - № 4. - С. 70-79.

38. Александрова, В. В. Анализ корреляционной зависимости выживаемости и плодовитости тест-объекта *Ceriodaphnia affinis* с химическим составом воды / В. В. Александрова. – Текст : непосредственный // Вестник Нижневарттовского государственного университета. – 2008. - № 3. - С. 60-63.

39. Алексеева, Т. П. Перспективы использования торфа для очистки нефтезагрязненных почв / Т. П. Алексеева, Т. И. Бурмистрова, Н. Н. Терещенко. – Текст : непосредственный // Биотехнология. – 2000. - № 1. - С. 58-65.

40. Алымова, Т. П. Влияние хронического фенольного отравления на биологию дафний / Т. П. Алымова. – Текст : непосредственный //

Формирование и контроль качества поверхностных вод. Вып. 1. – Киев : Наукова думка, 1975. - С. 34–39.

41. Альберт, А. Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии : в 2 т. / А. Альберт. – Москва : Медицина, 1989. – 2 т. – Текст : непосредственный.

42. Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы : материалы V Всерос. конф. по водной экотоксикологии. Современные методы исследования состояния поверхностных вод в условиях антропогенной нагрузки : материалы шк.-семинара для молод. ученых, аспирантов и студентов, Борок, 28 окт. - 1 нояб. 2014 г. : [в 2 т.] / РАН, Ин-т биологии внутр. вод им. И. Д. Папанина РАН [и др.]. - Ярославль : Филигрань, 2014. – 2 т. - ISBN 978-5-906682-13-0. – Текст : непосредственный.

43. Ашихмина, Т. Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия / Т. Я. Ашихмина. - Киров : Вятский гос. пед. ун-т, 2002. - 538 с. - ISBN 5-85271-036-9. - Текст : непосредственный.

44. Бакаева, Е. Н. Гидробионты в оценке качества вод суши / Е. Н. Бакаева, А. М. Никаноров. - Москва : Наука, 2006. - 237 с. - ISBN 5-02-034169-X. – Текст : непосредственный.

45. Бахвалова, Е. В. Поведение инфузории спиростомы как индикатор наличия тяжелых металлов в водной среде / Е. В. Бахвалова, Е. И. Егорова, Н. А. Тушмалова. – Текст : непосредственный // Биология внутренних вод. – 2007. - №2. - С. 100-104.

46. Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред : тез. докл. международ. конф., Москва, 4-6 февраля 2013 / отв. ред. В. А. Терехова [и др.]. – Москва : Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 295 с. – ISBN 978-5-9963-1618-2. – Текст : непосредственный.

47. Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии : материалы

международ. симпозиума, Москва, 25-28 октября 2016 / отв. ред. В. А. Терехова [и др.]. – Москва : ГЕОС, 2016. – 433 с. – ISBN 978-5-89118-725-2. – Текст : непосредственный.

48. Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : материалы XII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, 2-3 дек. 2014. Кн. 1 / под ред. Т. Я. Ашихминой [и др.]. – Киров, 2014. – 348 с. – ISBN 978-5-4338-0191-2. – Текст : непосредственный.

49. Биоиндикаторы и биотестсистемы в оценке окружающей среды техногенных территорий : кол. моногр. / под ред. Т. Я. Ашихминой, Н. М. Алалыкиной. – Киров, 2008. – 336 с. – ISBN 978-5-91402-038-2. - Текст : непосредственный.

50. Биоиндикационные и биотестовые реакции организмов на действие метилфосфонатов и пирофосфата натрия / Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, С. Ю. Огородникова [и др.]. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – № 4. – С. 63-69.

51. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем / под ред. Р. Шуберта, Д. А. Криволуцкого. – Москва : Мир, 1988. – 348 с. - ISBN 5-03-000016-X. – Текст : непосредственный.

52. Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование : учеб. пособие / под ред. О. П. Мелеховой, Е. И. Егоровой. – Москва : Академия, 2007. – 287 с. – (Высшее профессиональное образование. Естественные науки). – ISBN 978-5-7695-3560-4. – Текст : непосредственный.

53. Биоразнообразие и устойчивость живых систем : материалы XIII международ. науч.-практ. эколог. конф., г. Белгород, 06-11 ноября 2014 г. – Белгород : Белгород, 2014. – 176 с. – ISBN : 978-5-9571-1002-6. – Текст : непосредственный.

54. Биотестирование стойких органических загрязнителей и полициклических ароматических углеводородов / Е. А. Белинская,

С. Е. Мазина, Г. В. Зыкова, В. П. Зволинский. – Текст : непосредственный // Успехи современной науки. – 2017. – Т. 5, № 1. – С. 35-43.

55. Биоэлектронная система контроля токсикологической безопасности биологически очищенных сточных вод / Е. А. Мельник, О. Н. Рублевская, Г. А. Панкова [и др.]. – Текст : непосредственный // Водоснабжение и санитарная техника. – 2013. – № 1. – С. 7-12.

56. Бобрецова, В. Р. Применение торфа и торфогеля для снижения уровня токсичности нефтезагрязненных почв / В. Р. Бобрецова, А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : материалы XV Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием (г. Киров, 4-6 декабря 2017). Кн. 1. – Киров : Изд-во ВятГУ, 2017. – С. 128-132.

57. Борзилов, В. А. Модель выпадения загрязняющих веществ промышленного происхождения на почву / В. А. Борзилов, Н. Б. Сенилов. – Текст : непосредственный // Загрязнение атмосферы и почвы : тр. Ин-та эксперимент. метеорологии. – Москва : Гидрометеиздат, 1977. – С. 26-36.

58. Брагинский, Л. П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* St. и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) / Л. П. Брагинский. – Текст : непосредственный // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т. 36, № 5. – С. 50-70.

59. Брагинский, Л. П. Некоторые закономерности и механизмы реагирования пресноводной экосистемы на воздействие пестицидов и поверхностно-активных веществ / Л. П. Брагинский. – Текст : непосредственный // Экспериментальная водная токсикология. Вып. 11. – Рига : Зинатне, 1986. – С. 7-22.

60. Брагинский, Л. П. Токсичность синтетических моющих средств для массовых форм пресноводных беспозвоночных / Л. П. Брагинский, И. Л. Буртная, Э. П. Щербань. – Текст : непосредственный // Экспериментальные

исследования влияния загрязнений на водные организмы. – Апатиты : Кол. фил. АН СССР, 1979. – С. 24-30.

61. Брагинский, Л. П. Экологические подходы к исследованию механизмов действия токсикантов в водной среде / Л. П. Брагинский. – Текст : непосредственный // Формирование и контроль качества поверхностных вод. Вып. 1. – Киев : Наукова думка, 1975. – С. 5-15.

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

63. Бурковский, И. В. Экология свободноживущих инфузорий / И. В. Бурковский. – Москва : МГУ, 1984. – 208 с. – Текст : непосредственный.

64. Вальков, В. Ф. Почвоведение : учеб. для студентов вузов / В. Ф. Вальков, К. Ш. Казеев, С. И. Колесников. – Москва ; Ростов-на-Дону : МарТ, 2006. – 495 с. – (Учебный курс). – ISBN 5-241-00405-X. – Текст : непосредственный.

65. Вараксина, Н. В. Изучение влияния соединений алюминия на тест-организмы в условиях модельного эксперимента / Н. В. Вараксина, Т. Я. Ашихмина, А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2012. – № 3 – С. 65-70.

66. Варшал, Г. М. Изучение взаимодействий в системе ртути-хгмусовые кислоты как главных процессов, определяющих поведение ртути в природных водах : отчет НИР / Г. М. Варшал ; ГЕОХИ РАН. - Москва, 1998. – № ГР 96-05-66299. – URL : <https://elibrary.ru/item.asp?id=755153> (дата обращения: 16.03.2020). – Текст : электронный.

67. Варшал, Г. М. Формы миграции фульвокислот и металлов в природных водах : автореф. дисс. ... д-ра хим. наук : 04.00.02 / Варшал Галина Моисеевна ; Ин-т геохимии и аналит. химии им. В. И. Вернадского. – Москва, 1994. – 65 с. – Текст : непосредственный.

68. Васильева, С. Г. Накопление V, Li и Co клетками цианобактерии рода *Spirulina* : автореф. дис.... канд. биол. наук : 03.03.04 / Васильева Светлана Геннадьевна ; МГУ имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2012. - 21 с. – Текст : непосредственный.

69. Виноходов, Д. О. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий : дис. ... докт. биол. наук : 03.00.23 / Виноходов Дмитрий Олегович ; С.-Петерб. гос. технол. ин-т. – Санкт-Петербург, 2007. – 353 с. – Текст : непосредственный.

70. Виноходов, Д. О. Определение микотоксинов методами биотестирования / Д. О. Виноходов, Н. И. Поляков. – Текст : непосредственный // Ветеринария в птицеводстве. – 2003. – № 5-6. – С. 47-48.

71. Влияние биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и костной ткани млекопитающих, на состояние регенератов хвостов тритонов при роллерном органотипическом культивировании *in vitro* / Е. Ю. Рыбакова, М. С. Краснов, А. П. Ильина [и др.]. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5-2. – С. 283-289.

72. Влияние глутатиона на токсичность растворов сульфата меди (II) / Е. И. Лялина, А. И. Фокина, А. С. Олькова, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредственный // XXVI Международная Чугаевская конференция по координационной химии : тез. докл. – Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2014. – С. 684.

73. 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).

74. Воробьева, О. В. Изменения плодовитости лабораторной культуры *D. magna* / О. В. Воробьева, О. Ф. Филенко, Е. Ф. Исакова. – Текст : непосредственный // Перспективы науки. – 2013. – № 9 (48). – С. 11-14.

75. Ганшин, В. М. Клеточные сенсоры на основе бактериальной биолюминесценции / В. М. Ганшин, В. С. Данилов. – Текст : непосредственный // Сенсорные системы. – 1997. – Т. 11, № 6. – С. 245-255.

76. Геохимия окружающей среды / Ю. Е. Саэт, Б. А. Ревич, Е. П. Янин [и др.]. – Москва : Недра, 1990. – 333 с. – ISBN 5-247-01127-9. – Текст : непосредственный.

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

78. Гордеева, Ф. В. Функциональные показатели *Paramecium caudatum* в водных экстрактах нефтезагрязненного торфа / Ф. В. Гордеева, Л. В. Михайлова, Г. А. Петухова. – Текст : непосредственный // Вестник Тюменского государственного университета. – 2009. – № 3. – С. 232-237.

79. Гремячих, В. А. Исследование биологических эффектов изоформ наночастиц диоксида титана на планктонных ракообразных *Ceriodaphnia affinis* Liljeborg / В. А. Гремячих, И. И. Томилина. – Текст : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2015. – № 5. – С. 52-56.

80. Григорьев, Ю. С. Аппаратно-методическое обеспечение оперативного биотестирования водных сред / Ю. С. Григорьев, Т. Л. Шашкова, Е. С. Стравинскене. – Текст : непосредственный // Современные проблемы гидрохимии и мониторинга качества поверхностных вод. – 2015. – Ч. 2. – С. 83-87.

81. Гришин, А. Н. Современные тенденции развития производства ПВХ / А. Н. Гришин, А. Д. Гуткович, В. В. Шебырев. – Текст : непосредственный // Пластикс. – 2004. – № 1. – С. 29-33.

82. Дабах, Е. В. Сравнительная оценка качества воды пойменных озер методами биотестирования / Е. В. Дабах, А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : материалы XIII Всерос. науч.-практ. конф. с

международ. участием, г. Киров, 1–2 декабря 2015. Кн. 2. – Киров : Веси, 2015. – С. 268-270.

83. Данилов, В. С. Бактериальные биосенсоры с биолюминесцентным выводом информации / В. С. Данилов, В. М. Ганшин. – Текст : непосредственный // Сенсорные системы. – 1998. – Т. 12, № 1. – С. 56-68.

84. Действие низкоинтенсивного лазерного и ультрафиолетового излучения на ранний онтогенез *Daphnia magna* / Е. А. Осипова, В. В. Крылов, В. И. Юсупов, Н. Б. Симонова. – Текст : непосредственный // Биология внутренних вод : сб. материалов XIV шк.-конф. молодых ученых. – Ярославль : Принтхаус, 2010. – С. 96-101.

85. Диагностика локального загрязнения урбанозёмов в районах автозаправочных станций / А. С. Олькова, Н. М. Зимонина, Е. И. Лялина, В. Р. Бобрецова. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2017. – № 1. – С. 56-62.

86. Дину, М. И. Влияние процессов комплексообразования гумусовых веществ на формы миграции металлов в природных водах Северной тайги и лесостепи Тюменской области / М. И. Дину, Т. И. Моисеенко, Т. А. Кремлева. — Текст : непосредственный // Вестник Тюменского государственного университета. – 2012. – № 12. – С. 71-79.

87. Домрачева, Л. Н. Фузарии: биологический контроль, сорбционные возможности / Л. Н. Домрачева, Л. В. Трефилова, А. И. Фокина. – Германия : Lap. Lambert, 2013. – 182 с. – Текст : непосредственный.

88. Жмур, Н. С. Управление процессом и контроль результата очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н. С. Жмур. – Москва : Луч, 1997. – 169 с. – ISBN 5-7005-0581-9. – Текст : непосредственный.

89. Зайцев, В. Г. Диэтилдитиокарбамат натрия, проникающий ингибитор супероксиддисмутазы, усиливает чувствительность инфузорий *Paramecium caudatum* к индуцированному окислительному стрессу /

В. Г. Зайцев, Б. В. Меклеева, О. В. Островский. – Текст : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2009. – №2. – С. 18-20.

90. Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем / под ред. Т. Я. Ашихминой [и др.]. – Киров, 2014. – 363 с. – ISBN 978-5-4338-0157-8. – Текст : непосредственный.

91. Зарубина, А. П. Первый среди равных: один из самых экспрессных и доступных методов биотестирования – бактериально люминесцентный тест / А. П. Зарубина, Е. В. Сорокина. – Текст : непосредственный // Евразийский союз ученых. – 2015. – № 8-3(17). – С. 157-159.

92. Зимонина, Н. М. Почвенные водоросли нефтезагрязненных почв / Н. М. Зимонина, А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Успехи современной биологии. – 2018. – Т. 138, № 1. – С. 83-94.

93. Ивашкина, Н. В. Блокирование калиевых каналов клеток корня тяжелыми металлами и стронцием / Н. В. Ивашкина, О. А. Соколов. – Текст : непосредственный // Агрехимия. – 2006. – № 12. – С. 47-53.

94. Изменение структурной организации альго-микологических почвенных комплексов при загрязнении пирофосфатом натрия / Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, А. С. Олькова [и др.]. – Текст : непосредственный // Проблемы региональной экологии. – 2010. – № 1. – С. 50-54.

95. Изучение воздействия объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» на состояние природных сред и объектов / Т. Я. Ашихмина, А. С. Тимонов, Г. Я. Кантор [и др.]. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. - 2015. - № 3. - С. 88-95.

96. Изучение воздействия фосфорсодержащих поллютанов на почвенные микроорганизмы / Т. Я. Ашихмина, Л. И. Домрачева, С. Ю. Огородникова [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский химический журнал. – 2010. – Т. 54, № 4. – С. 183-186.

97. 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 : непосредственный // Вода и экология: проблемы и решения. – 2017. – № 3. – С. 67-82.

98. Изучение состояния природного комплекса в зоне влияния Кирово-Чепецкого химического комбината / Т. Я. Ашихмина, Е. В. Дабах, Г. Я. Кантор [и др.]. – Текст : непосредственный // Теретическая и прикладная экология. - 2010. - № 3. - С. 18-26.

99. Ильин, В. Б. Тяжелые металлы в системе почва-растение / В. Б. Ильин. – Новосибирск : Наука: Сиб. отд-ние, 1991. – 148 с. – ISBN 5-02-029422-5. – Текст : непосредственный.

100. Исакова, Е. Ф. Морфологические отклонения у *Daphnia magna* Straus в поколениях при кратковременном воздействии бихромата калия / Е. Ф. Исакова, Е. Е. Коломенская. – Текст : непосредственный // Экологические системы и приборы. – 2002. – № 7. – С. 31-34.

101. Исакова, Е. Ф. Сезонные изменения резистентности лабораторной культуры *Daphnia magna* St. к бихромату калия / Е. Ф. Исакова, М. Ю. Юклеевских. – Текст : непосредственный // Биология внутренних вод. – 1998. – № 3. – С. 76-82.

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

103. Исследование локального загрязнения урбаноземов в районах автозаправочных станций г. Кирова / В. Р. Бобрецова, А. С. Олькова, Н. М. Зимонина, Е. И. Лялина. – Текст : непосредственный // Экология родного края: проблемы и пути решения : сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, 28–29 апреля 2016, г. Киров. Кн. 2. – Киров : Радуга-ПРЕСС. –2016. – С. 78-82.

104. 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 : непосредственный // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины : материалы VI Международ. науч.-практ. конф., г. Ростов-на-Дону, 1-3 октября 2015 г. – Ростов-на дону : Изд-во Южн. федер. ун-та., 2015. – С. 32-36.

105. 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 : непосредственный // Вода: химия и экология. – 2016. – № 2. – С. 64-70.

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

107. Калью, П. И. Сущностная характеристика понятия «здоровье» и некоторые вопросы перестройки здравоохранения: обзор. информ. / П. И. Калью. – Москва : ВНИИМИ, 1988. – 67 с. – Текст : непосредственный.

108. Каменщиков, Ф. А. Нефтяные сорбенты / Ф. А. Каменщиков, Е. И. Богомольный. – Ижевск, 2005. – 268 с. – (Регулярная и хаотическая динамика). – Текст : непосредственный.

109. Картикьян, С. Исследование влияния тяжелых металлов на белки мышечных тканей индийского карпа *Cirrhinus mrigala* в зависимости от pH и жесткости воды / С. Картикьян, П. Мани. – Текст : непосредственный // Биофизика. – 2014. – Т. 59, № 2. – С. 392-398.

110. Катаева, С. Е. Кинетика миграции стабилизаторов на основе свинца из поливинилхлоридных труб / С. Е. Катаева. – Текст : непосредственный // Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение. – 2013. – № 3 (63). – С. 24-28.

111. Качество поверхностных вод Российской Федерации : ежегодник / Федер. служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, Гидрохим. ин-т (г. Ростов-на-Дону). – Санкт-Петербург : Гидрометеоздат, 2002 – . – Текст : непосредственный.
112. Квашнин, С. В. Загрязнение питьевой воды Приишимья минеральными соединениями азота / С. В. Квашнин, Г. С. Кошечева. – Текст : непосредственный // Сибирский экологический журнал. – 2006. – Т. 13, № 5. – С. 685-693.
113. Количественная оценка вклада взрывных работ в загрязнение дренажных вод карьеров соединениями азота / А. В. Хохряков, А. Г. Студенок, А. М. Ольховский, Г. А. Студенок. – Текст : непосредственный // Известия высших учебных заведений. Горный журнал. – 2005. – № 6. – С. 29-31.
114. Колосова, Л. В. Анализ механизма действия некоторых пестицидов на дафний по биологическим показателям / Л. В. Колосова, Н. С. Строганов. – Текст : непосредственный // Экспериментальная водная токсикология. Вып. 5. – Рига : Зинатне, 1973. – С. 134-145.
115. Колупаев, Б. И. Оптический метод регистрации сердечного ритма у дафний / Б. И. Колупаев, А. А. Андреев, Ю. А. Самойленко. – Текст : непосредственный // Гидробиологический журнал. – 1977. – Т. 13, № 3. – С. 93-94.
116. Кондакова, Л. В. Влияние пирофосфата натрия на альгоценозы почв Кировской области / Л. В. Кондакова, Л. И. Домрачева, А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Ботанический журнал. – 2011. – Т. 96, № 4. – С. 494-502.
117. Конюхов, И. В. Определение трофической активности рачков *Daphnia magna* на флоуометре «MEGA-25» / И. В. Конюхов, О. В. Воробьева. – Текст : непосредственный // Вода: химия и экология. – 2013. – Т. 65, № 12. – С. 79-83.

118. Корбридж, Д. Фосфор: основы химии, биохимии, технологии / Д. Корбридж. – Москва : Мир, 1982. – 680 с. – Текст : непосредственный.
119. Коскова, Л. А. Токсичность синтетических поверхностно-активных и моющих средств для водных животных / Л. А. Коскова, В. И. Козловская. – Текст : непосредственный // Гидробиологический журнал. – 1979. – Т. 15, № 1. – С. 77-84.
120. Критерии токсичности и принципы методик по водной токсикологии / под ред. Н. С. Строганова, А. П. Гусева. – Москва : Наука, 1971. – 307 с. – Текст : непосредственный.
121. Кудеярова, А. Ю. Лигандная активность техногенных фосфатов и снижение эффективности барьеров в циклах химических элементов / А. Ю. Кудеярова. – Текст : непосредственный // Экспериментальная экология. – Москва : Наука, 1991. – С. 133-165.
122. Кулагина, К. В. Исследование зависимости частоты сердечных сокращений *Daphnia magna* от концентрации пестицидов / К. В. Кулагина. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 3. – С. 191-197.
123. Кулинский, В. И. Биологическая роль глутатиона / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко. – Текст : непосредственный // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 110, № 1 (4). – С. 20-33.
124. Кутявина, Т. И. Проблемы эксплуатации и экологического состояния Омутнинского водохранилища Кировской области / Т. И. Кутявина, А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2016. – № 8 (161). – С. 66-73.
125. Куценко, С. А. Основы токсикологии / С. А. Куценко. – Санкт-Петербург : Фолиант, 2004. – 715 с. – ISBN 5-93929-092-2. – Текст : непосредственный.
126. Лесников, Л. А. Дафнии, как тест-организм при установлении степени и характера влияния сточных вод на рыбохозяйственные водоемы :

автореферат дисс....канд. биол. наук / Лесников Лев Александрович. – Ленинград, 1967. – 21 с. – Текст : непосредственный.

127. Лесников, Л. А. О колебании порога токсичности для дафний ядовитых компонентов сточных вод и учете этого фактора при установлении рыбохозяйственных предельно допустимых норм / Л. А. Лесников. – Текст : непосредственный // Вопросы гидробиологии. – Москва : ВНИРО, 1965. – С. 252-254.

128. Лесников, Л. А. Пестициды и оценка их влияния на рыбохозяйственные водоемы / Л. А. Лесников. – Текст : непосредственный // Известия Государственного НИИ озерного и речного рыбного хозяйства. – 1977. – Вып. 121. – С. 3-7.

129. Линник, И. А. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах / П. Н. Линник, Б. И. Набиванец. – Ленинград : Гидрометеиздат, 1986. – 268 с. – Текст : непосредственный.

130. Ложкина, Р. А. Влияние лантана на биологические параметры ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* в хроническом эксперименте / Р. А. Ложкина, И. И. Томилина. – Текст : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2016. – № 1. – С. 42.

131. Лузгин, В. К. Морфофизиологические изменения дафний при кратковременном воздействии солей тяжелых металлов, их обратимость и влияние на продуктивность популяции : дис. ... кан. биолог. наук : 03.00.18 / Лузгин Виктор Константинович. – Ленинград, 1983. – 203 с. – Текст : непосредственный.

132. Манская, С. М. Геохимия органического вещества / С. М. Манская, Т. В. Дроздова. – Москва : Наука, 1964. – 315 с. – Текст : непосредственный.

133. Мануйлова, Е. Ф. Ветвистоусые рачки (Cladocera) фауны СССР / Е. Ф. Мануйлова. – Москва ; Ленинград : Наука, 1964. – 327 с. – (Определители по фауне СССР, издаваемые Зоологическим институтом Академии наук СССР). – Текст : непосредственный.

134. Марфенина, О. Е. Микробиологические аспекты охраны почв : учеб. пособие / О. Е. Марфенина. – Москва : Изд-во МГУ, 1991. – 118 с. – ISBN 5-211-01863-X. – Текст : непосредственный.

135. Маторин, Д. Н. Биотестирование токсичности вод по скорости поглощения дафниями микроводорослей, регистрируемых с помощью флуоресценции хлорофилла / Д. Н. Маторин, П. С. Венедиктов. – Текст : непосредственный // Вестник Московского университета. Сер.16. Биология. – 2009. – № 3. – С. 28-33.

136. Методики биологических исследований по водной токсикологии : сборник / под ред. Н. С. Строганова [и др.]. – Москва : Наука, 1971. – 298 с. – Текст : непосредственный.

137. Мисейко, Г. Н. *Daphnia magna* (Crustacea Cladocera) как тест-объект в оптимальных условиях лабораторного культивирования / Г. Н. Мисейко, Г. И. Тушкова, И. В. Цхай. – Текст : непосредственный // Известия Алтайского государственного университета. – 2001. – № 3. – С. 83-86.

138. Мичукова, М. В. Использование *Daphnia magna* Straus, 1826 в биоиндикации, улучшении биопродуктивности и качества воды водоемов : автореферат дис. ... кан. биол. наук : 03.00.16 / Мичукова Марина Валентиновна. – Казань, 2008. – 20 с. – Текст : непосредственный.

139. Моисеенко, Т. И. Механизмы круговорота природных и антропогенных металлов в поверхностных водах Субарктики / Т. И. Моисеенко, В. А. Даувальтер, И. В. Родюшкин. – Текст : непосредственный // Водные ресурсы. – 1998. – Т. 25, № 2. – С. 231-243.

140. Мониторинг качества вод: оценка токсичности / А. М. Никаноров, Т. А. Хоружая, Л. В. Бражникова, А. В. Жулидов. – Санкт-Петербург : Гидрометеиздат, 2000. – 159 с. – Текст : непосредственный.

141. Мусихина, Е. А. Методологический аспект технологии комплексной оценки экологической емкости территорий / Е. А. Мусихина. –

Москва : Акад. естествознания, 2009. – 137 с. – ISBN 978-5-91327-039-9. – Текст : непосредственный.

142. Научные основы установления ПДК токсических веществ в открытых водоемах : тез. докл. Всесоюз. симп., 23-25 окт. 1972 г. / под ред. Н. С. Строганова. – Москва, 1972. – 121 с. – Текст : непосредственный.

143. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / под ред. Х. Зигель, А. Зигель. – Москва : Мир, 1993. – 366 с. – (Ионы металлов в биологических системах. Вопросы токсичности). – ISBN 5-03-001977-4. – Текст : непосредственный.

144. 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 : непосредственный // Вода: химия и экология. – 2015. – № 5. – С. 69-75.

145. Некрасова, Ю. Н. Влияние фторида натрия на физико-химические свойства и интегральную токсичность почв в модельном эксперименте / Ю. Н. Некрасова, А. С. Олькова, Е. В. Дабах. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2012. – № 3. – С. 48-53.

146. Никаноров, А. М. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах / А. М. Никаноров, А. В. Жулидов. – Ленинград : Гидрометеиздат, 1991. – 311 с. – ISBN 5-286-00314-1. – Текст : непосредственный.

147. Никаноров, А. М. Внутриводоемные процессы и контроль качества природных вод : монография / А. М. Никаноров, Н. М. Трунов; под ред. А. И. Бедрицкого. – Санкт-Петербург : Гидрометеиздат, 1999. – 156 с. – (Качество вод). – ISBN 5-286-01272-8. – Текст : непосредственный.

148. Никаноров, А. М. Возможность количественной оценки экологической опасности загрязнения тяжелыми металлами воды водохранилищ Юга России / А. М. Никаноров, Т. А. Хоружая, Е. А. Флик. – Текст : непосредственный // Наука Юга России. – 2007. – Т. 3, № 3. – С. 62-70.

149. Никитина, Л. И. Влияние солей железа на жизнедеятельность *Paramecium caudatum* / Л. И. Никитина, М. В. Солодовникова. – Текст : непосредственный // Актуальные вопросы современной науки. – 2009. – № 6. – С. 53-59.

150. Никитишен, В. И. Минеральное питание кукурузы при взаимодействии азотного и фосфорного удобрений / В. И. Никитишен, В. И. Личко. – Текст : непосредственный // Агрохимия. – 2012. – № 11. – С. 9-15.

151. Николаева, О. В. Совершенствование лабораторного фитотестирования для экотоксикологической оценки почв / О. В. Николаева, В. А. Терехова. – Текст : непосредственный // Почвоведение. – 2017. – № 9. – С. 1141-1152.

152. Олькова, А. С. *Daphnia magna* Straus в биотестировании природных и техногенных сред / А. С. Олькова, А. И. Фокина. – Текст : непосредственный // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135, № 4. – С. 380-389.

153. Олькова, А. С. Актуальные направления развития методологии биотестирования водных сред / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Вода и экология: проблемы и решения. – 2018. – № 2 (74). – С. 40-50.

154. Олькова, А. С. Анализ информативности тест-функций *Daphnia magna* / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Экотоксикология-2014 : материалы и докл. Всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи. – Тула : Изд-во ТулГУ, 2014. – С. 23.

155. 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).

156. Олькова, А. С. Биотестирование в научно-исследовательской и природоохранной практике России / А. С. Олькова. – Текст :

непосредственный // Успехи современной биологии. – 2014. – Т. 134, № 6. – С. 614-622.

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

158. Олькова, А. С. Влияние выбросов пирофосфата натрия при уничтожении химического оружия на состояние почвы / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Поволжский экологический журнал. – 2014. – № 2. – С 246-252.

159. Олькова, А. С. Влияние сезонных ритмов на тест-функции *Daphnia magna* / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Биоразнообразие и устойчивость живых систем : материалы XIII Международ. науч.-практ. эколог. конф., г. Белгород, 6-11 октября 2014 г. – Белгород : Белгород, 2014. – С. 150-151.

160. Олькова, А. С. Выбор биотестов для экологических исследований вод, загрязненных минеральными формами азота / А. С. Олькова, Е. В. Маханова. – Текст : непосредственный // Вода и экология. – 2018. – № 4 (76). – С. 70-81.

161. Олькова, А. С. Изучение многообразия ответных реакций *Daphnia magna* в экспериментах по установлению хронической токсичности / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Индикация состояния окружающей среды: теория, практика, образование : сб. ст. III международ. науч.-практ. конф. молодых ученых, г. Москва, 17-19 апреля 2014 г. – Москва : Буки-Веди, 2014. – С. 33-35.

162. Олькова, А. С. Исследование влияния сезонной динамики двигательной активности низших ракообразных / А. С. Олькова, К. К. Ситникова. – Текст : непосредственный // Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем. – Киров, 2014. - С. 299-302.

163. Олькова, А. С. Исследование влияния условий культивирования на состояние модельных популяций *Daphnia magna* / А. С. Олькова, А. К. Тарабрина. – Текст : непосредственный // Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам : сб. материалов Всерос. науч. конф., 22-25 апреля 2015, г. Киров. – Киров : ВЕСИ, 2015. – С. 57-59.

164. Олькова, А. С. Исследование чувствительности аттестованных биотестов к загрязнению вод современными гербицидами: модельные эксперименты / А. С. Олькова, Г. И. Березин. – Текст : непосредственный // Вода и экология: проблемы и решения. – 2019. – № 2 (78). – С. 111-119.

165. Олькова, А. С. Контроль здоровья тест-культуры *Daphnia Magna* Straus / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Вода и экология: проблемы и решения. – 2019. – Т. 24, №3 (79). – С. 59-63.

166. Олькова, А. С. Многообразие тест-функций *Daphnia magna*: возможности и особенности их использования / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // 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.

167. Олькова, А. С. Опыт интерпретации результатов биотестирования поверхностных вод при химическом и радиоактивном загрязнении / А. С. Олькова, Е. В. Дабах. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – № 3. – С. 21-28.

168. Олькова, А. С. Особенности и проблемы биотестирования водных сред по аттестованным методикам / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Вода: химия и экология. – 2014. – № 10. – С. 87-94.

169. Олькова, А. С. Оценка состояния и устойчивости природно-техногенных систем : метод. рекомендации / А. С. Олькова. – Киров : Изд-во ВятГГУ, 2013 – 44 с. – Текст : непосредственный.

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

171. Олькова, А. С. Оценка токсических эффектов в ряду поколений *Daphnia magna* как подход биотестирования / А. С. Олькова, Г. Я. Кантор. – Текст : непосредственный // Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии : материалы междунар. сим. и шк., г. Москва, 25-28 октября 2016 г. – Москва : Изд-во МГУ, 2016. – С. 174-177.

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

173. Олькова, А. С. Оценка устойчивости почв и прогноз их состояния в районе уничтожения химического оружия / А. С. Олькова, Е. В. Дабах. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – № 1. – С. 73-76.

174. Олькова, А. С. Поиск информативных тест-функций *Daphnia magna* при биотестировании компонентов окружающей среды / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Биосистема: от теории к практике : сб. тез. – Пущино, 2013. – С. 92-94.

175. Олькова, А. С. Применение метода биотестирования по изменению двигательной активности *Daphnia magna* для поверхностных вод / А. С. Олькова, Е. А. Санникова, Т. И. Кутявина. – Текст : непосредственный // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : материалы XIV Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Киров, 5–8 декабря 2016 г. Кн. 1. – Киров : Радуга-ПРЕСС, 2016. – С. 207-210.

176. Олькова, А. С. Проблемы биотестирования почв по аттестованным методикам / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Доклады по экологическому почвоведению. – 2013. – № 18. – С. 165-175.

177. Олькова, А. С. Разработка и апробация метода оценки токсичности водных сред по двигательной активности *Daphnia magna* Straus / А. С. Олькова, Е. А. Санникова. – Текст : непосредственный // Экология родного края: проблемы и пути решения : сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, 28–29 апреля 2016, г. Киров. Кн. 1. – Киров : Радуга-ПРЕСС, 2016. – С. 386-390.

178. Олькова, А. С. Сравнение ответных реакций дафний и цериодафний к загрязняющим веществам / А. С. Олькова, И. Л. Галимова // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : материалы XII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 2-3 декабря 2014 г. Кн. 1. – Киров : Веси, 2014. – С. 230-235.

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

180. Олькова, А. С. Токсикологическая оценка поливинилхлоридных пластикатов / А. С. Олькова, Д. В. Будина, М. С. Краснов. – Текст : непосредственный // Экотоксикология-2014 : материалы Всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи. – Тула : Изд-во ТулГУ, 2014. – С. 24.

181. Олькова, А. С. Условия культивирования и многообразие тест-функций *Daphnia magna* Straus при биотестировании / А. С. Олькова. – Текст : непосредственный // Вода и экология: проблемы и решения. – 2017. – № 1. – С. 63-82.

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

183. Олькова, А. С. Экспресс оценка токсичности водных сред по двигательной активности *Daphnia magna* Straus / А. С. Олькова, Е. В. Бармина, А. И. Фокина. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : материалы XIII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 1-2 декабря 2015 г. Кн. 2. – Киров : Веси, 2015. – С. 266-268.

184. Олькова, А. С. Эффективность методов биотестирования при оценке состояния почв в зоне локального загрязнения техногенным минеральным фосфором / А. С. Олькова, Т. Я. Ашихмина. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – №4. – С. 107-117.

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

186. Определитель бактерий Берджи : в 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. – 9-е изд. – Москва : Мир, 1997. – 2 т. – Текст : непосредственный.

187. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР. [Планктон и бентос] / Г. Г. Винберг, О. И. Чибисова, Н. С. Гаевская [и др.]. – Ленинград : Гидрометеиздат, 1977. – 511 с. – Текст : непосредственный.

188. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Т. 2. Ракообразные / под ред. С. Я. Цаллолихина. – Санкт-Петербург : Наука, 1995. – 628 с. – Текст : непосредственный.

189. Орлов, Д. С. Гумусовые кислоты почв : автореф. дисс. ... д-ра биол. наук : 06.01.03 / Орлов Дмитрий Сергеевич. – Москва : МГУ, 1973. – 47 с. – Текст : непосредственный.

190. Орлов, Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации / Д. С. Орлов. – Москва : Изд-во МГУ, 1990. – 324 с. – Текст : непосредственный.

191. Орлов, Д. С. Химия почв / Д. С. Орлов. – Москва : Изд-во МГУ, 1985. – 376 с. – Текст : непосредственный.
192. Осина, Д. Е. Пространственное распределение подвижных форм тяжелых металлов в почвах города Калуги / Д. Е. Осина. – Текст : непосредственный // Вестник МГОУ. Серия : Естественные науки. – 2012. – № 4. – С. 128-134.
193. Особенности кинетики роста культуры *Paramecium caudatum* в модели окислительного стресса / О. В. Карпухина, К. З. Гумаргалиева, А. Н. Иноземцев [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Казанского технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 10. – С. 9-11.
194. 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 : непосредственный // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: материалы XII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 2–3 декабря 2014. Кн. 1. – Киров : Веси, 2014. – С. 210-215.
195. Оценка безопасности ПВХ пластикатов с помощью биотестирования и биосенсорного анализа / А. С. Олькова, Д. В. Будина, Т. Н. Кувичкина [и др.]. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы региональной экологии и биодиагностика живых систем : материалы XIII Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 1-2 декабря 2015 г. Кн. 2. – Киров : Веси, 2015. – С. 284-287.
196. Оценка протекторных свойство пептидных биорегуляторов методами биотестирования / А. С. Олькова, Д. В. Будина, М. С. Краснов [и др.]. – Текст : непосредственный // Естественные и математические науки в современном мире : сб. науч. тр. по итогам международ. науч.-практ. конф. Вып. 2. – Уфа, 2015. – С. 22-25.
197. 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 : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 3. – С. 46-51.

198. Оценка состояния поверхностных водных объектов техногенных территорий методами биотестирования и биоиндикации / А. С. Олькова, С. Г. Скугорева, Н. В. Вараксина [и др.]. – Текст : непосредственный // Вода: химия и экология. – 2012. – № 6. – С. 21-28.

199. 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: 26.03.2020).

200. Оценка физико-химического состояния тяжелых металлов в водах Дуная / П. Н. Линник, Н. Н. Осадчая, Ю. Б. Набиванец [и др.] – Текст : непосредственный // Водные ресурсы. – 1993. – Т. 20, № 4. – С. 449-454.

201. Папченкова, П. А. Влияние сублетальных концентраций гербицида Раудап на размеры, плодовитость и морфологические параметры *Daphnia magna* Straus (Cladocera) / П. А. Папченкова, Л. П. Гребешок. – Текст : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2008. – № 4. – С. 27-30.

202. Патент 2125874 РФ, МПК А61К 31/198(2006.01), А61К 9/08(2006.01), А61К 31/195(2006.01), А61Р 7/00(2006.01), А61Р 35/00(2006.01). Композиция аминокислот с микроэлементами, обладающая противоопухолевой и антигипоксической активностью : 94025068/14 : заявл. 04.7.1994 : опубл. 10.02.1999 / В. Г. Штырлин, Р. Х. Хафизьянова, Л. Н. Залялютдинова [и др.] ; заявитель Казан. гос. ун-т им. В. И. Ульянова-Ленина, Казан. гос. мед. ун-т им. С. В. Курашова. – 8 с. – Текст : непосредственный.

203. Патент 2335770 РФ, МПК G01N 33/52 (2006.01), C12Q 1/02 (2006.01). Способ определения токсичности воздуха по реакции инфузорий *Paramecium caudatum* : 2006137988/15, заявл. 27.10.2006 : опубл. 10.10.2008 /

В. Б. Кожаева, В. П. Самсонов ; заявитель ГУ Дальневосточ. науч. центр физиологии и патологии дыхания Сибир. отд. РАМН. – 6 с. – Текст : непосредственный.

204. Перельман, А. И. Геохимия / А. И. Перельман. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Высшая школа, 1989. – 527 с. – Текст : непосредственный.

205. Пинский, Д. Л. Тяжелые металлы в окружающей среде / Д. Л. Пинский, В. Н. Орешкина. – Текст : непосредственный // Экспериментальная экология. – Москва : Наука, 1991. – С. 201-212.

206. Пирсон, Р. Дж. Жесткие и мягкие кислоты и основания / Р. Дж. Пирсон. – Текст : непосредственный // Успехи химии. – 1971. – Т. 40, № 7. – С. 1259-1282.

207. Поливинилхлорид на транспорте: назначение, физико-химические и гигиенические свойства, горение : обзор лит. и материалов собств. исслед. / Л. В. Басалаева, Л. М. Шафран, И. С. Пресняк, М. Р. Копа. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2008. - № 2 (12). – С. 87-97.

208. Полякова, Е. В. Стронций в источниках водоснабжения Архангельской области и его влияние на организм человека / Е. В. Полякова. – Текст : непосредственный // Экология человека. – 2012. – № 2. – С. 9-14.

209. Приемы биоиндикации и биотестирования при текущем надзоре за загрязненностью водных объектов и выявлении превышения их ассимилирующей способности : метод. указания / сост. Л. А. Лесников, Т. К. Мосиенко. – Санкт-Петербург : ГосНИОРХ : ГНИПБИТ, 1992. – 27 с. – Текст : непосредственный.

210. 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 : непосредственный // Слабые и сверхмалые поля и излучения в биологии и медицине : науч. тр. VII Международ. конгр. – Санкт-Петербург : Оккервиль, 2015. – С. 76.

211. Проценко, Л. Д. Химия и фармакология синтетических противоопухолевых препаратов : справочник / Л. Д. Проценко, З. П. Булкина. – Киев : Наук. думка, 1985. – 267 с. – Текст : непосредственный.

212. Реагирование гидробионтов на оловоорганические соединения : сб. ст. / под ред. Н. С. Строганова. – Москва : Изд-во МГУ, 1979. – 182 с. – Текст : непосредственный.

213. Ривьев, И. К. Действие полихлорпинена на некоторые биологические показатели и структуру популяции / И. К. Ривьер, Б. А. Флеров. – Текст : непосредственный // Экспериментально водная токсикология. – 1973. – № 5. – С. 117-133.

214. Риклефс, Р. Основы общей экологии / Р. Риклефс ; под ред. Н. Н. Карташева. – Москва : Мир, 1979. – 424 с. – Текст : непосредственный.

215. Родина, А. Г. Опыты по питанию *Daphnia magna* / А. Г. Родина. – Текст : непосредственный // Зоологический журнал. – 1946. – Т. 25, № 3. – С. 237-343.

216. Розенгарт, В. И. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов : сравнит.-биохим. аспекты / В. И. Розенгарт ; под ред. А. П. Бресткина. – Ленинград : Наука. Ленингр. отд-ние, 1978. – 174 с. – Текст : непосредственный.

217. Росстандарт. Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : офиц. сайт. – URL : <http://fundmetrology.ru/> (дата обращения: 26.03.2020). – Текст : электронный.

218. Сборник методик измерений массовой концентрации ионов меди, свинца, кадмия, цинка, висмута, марганца, никеля и кобальта методом вольтамперометрии на вольтамперометрическом анализаторе «Экотест-ВА». – Москва : Эконикс-Эксперт, 2004. – 61 с. – Текст : непосредственный.

219. Свинолупова, Л. Д. Влияние пирофосфата натрия на антиоксидантную систему защиты растений ячменя / Л. С. Свинолупова, С. Ю. Огородникова. – Текст : непосредственный // Агрохимия. – 2012. – № 6. – С. 84-88.

220. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В. С. Данилов, В. П. Зарубина, Г. Е. Ерошников [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Московского университета. Серия Биология. – 2002. – № 3. – С. 20-24.

221. Синовец, С. Ю. Экспериментальное обоснование использования аллиум-теста в радиологическом мониторинге / С. Ю. Синовец, С. В. Пяткова, Г. В. Козьмин. – Текст : непосредственный // Известия высших учебных заведений. Радиоэнергетика. – 2009. – № 1. – С. 32-38.

222. Синтез и изучение свойств медьсодержащих соединений глутатиона / Е. И. Лялина, А. И. Фокина, Т. Я. Ашихмина [и др.]. – Текст : непосредственный // Закономерности функционирования природных и антропогенно трансформированных экосистем : материалы Всерос. науч. конф., г. Киров, 22-23 апреля 2014 г. – Киров, 2014. – С. 316-319.

223. Синякова, М. А. Пути сокращения загрязнения природных вод тяжелыми металлами гальванических производств / М. А. Синякова, И. В. Вольф. – Текст : непосредственный // Вода: химия и экология. – 2010. – № 3. – С. 6-9.

224. Скугорева, С. Г. Сезонные изменения ионного состава и содержания микроорганизмов в родниковой воде (на примере двух родников г. Кирова) / С. Г. Скугорева, И. А. Домрачев, Л. И. Домрачева. – Текст : непосредственный // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : материалы XV Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием, г. Киров, 4-6 декабря 2017 г. Кн. 1. – Киров : Изд-во ВятГУ, 2017. – С. 115-118.

225. Смирнов, Н. Н. Биология ветвистоусых ракообразных / Н. Н. Смирнов ; под ред. Л. П. Познанина. – Москва, 1975. – 115 с. – (Итоги науки и техники. Серия: Зоология беспозвоночных ; Т. 3). – Текст : непосредственный.

226. Соколов, О. А. Нитраты в окружающей среде / О. А. Соколов, В. М. Семенов, В. А. Агаев. – Пушино : НЦБИ, 1990. – 316 с. – Текст : непосредственный.

227. Сравнение элюатных и контактных методов биотестирования при оценке почв, загрязненных тяжелыми металл(иод)ами / М. А. Пукальчик, В. А. Терехова, В. М. Вавилова, М. М. Карпухин. – Текст : непосредственный // Почвоведение. – 2019. - № 4. – С. 507-514.

228. Строганов, Н. С. Действие сточных промышленных вод на водные организмы: (Новые пути решения проблем) / Н. С. Строганов, А. Т. Пожитков. – Москва : МГУ, 1941. – 88 с. – Текст : непосредственный.

229. Строганов, Н. С. Современные проблемы водной токсикологии / Н. С. Строганов. – Текст : непосредственный // Вестник МГУ. Серия Биология. – 1960. – № 2. – С. 3-17.

230. Строганов, Н. С. Сравнительная чувствительность гидробионтов к токсикантам / Н. С. Строганов. – Текст : непосредственный // Водная токсикология : сб. ст. – Москва, 1976. – С. 151-176.

231. Строганов, Н. С. Теоретические аспекты действия пестицидов на водные организмы / Н. С. Строганов. – Текст : непосредственный // Экспериментальная водная токсикология. Вып. 5. – Рига : Зинанте, 1979. – С. 11-38.

232. Терехова, В. А. «Триадный» подход к экологической оценке городских почв / В. А. Терехова, М. А. Пукальчик, А. С. Яковлев. – Текст : непосредственный // Почвоведение. – 2014. – № 9. – С. 1145-1152.

233. Терехова, В. А. Некоторые научно-организационные проблемы «Global Indicator Networks» / В. А. Терехова. – Текст : непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – № 3. – С. 16-19.

234. Терехова, В. А. Технологии биотестирования в оценке экотоксичности отходов / В. А. Терехова. – Текст : непосредственный // Экология производства. – 2009. – № 1. – С. 4851.

235. Технологии биотестирования в экологической оценке агроценозов и гуминовых веществ : материалы междунар. молодеж. шк., г. Москва, 21-23 ноября 2014 г. / под ред. В. А. Тереховой, К. А. Кыдралиевой. – Москва : Доброе слово, 2014. – 217 с. – Текст : непосредственный.

236. Ткаченко. А. Г. Адаптивные функции полиаминов *Escherichia coli* при сублетальных воздействиях антибиотиков / А. Г. Ткаченко, М. С. Шумков, А. В. Ахова. – Текст : непосредственный // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 1. – С. 32-41.

237. Томилина, И. И. Оценка загрязнения донных отложений закисленных озер Карелии / И. И. Томилина, Л. П. Гребенюк. – Текст : непосредственный // Водные ресурсы. – 2008. – Т. 35, № 6. – С. 754-761.

238. Трунова, О. Н. Химические загрязнения и их воздействие на биологические факторы самоочищения. Биодegradация химических загрязнителей в водной среде / О. Н. Трунова. – Текст : непосредственный // Биологические факторы самоочищения водоемов и сточных вод. – Ленинград : Наука, 1979. – С. 81-93.

239. Туманов, А. А. Водные беспозвоночные как аналитические индикаторы / А. А. Туманов, И. Е. Постнов. – Текст : непосредственный // Гидробиологический журнал. – 1983. – Т. XIX, № 5. – С. 3-16.

240. Тюлин, В. В. Особенности почв Кировской области и их использование при интенсивном земледелии : учеб. пособие / В. В. Тюлин, А. М. Гущина. – Киров : КСХИ, 1991. – 92 с. – Текст : непосредственный.

241. Тюлин, В. В. Почвы Кировской области / В. В. Тюлин. - Киров : Волго-Вят. кн. изд-во. Киров. отд-ние, 1976. - 288 с. – Текст : непосредственный.

242. Усанов, А. Д. Исследование влияния переменного магнитного и электрического полей на живые организмы и водную среду с использованием дафнии в качестве биоиндикатора : дис. ... канд. физ.-мат. наук : 03.00.02 / Усанов Андрей Дмитриевич ; Сарат. гос. ун-т им. Н.Г. Чернышевского. – Саратов, 2004. – 103 с. – Текст : непосредственный.

243. Устойчивое развитие: новые вызовы : учеб. для студентов вузов / под ред. В. И. Данилова-Данильяна, Н. А. Пискуловой. – Москва : Аспект-Пресс, 2015. – 334 с. – ISBN 978-5-7567-0788-5. – Текст : непосредственный.

244. Уфимцева, М. Д. Фитоиндикация экологического состояния урбогеосистем Санкт-Петербурга / М. Д. Уфимцев, Н. В. Терехина. – Санкт-Петербург : Наука, 2005. – 338 с. – Текст : непосредственный.

245. Федеральный портал ProTown.ru. – URL: www.protown.ru (дата обращения: 09.04.2020). – Текст : электронный.

246. Филенко, О. Ф. Биологические методы в контроле качества окружающей среды / О. Ф. Филенко. – Текст : непосредственный // Экологические системы и приборы. – 2007. – № 6. – С. 18-20.

247. Филенко, О. Ф. Взаимосвязь биотестирования с нормированием и токсикологическим контролем загрязнения водоемов / О. Ф. Филенко. – Текст : непосредственный // Водные ресурсы. – 1985. – № 3. – С. 130-134.

248. Филенко, О. Ф. Водная токсикология в России: от прошлого к настоящему / О. Ф. Филенко, Г. М. Чуйко. – Текст : непосредственный // Труды ИБВВ РАН. – 2017. – № 77 (80). – С. 124-142.

249. Филенко, О. Ф. Место биологических методов в контроле качества окружающей среды при загрязнении / О. Ф. Филенко. – Текст : непосредственный // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем. – Санкт-Петербург : ЛЕМА, 2007. – С. 8-12.

250. Филенко, О. Ф. Нормирование загрязнения и биотестирования вод: что дальше? / О. Ф. Филенко. – Текст : непосредственный // Антропогенное влияние на водные организмы и сообщества : материалы III Всерос. конф. Ч. 1. – Борок, 2008. – С. 148-156.

251. Филенко, О. Ф. Основы водной токсикологии / О. Ф. Филенко, И. В. Михеева. – Москва : Колос, 2007. – 144 с. – ISBN 978-5-10-003971-6. – Текст : непосредственный.

252. Филенко, О. Ф. Особенности действия бихромата калия на генерации и модельные популяции низших ракообразных / О. Ф. Филенко, Е.

Ф. Исакова, А. В. Черномордина. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы водной токсикологии : сб. ст. – Борок : Ин-т биологии внутр. вод РАН, 2004. – С. 176-194.

253. Филенко, О. Ф. Экологическое предназначение биотестирования: информативность и универсальность / О. Ф. Филенко, В. А. Терехова. – Текст : непосредственный // Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии : материалы междунар. симп. и шк., г. Москва, 25–28 октября 2016 г. – Москва : МГУ, 2016. – С. 232-239.

254. Флеров, Б. А. Биотестирование: терминология, задачи, перспективы / Б. А. Флеров. – Текст : непосредственный // Теоретические вопросы биотестирования. – Волгоград : Ин-т биологии внутр. вод АН СССР, 1983. – С. 13-20.

255. Флеров, Б. А. Об использовании в водной токсикологии исследований поведения животных / Б. А. Флеров. – Текст : непосредственный // Гидробиологический журнал. – 1974. – Т. 10, № 5. – С. 114-120.

256. Флеров, Б. А. Физиологические механизмы действия токсических веществ и приспособления к ним водных животных / Б. А. Флеров. – Текст : непосредственный // Гидробиологический журнал. – 1977. – Т. 13, № 4. – С. 80-85.

257. Флеров, Б. А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных / Б. А. Флеров ; отв. ред. А. В. Монаков. – Ленинград : Наука : Ленингр. отд-ние, 1989. – 138 с. – Текст : непосредственный.

258. Химические основы экотоксикологии : учеб. пособие / А. И. Фокина, С. Ю. Огородникова, А. С. Олькова [и др.]. – Киров : Лобань, 2015. – 266 с. – ISBN 978-5-4338-0236-0. – Текст : непосредственный.

259. Хроническая токсичность имадазолинонового гербицида имазетапир для пресноводных организмов разных систематических групп / Е.

А. Федорова, О. А. Зинчук, Л. М. Бессчетнова, Г. В. Сороколетова. – Текст : непосредственный // Научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – № 123 (09). – С. 90-101.

260. Чалова, И. В. Влияние жесткости воды на хроническую токсичность смеси загрязняющих веществ для *Ceriodaphnia Affinis* Lill. (Crustacea, Cladocera) / И. В. Чалова, Б. А. Флеров. – Текст : непосредственный // Труды Института биологии внутренних вод РАН. – 2017. – № 77 (80). – С. 143-148.

261. Частота сердечных сокращений у *Daphnia magna* как функциональный тест оценки действия химических соединений / Н. П. Подосиновичева, Н. Ф. Ежов, Н. А. Сайкина [и др.]. – Текст : непосредственный // Экспертная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 73, № 3. – С. 54-56.

262. Черкашин, С. А. Биотестирование: терминология, задачи, основные требования и применение в рыбохозяйственной токсикологии / С. А. Черкашин. – Текст : непосредственный // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского центра. – 2001. – Т. 128, № 3. – С. 1020-1035.

263. Шадрин, И. А. Токсикологический анализ некоторых кормов по реакции выживаемости инфузорий *Paramecium caudatum* / И. А. Шадрин. – Текст : непосредственный // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2008. – № 2. – С. 128-134.

264. Шашкова, Т. Л. Действие тяжелых металлов на трофическую активность дафний в зависимости от условий питания и возраста рачков / Т. Л. Шашкова, Ю. С. Григорьев. – Текст : непосредственный // Сибирский экологический журнал. – 2013. – Т. 20, № 6. – С. 885-890.

265. Шашкова, Т. Л. Новые методики и оборудование для оценки токсичности водных сред / Т. Л. Шашкова, Е. С. Стравинскене, Ю. С. Григорьев. – Текст : непосредственный // XI съезд Гидробиолог. о-ва при Рос. акад. наук : тез. докл., г. Красноярск, 22-26 сентября 2014. – Красноярск : Сибир. федер. ун-т, 2014. – С. 44.

266. Шефтель, В. О. Вредные вещества в пластмассах : справочник / В. О. Шефтель. – Москва : Химия, 1991. – 543 с. – Текст : непосредственный.

267. Шилова, Н. А. Влияние биогенных металлов на жизнедеятельность *Daphnia magna* / Н. А. Шилова, С. М. Рогачева, Т. И. Губина. – Текст : непосредственный // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1 (8). – С. 1951-1953.

268. Шубов, Л. Я. Проблема загрязнения окружающей среды от деятельности АЗС / Л. Я. Шубов. – Текст : непосредственный // Экология и промышленность России. – 2005. – № 12. – С. 34-39.

269. Щербань, Э. П. Сравнительная оценка токсического действия пестицидов и тяжелых металлов на популяции ветвистоусых рачков / Э. П. Щербань. – Текст : непосредственный // Формирование и контроль качества поверхностных вод. Вып. 1. – Киев : Наукова думка, 1975. – С. 81-89.

270. Щербань, Э. П. Хроническая токсичность гербицида норвел для *Ceriodaphnia affinis* / Э. П. Щербань, В. И. Лоханская. – Текст : непосредственный // Гидробиологический журнал. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 109-117.

271. Якименко, О. С. Гуминовые препараты и оценка их биологической активности для целей сертификации / О. С. Якименко, В. А. Терехова. – Текст : непосредственный // Почвоведение. – 2011. – № 11. – С. 1334-1343.

272. Ямскова, В. П. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов / В. П. Ямскова, М. С. Краснов, И. А. Ямсков. – Saarbrücken : Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 с.

273. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents / C. Barata, P. Alañon, S. Gutierrez-Alonso [et al.]. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.028. – Text : electronic // Science of The Total

Environment. – 2008. – Vol. 405, I. 1-3. – P. 78-86. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.028> (accessed: 15.03.2020).

274. A novel protocol for assessing aquatic pollution, based on the feeding inhibition of *Daphnia magna* / A. Kovacs, N.-A. Abdel-Hameid, A. Acs [et al.]. – DOI: 10.1051/kmae/2012001. – Text : electronic // Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems. – 2012. – N 404. – P. 7. – URL: <https://doi.org/10.1051/kmae/2012001> (accessed: 15.03.2020).

275. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. / G. Libralato, E. Prato, L. Migliore [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ecolind.2016.04.017. – Text : electronic // Ecological Indicators. – 2016. – Vol. 69. – P. 35-49. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017> (accessed: 06.04.2020).

276. A short-term swimming speed alteration test with nauplii of *Artemia franciscana* / S. Morgana, N. Estévez-Calvar, Ch. Gambardella [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.026. – Text : electronic // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2018. – Vol. 147. – P. 558-564. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.026> (accessed: 08.04.2020).

277. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol / G. Repetto, A. Jos, M. J. Hazen [et al.] – DOI 10.1016/S0887-2333(01)00055-8. – Text : electronic // Toxicology in Vitro. – 2001. – Vol. 15, I. 4-5. – P. 503-509. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00055-8) (accessed: 09.04.2020).

278. A versatile and low-cost open source pipetting robot for automation of toxicological and ecotoxicological bioassays / S. Steffens, L. Nuesser, Th.-B. Seiler [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0179636. – Text : electronic // Plos one. – 2017. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179636> (accessed: 09.04.2020).

279. Ackermann, F. A procedure for correcting the grain size effect in heavy metal analyses of estuarine and coastal sediments / F. Ackermann. – DOI: 10.1080/09593338009384008. – Text : electronic // Environmental Technology Letters. – 1980. – Vol. 1, I. 11. – P. 518-527. – URL:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593338009384008> (accessed: 15.03.2020).

280. Acute toxicity tests using rotifers: IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* / T. W. Snell, B. D. Moffat, C. Janssen, G. Persoone. – DOI 10.1016/0147-6513(91)90070-6. – Text : electronic // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 1991. – Vol. 21, I. 3. – P. 308-317. – URL: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(91\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0147-6513(91)90070-6) (accessed: 09.04.2020).

281. Acute Toxicity to Herbicides to *Oreochromis niloticus* / R. G. Botelho, J. B. Santos, T. A. Oliveira [et al.]. – Text : electronic // *Planta Daninha*. – 2009. – Vol. 27, I. 3. – P. 621-626. – URL: <http://www.scielo.br/pdf/pd/v27n3/24.pdf> (accessed: 15.03.2020).

282. Adsorption and cosorption of cadmium and glyphosate on two soils with different characteristics / D.-M. Zhou, Y.-J. Wang, L. Cang [et al.] – DOI 10.1016/j.chemosphere.2004.08.043. – Text : electronic // *Chemosphere*. – 2004. – Vol. 57, I. 10. – P. 1237-1244. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.043> (accessed: 09.04.2020).

283. Adsorption of Aclonifen, Alachlor, Cd and Cu onto Natural River Suspended Matter in the Context of Multi-Pollutions: Influence of Contaminant Co-Presence and Order of Input into the Aqueous Solution / D. El Azzi, F. Laurent, V. Roussiez [et al.] – DOI: 10.3390/w10091222. – Text : electronic // *Water*. – 2018. – Vol. 10, I. 9. – URL: <https://doi.org/10.3390/w10091222> (accessed: 15.03.2020).

284. Altenburger, R. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships / R. Altenburger, M. Nendza, G. Schüürmann. – DOI: 10.1897/01-386. – Text : electronic // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2003. – Vol. 22, I. 8. – P. 1900–1915. – URL: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/01-386> (accessed: 15.03.2020).

285. An online real-time biomonitor for contaminant surveillance in water supplies / Y. B. Mikol, W. R. Richardson, W. H. Van der Schalie [et al.]. – DOI:

10.1002/j.1551-8833.2007.tb07873.x. – Text : electronic // Journal American Water Works Association. – 2007. – Vol. 99, I. 2. – P.107-115. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2007.tb07873.x> (accessed: 15.03.2020).

286. Animal Models in Toxicology / ed. by S. C. Gad. – 3rd ed. – Boca Raton, FL : CRC Press, 2016. – 1152 p. – ISBN 9781466554283. – Text : unmediated.

287. Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in european union legislation / T. Brock, G. Arts, L. Maltby, P. J. Van den Brink. – DOI: 10.1002/ieam.5630020402. – Text : electronic // Integrated Environmental Assessment and Management. – 2006. – Vol. 2, I. 4. – P. e20-e46. – URL: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ieam.5630020402> (accessed: 15.03.2020).

288. Assessment of acrylamide toxicity using a battery of standardised bioassays / M. Zovko, Ž. Vidaković-Cifrek, Ž. Cvetković. [et al.] – DOI 10.1515/aiht-2015-66-2715. – Text : electronic // Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. – 2015. – Vol. 66, I. 4. – P. 315-321. – URL: <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2715> (accessed: 09.04.2020).

289. Bae, M-J. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review / M-J. Bae, Y.-S. Park. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.075. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2014. – Vol. 466-467. – P. 635-49. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.075> (accessed: 15.03.2020).

290. Beck, J. L. The effects of zooplankton swimming behavior on prey-capture kinematics of red drum larvae, *Sciaenops ocellatus* / J. L. Beck, R. G. Turingan. – DOI: 10.1007/s00227-006-0598-4. – Text : electronic // Marine biology. – 2007. – Vol. 151, I. 4. – P. 1463-1470. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00227-006-0598-4> (accessed: 15.03.2020).

291. Benchmarking Water Quality from Wastewater to Drinking Waters Using Reduced Transcriptome of Human Cells / Pu Xia, Xiaowei Zhang, Hanxin

Zhang [et al.]. – DOI 10.1021/acs.est.7b02648. – Text : electronic // Environmental science & technology. – 2017. – Vol. 51, I. 16. – P. 9318-9326. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.7b02648> (accessed: 08.04.2020).

292. Benzoylecgonine exposure induced oxidative stress and altered swimming behavior and reproduction in *Daphnia magna* / M. Parolini, B. De Felice, C. Ferrario [et al.]. – DOI 10.1016/j.envpol.2017.09.038. – Text : electronic // Environmental pollution. – 2018. – Vol. 232. – P. 236-244. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.038> (accessed: 08.04.2020).

293. Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications / X. Y. Ma, X. C. Wang, H. H. Ngo [et al.]. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.028. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2014. – Vol. 468–469. – P. 1-11. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.028> (accessed: 07.04.2020).

294. Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions / V. A. Terekhova, K. Wadhia, E. V. Fedoseeva, P. V. Uchanov. – DOI 10.1051/kmae/2018015. – Text : electronic // Knowledge and management of aquatic ecosystems. – 2018. – I. 419. – P. 14. – URL: <https://doi.org/10.1051/kmae/2018015> (accessed: 09.04.2020).

295. Biochemical Physics: Frontal Research / ed. by S. D. Varfolomeev [et al.]. – Waltham : Nova Biomedical, 2006. – 133 p. – ISBN 978-1600214257. – Text : unmediated.

296. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: chemical and biological assessment / J. G. Mueller, D. P. Middaugh, S. E. Lantz, P. J. Chapman. – Text : unmediated // Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – Vol. 57, I. 5. – P. 1277-1285.

297. Bioluminescent nanopaper for rapid screening of toxic substances / J. Liu, E. Morales-Narváez, J. Orozco [et al.]. – DOI: 10.1007/s12274-017-1610-7. – Text : electronic // Nano Research. – 2018. – Vol. 11, I. 1. – P. 114-125. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12274-017-1610-7> (accessed: 07.04.2020).

298. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia* / R. C. Santore, D. M. Di Toro, P. R. Paquin [et al.] – DOI 10.1002/etc.5620201035. – Text : electronic // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2001. – Vol. 20, I. 10. – P. 2397-2402. – URL: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620201035> (accessed: 09.04.2020).

299. Bitton, G. Ceriofast™: An acute toxicity test based on *Ceriodaphnia dubia* feeding behavior / G. Bitton, K. Rhodes, B. Koopman. – DOI: 10.1002/etc.5620150208. – Text: electronic // Environmental Toxicology and Chemistry. – 1996. – Vol. 15, I. 2. – P. 123-125 – URL: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620150208> (accessed: 15.03.2020).

300. Blasco, C. Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment / C. Blasco, Y. Picó. – DOI: 10.1016/j.trac.2009.04.010. – Text : electronic // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2009. – Vol. 28, I. 6. – P.745–757. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.010> (accessed: 15.03.2020).

301. Brancelj, A. Four different head shapes in *Daphnia hyalina* (Leydig) induced by the presence of larvae of *Chaoborus flavicans* (Meigen) /A. Brancelj, T. Čelhar, M. Šiško. – DOI: 10.1007/BF00008911. – Text : electronic // Hydrobiologia. – 1996. – Vol. 339, I. 1-3. – P. 3745. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00008911> (accessed: 15.03.2020).

302. Brown, I. A. The Natural History of Cladocerans in Relation to Temperature. II. Temperature Coefficients for Development / I. A. Brown. – Text : unmediated // The American Naturalist. – 1929. – Vol. 63, N 687. – P. 346–352.

303. Bulich, A. A. A practical and reliable method for monitoring of aquatic samples / A. A. Bulich. – Text : unmediated // Process Biochemistry. – 1982. – Vol. 17, N 2. – P. 45-47.

304. Bulich, A. A. The luminescent bacteria toxicity test: Its potential as an in vitro alternative / A. A. Bulich, Ker-Kong Tung, G. Scheibner. – DOI: 10.1002/bio.1170050202. – Text : electronic // Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence. – 1990. – Vol. 5, I. 2. – P. 71-77. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bio.1170050202> (accessed: 15.03.2020).

305. Bulich, A. A. The use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity / A. A. Bulich. – Text : unmediated // ISA Transactions. – 1981. – Vol. 20, N 1. – P. 29-33.

306. Calabrese, E. J. Hormesis: The dose-response revolution / E. J. Calabrese, L. A. Baldwin. – DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223. – Text : electronic // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2003. – Vol. 43. – P. 175-197. – URL: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223> (accessed: 15.03.2020).

307. Capability of the natural microbial community in a river water ecosystem to degrade the drug naproxen / P. Grenni, L. Patrolecco, N. Ademollo [et al.]. – DOI: 10.1007/s11356-014-3276-y // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – Vol. 21, I. 23. – P. 13470-13479. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3276-y> (accessed: 15.03.2020).

308. Chromium behavior in aquatic environments: a review / J. Gorny, G. Billon, C. Noiriél [et al.]. – DOI: 10.1139/er-2016-0012. – Text : electronic // Environmental Reviews. – 2016. – Vol. 24, N 4. – P. 503-516. – URL: <https://www.jstor.org/stable/envirevi.24.4.503> (accessed: 15.03.2020).

309. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics / E. van der Grinten, M. G. Pikkemaat, E. J. van den Brandhof [et al.] – DOI 10.1016/j.chemosphere.2010.04.011. – Text : electronic // Chemosphere. – 2010. – Vol. 80, I. 1. – P. 1-6. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.011> (accessed: 09.04.2020).

310. Comprehensive chemical-toxicological research of copper (II) sulfate solutions containing reduced glutathione / E. I. Lyalina, A. I. Fokina, T. Ya. Ashikhmina [et al.]. – DOI: 10.25750/1995-4301-2018-2-101/2-107/1. – Text : electronic // Theoretical and Applied Ecology. – 2018. – I. 2. – P. 101–107. – URL: <http://envjournal.ru/ari/v2018/v2/18213.pdf> (accessed: 07.04.2020).

311. Conceptual model for improving the link between exposure and effects in the aquatic risk assessment of pesticides / J. Boesten, H. Köpp, P. I. Adriaans [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.10.002. – Text : electronic // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2007. – Vol. 66, I. 3. – P. 291-308. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.10.002> (accessed: 15.03.2020).

312. Contribution of glutathione and metallothioneins to protection against copper toxicity and redox cycling: quantitative analysis using MT^{+/+} and MT^{-/-} mouse lung fibroblast cells / J. Jiang, C. M. St. Croix, N. Sussman [et al.]. – DOI: 10.1021/tx020022u. – Text : electronic // Chemical Research in Toxicology. – 2002. – Vol. 15, I. 8. – P. 1080-1087. – URL: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.98106583> (accessed: 15.03.2020).

313. Copper toxicity to blue mussel embryos (*Mytilus galloprovincialis*) The effect of natural dissolved organic matter on copper toxicity in estuarine waters / R. Zitoun, S. J. Clearwater, Ch. Hassler [et al.] – DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.10.263. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2019. – Vol. 653. – P. 300-314. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.263> (accessed: 09.04.2020).

314. Critical analysis of radiochemical methodologies for the assessment of sediment pollution and dynamics in the lagoon of Venice (Italy) / S. Degetto, C. Cantaluppi, A. Cianchi [et al.]. – DOI: 10.1016/j.envint.2005.05.012. – Text : electronic // Environment International. – 2005. – Vol. 31, I. 7. – P. 1023-1030. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.05.012> (accessed: 15.03.2020).

315. Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater. Standard operating procedure : MicroBioTests / DAPHTOXKIT F. – URL:

https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/daphnia-toxicity-test_daphtoxkit-f_standard-operating-procedure.pdf (accessed: 08.04.2020).

316. Daam, M. A. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides / M. A. Daam, P. J. Van den Brink. – DOI: 10.1007/s10646-009-0402-6. – Text : electronic // *Ecotoxicology*. – 2010. – Vol. 19, I. 1. – P. 24-37. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-009-0402-6> (accessed: 15.03.2020).

317. Di Delupis, G. D. Phototaxis in aquatic invertebrates: Possible use in ecotoxicity test / G. D. Di Delupis, V. Rotondo. – DOI: 10.1016/0147-6513(88)90049-8. – Text : electronic // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 1988. – Vol. 16, I. 3. – P. 189-193. – URL: [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(88\)90049-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(88)90049-8) (accessed: 15.03.2020).

318. DIN 38415-6:2003-08. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T). Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen; Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T 6) : ausgabedatum 08.2003 : wurde ersetzt durch DIN EN ISO 15088:2009-06. – URL: <https://www.beuth.de/de/norm/din-38415-6/64198964> (zugegriffen: 07.04.2020). - Text: elektronisch.

319. DNA repair and mutagenesis / E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede [et al.]. – 2nd ed. – Washington, DC : ASM Press, 2005. – P. 92-107. – ISBN 978-1555813192. – Text: unmediated.

320. Effect of copper on the adsorption of p-nitrophenol onto soils / Z. Pei, X. Shan, B. Wen [et al.]. – DOI 10.1016/j.envpol.2005.05.025. – Text : electronic // *Environmental Pollution*. – 2006. – Vol. 139, I. 3. – P. 541-549. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.05.025> (accessed: 08.04.2020).

321. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and prepubertal development of their offspring / V. Salazar, C. Castillo, C. Ariznavarreta [et al.] – DOI 10.1016/j.tox.2004.06.045. – Text :

electronic // Toxicology. – 2004. – Vol. 205, I. 2. – P. 131-137. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.045> (accessed: 09.04.2020).

322. Effect of waterborne uranium on survival growth reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* / F. A. Zeman, R. Gilbin, F. Alonzo [et al.]. – DOI 10.1016/j.aquatox.2007.11.018. – Text : electronic // Aquatic Toxicology. – 2008. – Vol. 86, I. 3. – P. 370-378. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.018> (accessed: 09.04.2020).

323. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments – An in-depth overview / W. Brack, S. Ait-Aissac, R. M. Burgess [et al.]. – DOI: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.102. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2016. – Vol. 544. – P. 1073-1118. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.102> (accessed: 15.03.2020).

324. Elendt, B.-P. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna* / B.-P. Elendt, W.-R. Bias. – DOI: 10.1016/0043-1354(90)90180-E. – Text : electronic // Water Research. – 1990. – Vol. 24, I. 9. – P. 1157-1167. – URL: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90180-E](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90180-E) (accessed: 15.03.2020).

325. Embryotoxic and proteotoxic effects of water and sediment from the Neckar River (Southern Germany) to zebrafish (*Danio rerio*) embryos / K. Vincze, K. Graf, V. Scheil [et al.] – DOI 10.1186/2190-4715-26-3. – Text : electronic // Environmental Sciences Europe. – 2014. – Vol. 26. – P. 1-13. – URL: <https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/2190-4715-26-3> (accessed: 09.04.2020).

326. Erofeeva, E. A. Hormesis and paradoxical effects of wheat seedling (*Triticum aestivum* L.) parameters upon exposure to different pollutants in a wide range of doses / E. A. Erofeeva. – DOI: 10.2203/dose-response.13-017.Erofeeva. – Text : electronic // Dose-Response. – 2014. – Vol. 12, I. 1. – P. 121-135. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.2203/dose-response.13-017.Erofeeva> (accessed: 15.03.2020).

327. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters / Z. Tousova, P. Oswald, J. Slobodnik [et al.]. – DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.06.032. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2017. – Vol. 601-602. – P. 1849-1868. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.032> (accessed: 09.04.2020).

328. Farré, M. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis / M. Farré, D. Barceló. – DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00504-1. – Text : electronic // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2003. – Vol. 22, I. 5. – P. 299-310. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00504-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00504-1) (accessed: 15.03.2020).

329. Fjällborg, B. Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*) / B. Fjällborg, B. Li, E. Nilsson, G. Dave. – DOI: 10.1007/s00244-005-7017-6. – Text : electronic // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 2006. – Vol. 50, I. 2. – P. 196-204. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-005-7017-6> (accessed: 15.03.2020).

330. Fleischer, P. Forest health conditions in the Tatra Biosphere Reserve / P. Fleischer, M. Koren. – Text : unmediated // Ekology. – Bratislava, 1995. – Vol. 14, I. 4. – P. 445-457.

331. Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay / N. Shimizu, C. Ogino, T. Kawanishi, Y. Hayashi. – DOI 10.1002/tox.10077. – Text : electronic // Environmental Toxicology. – 2002. – Vol. 17, I. 5. – P. 441-448. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/tox.10077> (accessed: 09.04.2020).

332. Frumin, G. T. Eutrophication of water bodies – A global environmental problem / G. T. Frumin, I. M. Gildeeva. – DOI: 10.1134/S1070363214130015. – Text : electronic // Russian Journal of General Chemistry. – 2014. – Vol. 84, I. 13. – P. 2483-2488. – URL:

<https://link.springer.com/article/10.1134/S1070363214130015> (accessed: 15.03.2020).

333. Gilbin, R. Effect of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna* / R. Gilbin, F. Alonzo, J. Garnier-Laplace. – DOI: 10.1016/j.jenvrad.2007.07.004. – Text : electronic // Journal of Environmental Radioactivity. – 2008. – Vol. 99, I. 1. – P. 134-145. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0265931X07001920> (accessed: 15.03.2020).

334. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics: Influence of copper addition / E. Morillo, T. Undabeytia, C. Maqueda, A. Ramos. – DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00255-6. – Text : electronic // Chemosphere. – 2000. – Vol. 40. – P. 103-107. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00255-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00255-6) (accessed: 08.04.2020).

335. Gompertz, B. On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies / B. Gompertz. – Text : electronic // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. – 1825. – Vol. 115. – P. 513-583. – URL: <https://www.jstor.org/stable/pdf/107756.pdf?refreqid=excelsior%3Ae2f06ef1e98f76b16242bd45f4682573> (accessed: 15.03.2020).

336. Gophen, M. Bioassay Indication of Nemagon Toxicity on *Daphnia magna* (Straus 1820) / M. Gophen. – DOI: 10.21746/ijbio.2016.01.007. – Text : electronic // International Journal of Bioassays. – 2016. – Vol. 5, I. 1. – P. 4739-4741. – URL: <https://www.ijbio.com/articles/bioassay-indication-of-nemagon-toxicity-on-daphnia-magna-straus-1820.pdf> (accessed: 15.03.2020).

337. Group, E. F. Environmental fate and aquatic toxicology studies on phthalate esters / E. F. Group. – DOI: 10.1289/ehp.8665337. – Text : electronic // Environmental Health Perspectives. – 1986. – Vol. 65. – P. 337-340. – URL: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.8665337> (accessed: 15.03.2020).

338. Hatching Requirements of *Daphnia magna* Straus, 1820, and *Daphnia pulex* Linnaeus, 1758, Diapausing Eggs from Iranian Populations In vitro / S.

Haghparast, A. Shabani, B. Shabanpour, S. A. Hoseini. – Text : electronic // Journal of Agricultural Science and Technology. – 2014. – Vol. 14, I. 4. – P. 811-820. – URL: <https://jast.modares.ac.ir/article-23-10343-en.pdf> (accessed: 15.03.2020).

339. Human exposure estimates for phthalates : letter / M. C. Kohn, F Parham, S. A. Masten [et al.]. – DOI: 10.1289/ehp.108-a440b. – Text : electronic // Environmental Health Perspectives. – 2000. – Vol. 108, № 10. – P. 440-441. – URL: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.108-a440b> (accessed: 15.03.2020).

340. Imazapyr herbicide efficacy on floating macrophyte control and ecotoxicology for non-target organisms / C. Cruz, A. F. Silva, N. S. Shiogiri [et al.]. – Text : electronic // Planta Daninha. – 2015. – V. 33, I.1. - P. 103-108. – URL: <http://www.scielo.br/pdf/pd/v33n1/0100-8358-pd-33-01-00103.pdf> (accessed: 15.03.2020).

341. In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? / O. Sobral, C. Chastinet, A. Nogueira [et al.]. – DOI 10.1006/eesa.2001.2088. – Text : electronic // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2001. – Vol. 50, I. 3. – P. 174-179. – URL: <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2088> (accessed: 09.04.2020).

342. In Vitro Environmental Toxicology – Concepts, Application and Assessment / ed. by G. Reifferscheid, S. Buchinger. – Cham : Springer, 2017. – 324 p. – (Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology ; vol. 157). – ISBN 978-3-319-45906-6. – Text : unmediated.

343. Individual and binary mixture effects of bisphenol A and lignin-derived bisphenol in *Daphnia magna* under chronic exposure / Dan Li, Hongxing Chen, Ran Bi [et al.]. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.022. – Text : electronic // Chemosphere. – 2018. – Vol. 191. – P. 779-786. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.022> (accessed: 15.03.2020).

344. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? / E. Lammer, G.J. Carr, K. Wendler [et al.]. – DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.11.006. – Text : electronic //

Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology.
– 2009. – Vol. 149, I. 2. – P. 196–209. – URL:
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006> (accessed: 15.03.2020).

345. Isakova, E. F. Seasonal changes in the actual fertility of *Daphnia magna* in laboratory culture / E. F. Isakova. – Text : unmediated // Hydrobiological journal. – 1980. – Vol. 16, I. 4. – P. 86-89.

346. Janssen, C. R. A Brief Review and Critical Evaluation of the Status of Microbiotests / C. R. Janssen, M. Vangheluwe, P. Van Sprang // New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring / ed. by G. Persoone, C. Janssen, W. De Coen. – New York : Springer US, 2000. – P. 27-37. – ISBN 978-0-306-46406-5. – Text : unmediated.

347. Jargin, S. V. Hormesis and radiation safety norms / S. V. Jargin. – DOI: 10.1177/0960327111431705. – Text : electronic // Human & Experimental Toxicology. – 2012. – Vol. 31, I. 7. – P. 671-675. – URL:
<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0960327111431705> (accessed: 15.03.2020).

348. Kaiser, K. L. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms / K. L. Kaiser. – DOI: 10.1289/ehp.98106583. – Text : electronic // Environmental Health Perspectives. – 1998. – Vol. 106. – N Suppl. 2. – P. 583-591. – URL:
<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.98106583> (accessed: 15.03.2020).

349. Khangarot, B. S. Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC50 values of other test models / B. S. Khangarot, S. Das. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.038. – Text : electronic // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Vol. 172, I. 2-3. – P. 641-649. – URL:
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.038> (accessed: 15.03.2020).

350. Kokkali, V. Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples / V. Kokkali, W. van Delft. – DOI: 10.1016/j.trac.2014.08.001. – Text : electronic // TrAC Trends in Analytical

Chemistry. – 2014. – Vol. 61. – P. 133-135. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.001> (accessed: 15.03.2020).

351. Kramer, K. J. M. Aquatic biological early warning systems: an overview / K. J. M. Kramer, J. Botterweg. – Text : unmediated // Bioindicators and environmental management / L. Bozzano. –Cambridge : Academic Press, 1991. – P. 95 – 126.

352. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus / T. C. Diamantino, E. Almeida, A. Soares, L. Guilhermino. – DOI: 10.1016/S0045-6535(01)00029-7. – Text: electronic // Chemosphere. – 2001. – Vol. 45, I. 4-5. – P. 553-560. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00029-7) (accessed: 15.03.2020).

353. Lalah, J.O. The Effects of Mn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ and Zn²⁺ Ions on Pesticide Adsorption and Mobility in a Tropical Soil / J.O. Lalah, S.N. Njogu, S.O. Wandiga. – DOI: 10.1007/s00128-009-9746-0. – Text : electronic // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 2009. – Vol. 83, I. 3. – P. 352–358. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9746-0> (accessed: 15.03.2020).

354. Lam, I. K. S. Trace element deficiency in freshwater cladoceran *Daphnia magna* / I. K. S. Lam, W. Wang. – DOI: 10.3354/ab00023. – Text : electronic // Aquatic Biology. – 2007. – Vol. 1, I. 3. – P. 217–224. – URL: <https://doi.org/10.3354/ab00023> (accessed: 15.03.2020).

355. Lari, E. Effects of oil sands process-affected water on the respiratory and circulatory system of *Daphnia magna* Straus, 1820 / E. Lari, E. Mohaddes, G. G. Pyle. – DOI: /10.1016/j.scitotenv.2017.06.207. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2017. – Vol. 605-606. – P. 824-829. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.207> (accessed: 15.03.2020).

356. Latini, G. Plasticizers, infant nutrition and reproductive health / G. Latini, C. De Felice, A. Verrotti. – DOI: 10.1016/j.reprotox.2004.05.011. – Text : electronic // Reproductive Toxicology. – 2004 – Vol. 19, I. 1. – P. 27–33. URL : <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.05.011> (accessed: 15.03.2020).

357. Lewis, M. A. Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Straus. in laboratory culture / M. A. Lewis, A. W. Maki. – DOI: 10.1007/BF00006627. – Text : electronic // Hydrobiologia. – 1981. – Vol. 85, I. 2. – P. 175 – 179. – URL: <https://doi.org/10.1007/BF00006627> (accessed: 15.03.2020).

358. Linde, M. Concentrations and pools of heavy metals in urban Stockholm, Sweden / M. Linde, H. Bengtsson, I. Oborn. – Text : unmediated // Water, Air, & Soil Pollution: Focus. – 2001. – Vol. 1, I. 3-4. – P. 83-101.

359. Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote / J. A Eisen , R. S Coyne, M. Wu [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pbio.0040286. – Text : electronic // Plos Biology. – 2009. – Vol. 4, I. 9. – P. 1620-1642. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040286> (accessed: 15.03.2020).

360. Macrophyte bioassay applications for monitoring pesticides in the aquatic environment / J. F. Della Vechia, C. Cruz, A. F. Silva [et al.]. – Text : electronic // Planta Daninha. – 2016 – Vol. 34, I. 3. – P. 597-603. – URL: <http://www.scielo.br/pdf/pd/v34n3/0100-8358-pd-34-03-00597.pdf> (accessed: 15.03.2020).

361. Mammalian Toxicology / ed. by Abou-Donia, M. B. – New York : Wiley, 2015. – 720 p. – ISBN 978-1119940418. – Text : unmediated.

362. Maqueda, C. Retention and release of copper on montmorillonite as affected by the presence of a pesticide / C. Maqueda, T. Undabeytia, E. Morillo. – DOI: [10.1021/jf970500k](https://doi.org/10.1021/jf970500k). – Text : electronic // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1998. – Vol. 46, I. 3. – P. 1200-1204. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf970500k> (accessed: 07.04.2020).

363. Maryon, E. B. Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1 / E. B. Maryon, S. A. Molloy, J. H. Kaplan. – DOI: 10.1152/ajpcell.00417.2012. – Text : electronic // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2013. – Vol. 304, I. 8. – P. 768-779. – URL:

<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00417.2012> (accessed: 07.04.2020).

364. Mass spectral library and other tools // National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg. USA. – URL: <https://chemdata.nist.gov/> (accessed: 07.04.2020). – Different types of content.

365. McLafferty, F. W. Interpretation of mass spectra / F.W. McLafferty, František Tureček. – 4th ed. – Mill Valley, Calif. : University Science Books, 1993. – XVIII + 371 p. - ISBN 0-935702-25-3. – Text : unmediated.

366. Mercury (II) bioaccumulation and antioxidant physiology in four aquatic insects / X. Lingtian, J. L. Flippin, N. Deighton [et al.]. – DOI: 10.1021/es802323r. – Text : electronic // Environmental Science & Technology. – 2009. – Vol. 43, I. 3. – P. 934-940. – URL: <http://dx.doi.org/10.1021/es802323r> (accessed: 06.04.2020).

367. Metal-Binding organic macromolecules in soil: 3. Competition of Mg(II) and Zn(II) for binding sites in humic and fulvic-type model polymers / H. Zunino, M. Aquilera, M. Caiozzi [et al.] – DOI 10.1097/00010694-197911000-00001. – Text : electronic // Soil Science. – 1979. – Vol. 128, I. 5. – P. 257-266. – URL: https://journals.lww.com/soilsci/Abstract/1979/11000/METAL_BINDING_ORGANIC_MACROMOLECULES_IN_SOIL_3_1.aspx (accessed: 09.04.2020).

368. Michałowicz, J. Phenols – sources and toxicity / J. Michałowicz, W. Duda. – Text : unmediated // Polish Journal of Environmental Studies. – 2007. – Vol. 16, I. 3. – P. 347-362.

369. Monitoring of surface water by ultrasensitive Daphnia toximeter / M. Lechelt, W. Blohm, B. Kirschneit [et al.]. – Text : electronic // Environmental Toxicology. – 2000. Vol. 15, I. 5. – P. 390–400. – URL: [https://doi.org/10.1002/1522-7278\(2000\)15:5%3C390::AID-TOX6%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1522-7278(2000)15:5%3C390::AID-TOX6%3E3.0.CO;2-H) (accessed: 15.03.2020).

370. Morillo, E. Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effect of Cu (II) in solution and adsorbed on the mineral / E.

Morillo, T. Undabeytia, C. Maqueda. – DOI: 10.1021/es9703411. – Text : electronic // Environmental Science & Technology. – 1997. – Vol. 31. – P. 3588-3592. – URL: <https://doi.org/10.1021/es9703411> (accessed: 08.04.2020).

371. Naumann, E. Über die Anwendung von Daphnia magna Straus als Versuchstier zur experimentellen Klarlegung der Lebensverhältnisse im Wasser / E. Naumann. – DOI: 10.1002/iroh.19340310126. – Text : electronic // Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie. – 1934. – Vol. 31, I. 1. – P. 421-431. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/iroh.19340310126> (accessed: 08.04.2020).

372. Nikinmaa, M. An Introduction to Aquatic Toxicology / M. Nikinmaa. – London : Academic press, 2014. – 252 p. – ISBN 9780124115743. – Text : unmediated.

373. Nikitin, O. V. Bioassay of Pyrethroid Insecticide Esfenvalerate Using Fractal Analysis of Daphnia Magna Motion / O. V. Nikitin, V. M. Petrova, V. Z. Latypova. – Text : unmediated // Research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences. – 2015. – Vol. 6, I. 6. – P. 1729-1736.

374. Novel insight into adsorption and co-adsorption of heavy metal ions and an organic pollutant by magnetic graphene nanomaterials in water / Dan Huang, JiziWu, LuWang [et al.]. – DOI 10.1016/j.cej.2018.10.138. – Text : electronic // Chemical Engineering Journal. – 2019. – Vol. 358. – P. 1399-1409. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.138> (accessed: 15.03.2020).

375. Odum, E. P. Fundamentals of Ecology / E. P. Odum. – Philadelphia : Saunders, 1953. – 384 p. – Text : unmediated.

376. Olkova, A. S. Modern trends in the development of the methodology of bioassay aquatic environments / A. S. Olkova. – DOI 10.25750/1995-4301-2018-3-019-026. – Text : electronic // Theoretical and Applied Ecology. – 2018. – I. 3. – P. 19-26. – URL: <http://envjournal.ru/ari/v2018/v3/18303.pdf> (accessed: 08.04.2020).

377. Orlins, S. China's toxic informal e-waste recycling: local approaches to a global environmental problem / S. Orlins, D. Guan. – DOI 10.1016/j.jclepro.2015.05.090. – Text : electronic // Journal of Cleaner Production. – 2016. – Vol. 114. – P. 71-80. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.05.090> (accessed: 08.04.2020).

378. Ostfeld, A. Optimal layout of early warning detection stations for water distribution systems security / A. Ostfeld, E. Salomons. – DOI 10.1061/(ASCE)0733-9496(2004)130:5(377). – Text : electronic // Journal of Water Resources Planning and Management. – 2004. – Vol. 130, I. 5. – P. 377-385. – URL: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9496\(2004\)130:5\(377\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9496(2004)130:5(377)) (accessed: 08.04.2020).

379. Oxidative stress in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*, exposed to binary waterborne mixtures of the pro-oxidant cadmium and the antioxidant diclofenac / N. K. McRae, S. Gaw, B. W. Brooks, C. N. Glover. – DOI: 10.1016/j.envpol.2019.01.073. – Text : electronic // Environmental Pollution. – 2019. – Vol. 247. – P. 638-646. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.073> (accessed: 07.04.2020).

380. Park, J-S. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata* / J-S. Park, M. T. Brown, T. Han. – DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.10.004. – Text : electronic // Aquat Toxicology. – 2012. – Vol. 106. – P. 182-188. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.004> (accessed: 08.04.2020).

381. Parvez, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals / S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji. – DOI 10.1016/j.envint.2005.08.022. – Text : electroni // Environment International. – 2006. – Vol. 32, I. 2. – P. 265-268. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.022> (accessed: 08.04.2020).

382. Pauw, N. D. Mass cultivation of *Daphnia magna* Straus on ricebran / N. D. Pauw, P. Laureys, J. Morales. – Text : unmediated // Aquaculture. – 1981. – Vol. 25, I. 2-3. – P. 141-152.

383. Perceived health benefits of managed and unmanaged meadows in a mountain biosphere reserve – an experimental study in the Austrian Alps / A. Arnberger, R. Eder, B. Alex [et al.] – DOI 10.1553/eco.mont-10-1s5. – Text : electronic // Journal on Protected Mountain Areas Research. – 2018. – Vol. 10, I. 1. – P. 5-14. – URL: <http://austriaca.at/?arp=0x0037471f> (accessed: 15.03.2020).

384. Perspectives in Environmental Toxicology / ed. by K.K. Kesari. – Switzerland : Springer International Publishing, 2017. – 214 p. – ISBN 978-3-319-46247-9. – Text : unmediated.

385. Poirier, D. G. *Daphnia magna* acute lethality toxicity test protocol / D.G. Poirier, G.F. Westlake, S. G. Abernethy. – Ontario, 1988. – URL: <http://hdl.handle.net/10214/15534> (accessed: 08.04.2020). – Text : electronic.

386. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals / R. Altenburger, T. Backhaus, W. Boedeker [et al.]. – DOI: 10.1002/etc.5620190926. – Text : electronic // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2000. – Vol.19, N 9. – P. 2341-2347. – URL: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620190926> (accessed: 15.03.2020).

387. Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future / ed. by R. L. Singh. – Singapore : Springer, 2017. – 487 p. – ISBN 978-981-10-1865-7. – DOI 10.1007/978-981-10-1866-4. – Text : unmediated.

388. Procedures for conducting *Daphnia magna* toxicity bioassays : users guide : EPA 600/8-87/011 / developer US Environmental Protection Agency (USEPA). – Las Vegas, 1987. – 57 p. – Text : unmediated.

389. Reductive transformation of bound trinitrophenyl residues and free TNT during a bioremediation process analyzed by immunoassay / C. Achtnich, P. Pfortner, M. G. Weller [et al.]. – DOI: 10.1021/es9901765. – Text : electronic // Environmental Science & Technology. – 1999. – Vol. 33, I. 19. – P. 3421-3426. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es9901765> (accessed: 15.03.2020).

390. Rees, J. Small-scale mass cultures of *Daphnia magna* Straus / J. Rees, J. M. Oldfather. – DOI 10.1111/j.1749-7345.1980.tb00114.x. – Text : electronic // Proceedings of the World Mariculture Society. – 1980. – Vol. 11, I. 1-4. – P. 202-210. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-7345.1980.tb00114.x> (accessed: 09.04.2020).

391. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs / G. Persoone, R. Baudo, M. Cotman [et al.] – DOI 10.1051/kmae/2009012. – Text : electronic // Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems. – 2009. – I. 393. – P. 1-29. – URL: <https://doi.org/10.1051/kmae/2009012> (accessed: 08.04.2020).

392. Revised Ecological hazard and environmental risk assessment chapter for Sodium fluoride : PC code 075202 : case № 3132 : from 25.09.2007 / developer R. C. Petrie. – Washington, 2007. – 13 p. – URL: <http://www.fluoridealert.org/wp-content/pesticides/EPA-HQ-OPP-2007-0833-0007.pdf> (accessed: 08.04.2020). – Text : electronic.

393. Rinke, K. Modeling the effects of temperature and food on individual growth and reproduction of *Daphnia* and their consequences on the population level / K. Rinke, T. Petzoldt. – DOI 10.1016/S0075-9511(03)80024-5. – Text : electronic // Limnologica. – 2003. – Vol. 33, I. 4. – P. 293-304. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(03\)80024-5](https://doi.org/10.1016/S0075-9511(03)80024-5) (accessed: 09.04.2020).

394. Rizzo, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment / L. Rizzo. – DOI 10.1016/j.watres.2011.05.035. – Text : electronic // Water Research. – 2011. – Vol. 45, I. 15. – P. 4311-4340. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.035> (accessed: 09.04.2020).

395. Salnikow, K. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium / K. Salnikow, A. Zhitkovich. – DOI 10.1021/tx700198a. – Text : electronic //

Chemical Research in Toxicology. – 2008. – Vol. 21, I. 1. – P. 28-44. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx700198a> (accessed: 09.04.2020).

396. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes / P. Pandard, J. Devillers, A.M. Charissou [et al.]. – DOI 10.1016/j.scitotenv.2005.12.016. – Text : electroni // Science of The Total Environment. – Vol. 363, I. 1-3. – P. 114-125. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.12.016> (accessed: 08.04.2020).

397. Shashkova, T. L. Impact of heavy metals on the trophic activity of daphnia depending on feeding conditions and age of crustaceans / T. L. Shashkova, Yu. S. Grigor'ev. – DOI 10.1134/S1995425513060103. – Text : electroni // Contemporary Problems of Ecology. – 2013. – Vol. 6. – P. 662-666. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1995425513060103> (accessed: 09.04.2020).

398. Shcherban, E. P. Impact of Nicosulfuron-containing Herbicide on Ceriodaphnia affinis / E. P. Shcherban, V. I. Lokhanskaya. – DOI 10.1615/HydrobJ.v52.i5.80. – Text : electronic // Hydrobiological Journal. – 2016. – Vol. 52, I. 5. – P. 73-80. – URL: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/38cb2223012b73f2,3a9407e0040b3802,218ad8fa32338a8c.html> (accessed: 09.04.2020).

399. Shepson, P. B. Interactions between atmospheric nitrogen chemistry, air quality, and the health of the biosphere / P. B. Shepson, A. Costa. – Text : unmediated // Abstracts of papers of the American Chemical Society. – 2012. – Vol. 244. – P. 212.

400. Silva, E. Something from “nothing”—Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects / E. Silva, N. Rajapakse, A. Kortenkamp. – DOI 10.1021/es0101227. – Text : electronic // Environmental Science & Technology. – 2002. – Vol. 36, I. 8. – P. 1751-1756. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es0101227> (accessed: 09.04.2020).

401. Slabbert, J. L. Biological assays for aquatic toxicity testing / J. L. Slabbert, E. A. Venter. – DOI 10.1016/S0273-1223(99)00300-5. – Text : electronic // Water Science and Technology. – 1999. – Vol. 39, I. 10–11. – P. 367-373. – URL: <https://doi.org/10.2166/wst.1999.0684> (accessed: 09.04.2020).

402. Spaak, P. Tail spine length in the *Daphnia galeata* complex: costs and benefits of induction by fish / P. Spaak, M. Boersma. – DOI 10.1023/A:1009935100804. – Text : electronic // Aquatic Ecology. – 1997. – Vol. 31. – P. 89-98. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1009935100804> (accessed: 09.04.2020).

403. Storey, M. V. Advances in on-line drinking water quality monitoring and early warning systems / M. V. Storey, B. Van der Gaag, B. P. Burns. – DOI 10.1016/j.watres.2010.08.049. – Text : electronic // Water Research. – 2011. – Vol. 45, I. 2. – P. 741-747. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.049> (accessed: 09.04.2020).

404. Synergetic and antagonistic effects of cadmium on adsorption of atrazine on surficial sediments / Y. Li, Q. Gao, X.-L. Wang [et al.]. – Text : unmediated // Chemical Research in Chinese Universities. – 2009. – Vol. 25, I. 2. – P. 155-160.

405. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K12 / F. R. Blattner, G. Plunkett III, C. A. Bloch [et al.]. – DOI: 10.1126/science.277.5331.1453. – Text : electronic // Science. – 1997. – Vol. 277, I. 5331. – P. 1453-1462. – URL: <https://science.sciencemag.org/content/277/5331/1453.long> (accessed: 15.03.2020).

406. The effect of dissolved glyphosate upon the sorption of copper by three selected soils / E. Morillo, T. Undabeytia, C. Maqueda, A. Ramos. – DOI: 10.1016/S0045-6535(01)00338-1. – Text : electronic // Chemosphere. – 2002. – Vol. 47. – P. 747-752. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00338-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00338-1) (accessed: 08.04.2020).

407. The effect of radiation on bioluminescent bacteria: possible use of luminescent bacteria as a biological dosimeter / J. Mantel, M. Freidin, A. Bulich, H. Perry. – DOI: [10.1088/0031-9155/28/5/012](https://doi.org/10.1088/0031-9155/28/5/012). – Text : electronic // Physics in Medicine and biology. – 1983. – Vol. 28, I. 5. – P. 599-602. – URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/28/5/012> (accessed: 07.04.2020).

408. The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis / A. S. Olkova, G. Y. Kantor, T. I. Kutuyavina, 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/abs/10.1002/etc.3956> (accessed: 08.04.2020).

409. The use of Microtox® to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil) / C. V. M. Araújo, R. B. Nascimento, C. A. Oliveira [et al.]. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.036. – Text : electronic // Chemosphere. – 2005. – Vol. 58, N 9. – P. 1277-1281. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.036> (accessed: 15.03.2020).

410. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on nontarget organisms / M. Isidori, M. Lavorgna, A. Nardelli [et al.]. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.11.017. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2005. – Vol. 346, I. 1-3. – P. 87-98. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017> (accessed: 15.03.2020).

411. Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox ® / G. Ricco, M. C. Tomei, R. Ramadori, G. Laera. – DOI 10.1016/j.watres.2004.01.020. – Text : electronic // Water Research. – 2004. – Vol. 38, I. 8. – P. 2103-2110. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.020> (accessed: 09.04.2020).

412. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* / J. Wang, X. Zhang, Y. Chen [et al.] – DOI 10.1016/j.chemosphere.2008.07.040. – Text : electronic //

Chemosphere. – 2008. – Vol. 73, I. 7. – P. 1121-1128. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.040> (accessed: 09.04.2020).

413. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox® chronic toxicity test / Chi-Ying Hsieh, Meng-Hsiun Tsai, D. K. Ryan, O. C. Pancorbo. – DOI: 10.1016/S0048-9697(03)00451-0. – Text : electronic // Science of The Total Environment. – 2004. – Vol. 320, I. 1. – P. 37-50. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00451-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00451-0) (accessed: 15.03.2020).

414. Transformation of *Paramecium caudatum* with a novel expression vector harboring codon-optimized GFP gene / Y. Takenaka, T. Matsuura, Y. Mitsui [et al.]. – DOI 10.1016/S0378-1119(01)00886-1. – Text : electronic // Gene. – 2002. – Vol. 284, I. 1-2. – P. 233-240. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00886-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00886-1) (accessed: 09.04.2020).

415. Use of *Vibrio fischeri* for screening for bioactivity in water analysis / W. Schulz, W. Seitz, S. C. Weiss [et al.] – DOI 10.1556/JPC.21.2008.6.6. – Text : electronic // Journal of Planar Chromatography. – 2008. – Vol. 21, I. 6. – P. 427-430. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1556/JPC.21.2008.6.6> (accessed: 09.04.2020).

416. Warne, M. S. J. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis / M. S. J. Warne, D. W. Hawker. – DOI 10.1006/eesa.1995.1039. – Text : electronic // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 1995. – Vol. 31, I. 1. – P. 23-28. – URL: <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1039> (accessed: 09.04.2020).

417. Weissmannová, H. D. Indices of soil contamination by heavy metals – methodology of calculation for pollution assessment (minireview) / H. D. Weissmannová, J. Pavlovský. – DOI 10.1007/s10661-017-6340-5. – Text : electronic // Environmental Monitoring and Assessment. – 2017. – Vol. 189, I. 12. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10661-017-6340-5> (accessed: 09.04.2020).

418. Weller, M. G. A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques / M. G. Weller. – DOI 10.3390/s120709181. – Text : electronic // Sensors. – Basel, 2012. – Vol. 12, I. 7. – P. 9181-9209. – URL: <https://doi.org/10.3390/s120709181> (accessed: 09.04.2020).

419. Wiczerzak, M. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review / M. Wiczerzak, J. Namieśnik, B. Kudlak. – DOI 10.1016/j.envint.2016.05.017. – Text : electronic // Environment International. – 2016. – Vol. 94. – P. 341-361. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.017> (accessed: 09.04.2020).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Протокол полного химического и микробиологического анализа культивационной воды для тест-культур, использованных в работе

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
"Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области"
(ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области")
Аккредитованный Испытательный лабораторный центр
Юридический адрес: Свободы ул., д 64а, г. Киров, 610000
Адрес места осуществления деятельности: Свободы ул., д 64а, г. Киров, 610000
телефон/факс: 38-57-54, Email: kirov@sanepid.ru
ОКПО 73606667, ОГРН 1054316558669, ИНН/КПП 4345100758/434501001

Аттестат аккредитации
испытательной лаборатории (Центра)
№ РОСС RU.0001.510166

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ИЛЦ, заместитель главного врача
ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии
в Кировской области"
К.В.Ердяков
12 апреля 2017 г.



ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ

№ 13284 от 12.04.2017

- Наименование предприятия, организации (заявитель), юридический адрес:**
ИП Зонов В.В.
Кировская область, г.Киров, ул. Московская, 3-3
- Наименование образца (пробы)** Вода питьевая артезианская "Ключ здоровья"
- Изготовитель (фирма, предприятие, организация, адрес производства), место отбора**
Накопительная емкость артезианской скважины № 8008 страна Россия
г. Киров, д. Сергеевы
- Для продукции:**
Дата изготовления 05.04.2017
Номер партии -

Объем партии 90000 л
Упаковка -
- Время и дата отбора:** 05.04.2017 09 ч. 45 мин.
Должность и Ф.И.О. лица, проводившего отбор: Заместитель директора (ИП Зонов В.В.) Головин В.Е.
- Условия доставки:** автотранспорт, термоконтейнер
Время и дата доставки в ИЛЦ: 05.04.2017 11 ч. 00 мин.
Количество(объем) для испытаний 65 л
для контрольных образцов
- Цель отбора** договор № 3203-А от 13.03.2012
- Дополнительные сведения** -
- НД на продукцию:** ТУ 0131-003-61600719-13
- НД, устанавливающие требования к объекту исследований (испытаний):**
СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества"

СанПиН 2.1.4.2653-10 "Изменения №2 к СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества"

СанПиН 2.1.4.2581-10 "Изменения №1 к СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества"

10. **Код образца (пробы):** 13284-05-01-Б,С,И-1.1-2017

Вода питьевая артезианская "Ключ здоровья"
 Код образца (проба): 13284-03-01-Б.С.И.1-1-2017

I. САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дата начала исследования: 05.04.2017 Дата окончания исследования: 11.04.2017

№ п/п	Определяемые показатели	Единица измерения	Результат исследования и достоверность измерения	Величина допустимого уровня	НД на метод исследования
1	Цветность	град.	менее 1	не более 5	ГОСТ 31868-2012
2	Сульфаты	мг/л	менее 2	не более 250	ГОСТ 31940-2012
3	Кремний	мг/л	8,1 ± 1,6	не более 10	ПНД Ф 14.1.2.4.215-06
4	Нитраты (по NO ₃)	мг/л	10,2 ± 2,0	не более 20	Методика №01.1.1.2.3.4.14-05
5	Привкус	баллы	0	не более 0	ГОСТ 3351-74
6	Запах при 60 °С	баллы	0	не более 1	ГОСТ 3351-74
7	Запах при 20 °С	баллы	0	не более 0	ГОСТ 3351-74
8	Хлориды	мг/л	39,6 ± 4,4	не более 250	ПНД Ф 14.1.2.3.96-97
9	Окисляемость перманганатная	мгО ₂ /л	0,57 ± 0,11	не более 3	ПНД Ф 14.1.2.4.154-99
10	pH	единицы pH	7,4 ± 0,2	от 6,5 до 8,5	ПНД Ф 14.1.2.3.4.121-97
11	По сумме NO ₂ и NO ₃	ед.	0,51	не более 1	СанПиН 2.1.4.2653-10
12	Органический углерод	мг/л	менее 1,2	не более 10	Методика анализа мин. вод /под. ред. П.Н. Палея
13	Натрий	мг/л	12,2 ± 0,7	не более 200	РД 52.24.391-2008
14	Аммиак	мг/л	менее 0,05	не более 0,1	ПНД Ф 14.1.2.4.262-10
15	Жесткость общая	мг-экв/л	2,43 ± 0,36	не более 7	ГОСТ 31954-2012
16	Щелочность	мг-экв/л	1,55 ± 0,19	не более 6,5	ГОСТ 31957-2012
17	Кальций	мг/л	27,7 ± 3,1	не более 130	ПНД Ф 14.1.2.3.95-97
18	Общая минерализация (сухой остаток)	мг/л	192 ± 17	не более 1000	ПНД Ф 14.1.2.4.261-10
19	Калий	мг/л	менее 1	не более 20	РД 52.24.391-2008
20	Железо	мг/л	менее 0,1	не более 0,3	ГОСТ 4011-72
21	Алюминий	мг/л	менее 0,04	не более 0,2	ПНД Ф 14.1.2.4.166-2000
22	Фосфаты	мг/л	менее 0,05	не более 3,5	ПНД Ф 14.1.2.4.248-07
23	Хром (6+)	мг/л	менее 0,005	не более 0,05	ГОСТ 31956-2012
24	Бикарбонаты	мг/л	94,6 ± 11,4	не более 400	ГОСТ 31957-2012
25	Мутность	ЕМФ	менее 1	не более 1	ПНД Ф 14.1.2.4.213-05
26	Бромиды	мг/л	Не обнаружено	не более 0,2	ГОСТ 23268.15-78*
27	Сероводород	мг/л	Не обнаружено	не более 0,003	ПНД Ф 14.1.2.4.178-02
28	Кислород растворенный	мг/л	10,30 ± 1,44	не менее 5	ПНД Ф 14.1.2.3.4.123-97
29	Нитриты (по NO ₂)	мг/л	менее 0,016	не более 0,5	Методика № 01.1.1.2.4.13-05
30	Нефтепродукты (суммарно)	мг/л	менее 0,005	не более 0,05	ПНД Ф 14.1.2.4.128-98
31	Селен и его соединения	мг/л	менее 0,002	не более 0,01	ГОСТ 31870-2012
32	Мышьяк	мг/л	менее 0,005	не более 0,01	ГОСТ 31870-2012
33	Цинк	мг/л	менее 0,01	не более 0,035	ПНД Ф 14.1.2.4.146-99
34	Сурьма	мг/л	менее 0,0005	не более 0,005	ПНД Ф 14.1.2.4.140-98
35	Барий	мг/л	0,04 ± 0,01	не более 0,7	ГОСТ 31870-2012
36	Цинк	мг/л	менее 0,001	не более 5	ФР.1.31.2012.12801
37	Малондаль	мг/л	0,014 ± 0,005	не более 0,07	ГОСТ 31870-2012
38	Фторид-ион	мг/л	менее 0,05	не более 1,5	ГОСТ 4386-89
39	ПАВ-ионноактивные	мг/л	менее 0,025	не более 0,05	ГОСТ 31857-2012
40	Свинец	мг/л	менее 0,001	не более 0,01	ГОСТ 31870-2012
41	Марганец	мг/л	менее 0,001	не более 0,05	ГОСТ 31870-2012
42	Иодид-ион	мг/л	1,5 ± 0,4	не более 125	МУ 31-08/04
43	Кобальт	мг/л	менее 0,001	не более 0,1	ГОСТ 31870-2012
44	Формальдегид	мг/л	менее 20	не более 25	ПНД Ф 14.1.2.4.187-02
45	Магний	мг/л	5,80 ± 0,64	не более 65	ФР.1.31.2012.12801
46	Нитроз	мг/л	менее 0,001	не более 0,02	ГОСТ 31870-2012
47	Серебро	мг/л	менее 0,0005	не более 0,025	ГОСТ 31870-2012
48	Бор	мг/л	менее 0,05	не более 1	ГОСТ 31949-2012
49	Бериллий	мг/л	менее 0,0001	не более 0,0002	ГОСТ 31870-2012
50	Кадмий	мг/л	менее 0,0001	не более 0,001	ГОСТ 31870-2012
51	Ртуть	мг/л	менее 0,0001	не более 0,0005	ГОСТ 31950-2012
52	Стронций (стабильный)	мг/л	менее 1	не более 7	ФР.1.31.2012.12801
53	Медь	мг/л	менее 0,001	не более 1	ФР.1.31.2012.12801
54	Бромиды	мг/л	Не обнаружено	не более 20	МУК 4.1.646-96
55	Хлориды	мг/л	менее 50	не более 60	МУК 4.1.646-96
56	Тетрахлорметан	мг/л	менее 1	не более 2	МУК 4.1.646-96
57	Дихлорбромметан	мг/л	Не обнаружено	не более 10	МУК 4.1.646-96
58	Дибромхлорметан	мг/л	Не обнаружено	не более 10	МУК 4.1.646-96
59	Сумма тригалометанов	ед.	менее 1	не более 1	СанПиН 2.1.4.2653-10
60	Фенол	мг/л	менее 0,1	не более 0,5	НДП 30.1.2.3.117-2012
61	Дитилтескцифталат	мг/л	менее 0,05	не более 6	МУК 4.1.2889-11
62	Атразин	мг/л	менее 0,05	не более 0,2	ПНД Ф 14.1.2.4.205-04
63	Симазин	мг/л	менее 0,05	не более 0,2	ПНД Ф 14.1.2.4.205-04
64	Бензилпирен	мг/л	менее 0,002	не более 0,005	МУК 4.1.741-99
65	гамма-изомер ГХЦГ	мг/л	менее 0,01	не более 0,5	ПНД Ф 14.1.2.3.4.204-04
66	ДДТ (сумма изомеров)	мг/л	менее 0,01	не более 0,5	ПНД Ф 14.1.2.3.4.204-04
67	Гексахлорбензол	мг/л	менее 0,01	не более 0,2	ПНД Ф 14.1.2.3.4.204-04
68	Гептахлор	мг/л	менее 0,01	не более 0,05	ПНД Ф 14.1.2.3.4.204-04
69	2,4-Д кислота	мг/л	менее 0,1	не более 1	МУК 4.1.2662-10

Исследования проводили:

Должность: Ф.И.О. Подпись:
 Врач по СГЛИ Кочергина Т.В. *Кочергина Т.В.*
 Врач по СГЛИ Н.Д. Герасимова *Герасимова Н.Д.*
 Химик-эксперт Титкова И.В. *Титкова И.В.*
 Старший химик-эксперт Яусюк А.А. *Яусюк А.А.*
 Завсудующий санитарно-гигиенической лабораторией С.В. Шашина *Шашина С.В.*

* НД на метод исследования вне области аккредитации испытательного лабораторного центра

Вода питьевая артезианская "Ключ здоровья"
Код образца (пробы): 13284-05-01-Б,С,И-1.1-2017

II. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дата начала исследования: 05.04.2017 Дата окончания исследования: 10.04.2017

№ п/п	Определяемые показатели	Единица измерения	Результаты исследований	Величина допустимого уровня	НД на методы исследования
1	Общие колиформные бактерии	КОЕ в 100 мл	Не обнаружено	Не допускается в 300 мл	МУ 2.1.4.1184-03
2	Глюкозоположительные колиформные бактерии	КОЕ в 100 мл	Не обнаружено	Не допускается в 300 мл	МУ 2.1.4.1184-03
3	Общее микробное число (37 °С)	КОЕ в 1 мл	Не обнаружено	не более 20	МУ 2.1.4.1184-03
4	Общее микробное число (22 °С)	КОЕ в 1 мл	Не обнаружено	не более 100	МУ 2.1.4.1184-03
5	Колифаги	БОЕ в 100 мл	Не обнаружено	Не допускается в 1000 мл	МУ 2.1.4.1184-03
6	<i>P.aeruginosa</i>	в 1000 см ³	Не обнаружено	Не допускается в 1000 мл	МУ 2.1.4.1184-03
7	Споры сульфитредуцирующих кластридий	КОЕ в 100 мл	Не обнаружено	Не допускается в 20 мл	МУ 2.1.4.1184-03
8	Термотолерантные колиформные бактерии	КОЕ в 100 мл	Не обнаружено	Не допускается в 300 мл	МУ 2.1.4.1184-03

Исследования проводили:
Должность: _____ Ф.И.О. _____ Подпись: *Л.А. Севастьянова*
Врач-бактериолог Кочурова Н.В.
Заведующий бактериологической лабораторией Л.А. Севастьянова

III. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дата начала исследования: 05.04.2017 Дата окончания исследования: 07.04.2017

№ п/п	Определяемые показатели	Единица измерения	Результаты исследований	Величина допустимого уровня	НД на методы исследования
1	Яйца гельминтов	в 50 л	Не обнаружено	Не допускается	МУК 4.2.2314-08
2	Ооцисты криптоспоридий	в 50 л	Не обнаружено	Не допускается	МУК 4.2.2314-08
3	Цисты лямблий	в 50 л	Не обнаружено	Не допускается	МУК 4.2.2314-08

Исследования проводили:
Должность: _____ Ф.И.О. _____ Подпись: *Л.А. Севастьянова*
Фельдшер-лаборант Половникова Г.В.
Заведующий бактериологической лабораторией Л.А. Севастьянова

IV. РАДИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дата начала исследования: 05.04.2017 Дата окончания исследования: 11.04.2017

№ п/п	Определяемые показатели	Единица измерения	Удельная активность (А), неопределенность измерения (± V)	Допустимый уровень (ДУ)	НД на методы исследования
1	Удельная суммарная альфа-активность	Бк/кг	0,03 ± 0,01	не более 0,2	МР 40090.9А605 от 15.01.2009 ФГУП ВНИИФТРИ
2	Удельная суммарная бета-активность	Бк/кг	менее 0,02	не более 1	МР 40090.9А605 от 15.01.2009 ФГУП ВНИИФТРИ

Исследования проводили:
Должность: _____ Ф.И.О. _____ Подпись: *В.И. Титлянов*
Химик-эксперт Кузнецова М.Д.
Заведующий лабораторией ионизирующих и неионизирующих факторов В.И. Титлянов

Ответственный за оформление протокола:
Товаровед II категории отделения по отбору приему проб и выдаче протоколов Кононова Е.Н.

Примечание:
1. Результаты испытаний относятся только к образцам, прошедшим испытание.
2. Полная или частичная перепечатка, копирование протокола без письменного разрешения ИЛЦ (ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области" не допускается. Разрешение подтверждается подписью руководителя ИЛЦ ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области" или его заместителя и печатью с указанием даты выдачи копии.
Протокол составлен в двух экземплярах

Протокол краткого ежемесячного химического и микробиологического анализа культивационной воды для тест-культур, использованных в работе

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
 Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
 "Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области"
 (ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области")
 Аккредитованный Испытательный лабораторный центр
 Юридический адрес: Свободы ул., д 64а, г. Киров, 610000
 Адрес места осуществления деятельности: Свободы ул., д 64а, г. Киров, 610000
 телефон/факс: 38-57-54. Email: kirov@sanepid.ru
 ОКПО 73606667, ОГРН 1054316558669, ИНН/КПП 4345100758/434501001

Аттестат аккредитации
 испытательной лаборатории (Центра)
 № РОСС RU.0001.510166

УТВЕРЖДАЮ
 Руководитель ИЛЦ, заместитель главного врача
 ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии
 в Кировской области"
 К.В.Ердяков
 ноября 2017 г.



ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ
 № 46953 от 07.11.2017

1. **Наименование предприятия, организации (заявитель), юридический адрес:**
 ИП Зонов В.В.
 Кировская область, г.Киров, ул. Московская, 3-3
2. **Наименование образца (пробы)** Вода питьевая артезианская "Ключ здоровья"
3. **Изготовитель (фирма, предприятие, организация, адрес производства), место отбора**
 Накопительная емкость артезианской скважины №8008 страна Россия
 Кировская область, г. Киров, д. Сергеевы
4. **Для продукции:**
 Дата изготовления 02.11.2017
 Номер партии -
 Объем партии 90000 л
 Упаковка -
5. **Время и дата отбора:** 02.11.2017 08 ч. 30 мин.
 Должность и Ф.И.О. лица, Заместитель директора (ИП Зонов В.В.) Головин В.Е.
 проводившего отбор:
- Условия доставки: -
 Время и дата доставки в ИЛЦ: 02.11.2017 10 ч. 30 мин.
 Количество(объем) для испытаний 2 л
 для контрольных образцов
6. **Цель отбора** договор № 3203-А от 13.03.2012
7. **Дополнительные сведения**
8. **НД на продукцию:**
 ТУ 0131-003-61600719-13
9. **НД, устанавливающие требования к объекту исследований (испытаний):**
 СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества"
10. **Код образца (пробы):** 46953-05-01-Б,С-1.1-2017

Вода питьевая артезианская "Ключ здоровья"
 Код образца (пробы): 46953-05-01-Б.С-1.1-2017

I. САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дата начала исследования: 02.11.2017 Дата окончания исследования: 03.11.2017

№ п/п	Определяемые показатели	Единица измерения	Результат исследования ± погрешность измерения	Величина допустимого уровня	НД на метод исследования
1	Привкус	баллы	0	Не допускается	ГОСТ 3351-74 (п. 3)
2	Запах при 20 °С	баллы	0	Не допускается	ГОСТ 3351-74 (п. 2)
3	Запах при 60 °С	баллы	0	не более 1	ГОСТ 3351-74 (п. 2)
4	Цветность	град.	менее 1	не более 5	ГОСТ 31868-2012 (метод Б)
5	Мутность	ЕМФ	менее 1	не более 1	ПНД Ф 14.1.2:4.213-05
6	рН	единицы рН	7,6 ± 0,2	от 6,5 до 8,5	ПНД Ф 14.1:2:3:4.121-97
7	Окисляемость перманганатная	мгО2/л	0,41 ± 0,08	не более 3	ПНД Ф 14.1:2:4.154-99

Исследования проводили:

Должность	Ф.И.О	Подпись
Старший химик-эксперт	Сунцова Г.М.	
Заведующий санитарно-гигиенической лабораторией	С.В. Шашина	

II. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дата начала исследования: 02.11.2017 Дата окончания исследования: 07.11.2017

№ п/п	Определяемые показатели	Единица измерения	Результаты исследований	Величина допустимого уровня	НД на методы исследования
1	Общее микробное число (22 °С)	КОЕ в 1 мл	Не обнаружено	не более 100	МУ 2.1.4.1184-03
2	Глюкозоположительные колиформные бактерии	КОЕ в 100 мл	Не обнаружено	Не допускается в 300 мл	МУ 2.1.4.1184-03
3	Общие колиформные бактерии	КОЕ в 100 мл	Не обнаружено	Не допускается в 300 мл	МУ 2.1.4.1184-03
4	Общее микробное число (37 °С)	КОЕ в 1 мл	Не обнаружено	не более 20	МУ 2.1.4.1184-03
5	<i>P.aeruginosa</i>		Не обнаружено	Не допускается в 1000 мл	МУ 2.1.4.1184-03

Исследования проводили:

Должность	Ф.И.О	Подпись
Врач-бактериолог	Ямбасова Г.М.	
Заведующий бактериологической лабораторией	Л.А. Севастьянова	

Ответственный за оформление протокола:

Ведущий инженер отделения по отбору приему проб и выдаче протоколов Савиных В.В.

Примечание:

1. Результаты испытаний относятся только к образцам, прошедшим испытание.
2. Полная или частичная перепечатка, копирование протокола без письменного разрешения ИЛЦ ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области" не допускается. Разрешение подтверждается подписью руководителя ИЛЦ ФБУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области" или его заместителя и печатью с указанием даты выдачи копии.

Протокол составлен в двух экземплярах

Соотношение массовых концентраций и количества вещества
фосфат-анионов и пирофосфат-анионов в растворах для
биотестирования с помощью низших ракообразных *D. magna* и *C. affinis*

Количество вещества в расчете на фосфат-анионы и пирофосфат-анионы	Массовая концентрация фосфата натрия, г/дм ³	Массовая концентрация пирофосфата натрия, г/дм ³
$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,55
$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,35	0,45
$0,8 \cdot 10^{-3}$	0,30	0,32
$0,7 \cdot 10^{-3}$	0,27	0,3
$0,69 \cdot 10^{-3}$	0,25	0,31
$0,6 \cdot 10^{-3}$	0,23	0,27
$0,55 \cdot 10^{-3}$	0,20	0,245
$0,4 \cdot 10^{-3}$	0,15	0,18
$0,3 \cdot 10^{-3}$	0,10	0,13

Соотношение массовых концентраций и количества вещества фосфат-анионов и пирофосфат-анионов в растворах для биотестирования с помощью микроорганизмов *E. coli* и *P. caudatum*

Количество вещества в расчете на фосфат-анионы и пирофосфат-анионы	Массовая концентрация фосфата натрия, г/дм ³	Массовая концентрация пирофосфата натрия, г/дм ³
$5,3 \cdot 10^{-5}$	0,02	0,023
$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,019	0,022
$4,7 \cdot 10^{-5}$	0,018	0,021
$4,5 \cdot 10^{-5}$	0,017	0,019
$4,2 \cdot 10^{-5}$	0,016	0,018
$3,9 \cdot 10^{-5}$	0,015	0,017
$3,7 \cdot 10^{-5}$	0,014	0,016
$3,4 \cdot 10^{-5}$	0,013	0,015
$3,2 \cdot 10^{-5}$	0,012	0,0145
$2,9 \cdot 10^{-5}$	0,011	0,013
$2,6 \cdot 10^{-5}$	0,010	0,011

Внешний вид полевых опытных площадей и проб почв для анализа в эксперименте «Чувствительность биотестов к минеральным формам фосфора»



Опросные листы для сотрудников лабораторий биотестирования
«Проблемы и особенности биотестирования»

Опросный лист «Проблемы и особенности биотестирования». Часть 1.

1. Название Лаборатории, в которой Вы работаете.
2. Лаборатория является аккредитованной или аттестованной?
3. Реализуются ли в Вашей Лаборатории методы биотестирования?
4. Имеется ли в Лаборатории климатостат для тест-организмов?
5. Какие тест-организмы Вам известны?
6. Какие тест-организмы используются в Вашей Лаборатории?
7. Какой тест-организм Вы назвали бы базовым (основным) для определения токсичности водных сред?
8. Бывают ли проблемные ситуации при культивировании в Лаборатории тест-организмов? (да/нет)
9. Вы или сотрудники в Вашей Лаборатории когда-нибудь меняли культуру тест-организмов?
10. Если на предыдущий вопрос Вы ответили «да», укажите культуру (ы), которую приходилось менять.

Анкету заполнил _____

Опросный лист «Проблемы и особенности биотестирования». Часть 2.

1. При какой фактической плотности посадки Вы содержите *Daphnia magna*, чтобы Вам это было удобно, и плодовитость культуры удовлетворяла потребностям Лаборатории? (например, 10 шт./300 мл воды).
2. Какую культивационную воду Вы используете для *Daphnia magna*? (поверхностная, подземная, водный объект для забора воды)

3. Проводите ли Вы контроль чувствительности *Daphnia magna* к модельному токсиканту раз в квартал? (да/нет)

4. Если да, то встречались ли Вам случаи, когда чувствительность *Daphnia magna* не соответствует требуемому диапазону? (да/нет)

5. Встречались ли Вам случаи, когда результаты параллельных испытаний (повторности опыта) не удовлетворяют требованиям приемлемости результатов? (да/нет)

6. Как долго Вы содержите синхронизированную культуру *Daphnia magna* (от момента посадки группы особей в емкость для культивирования до смены «старых» особей новыми)?

7. Замечали ли Вы какие-либо ответные реакции *Daphnia magna* кроме смертности и изменения плодовитости, которые не отмечаются в рабочих журналах и протоколах испытаний в соответствии с используемой методикой?

8. Замечали ли Вы сезонные колебания состояния рачков *Daphnia magna*? (да/нет, если да, то наиболее проблемный сезон - _____).

9. Отметьте проблемы, которые встречались Вам при культивировании *Daphnia magna* Straus

+/-	Проблема культивирования
	Стабильное снижение плодовитости синхронизированной и маточной культур
	Периодическое (сезонное) снижение плодовитости культуры
	Морфо-физиологические отклонения у дафний в культуре (уменьшение размеров тела, бледность покровов, розовая или красноватая окраска, движения только у поверхности сосуда, движения только у дна сосуда, иное)
	Регулярное наличие абортивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры
	Периодическое наличие абортивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры
	Снижение пищевой активности рачков в культуре, диагностируемое по появлению зеленого осадка при одинаковом ежедневном объеме кормления
	Гибель молоди в культуре
	Массовая гибель взрослых особей в культуре
	Появление самцов

10. Отметьте проблемы, которые встречались Вам при проведении экспериментов с *Daphnia magna* Straus

+/-	Проблема, проявляющаяся в эксперименте
	Смертность контрольных особей выше 10%
	Появление первой молодежи в контроле при определении хронического токсического действия позднее 12 суток со дня начала эксперимента
	Морфо-физиологические отклонения у дафний в контроле (уменьшение размеров тела, бледность покровов, розовая или красноватая окраска, движения только у поверхности сосуда, движения только у дна сосуда, иное)
	Появление abortивных яиц в хроническом эксперименте
	Стабильное (долговременное) снижение плодовитости контрольных особей относительно условной лабораторной нормы
	Сезонное снижение плодовитости контрольных особей относительно условной лабораторной нормы
	Снижение пищевой активности рачков в контроле, диагностируемое по появлению зеленого осадка при одинаковом ежедневном объеме кормления

20. Отметьте проблемы культивирования тест-организмов, которые не затронуты в этом опросном листе.

Анкету заполнил _____

Обобщение ответов на опросные листы для сотрудников лабораторий
биотестирования

Часть 1.

№ п/п	Вопрос	Ответы
1	Название Лаборатории, в которой Вы работаете	<ul style="list-style-type: none"> - Лаборатория экотоксикологического анализа почв факультета почвоведения МГУ (г. Москва); - Лаборатория биотестирования ФГБОУ ВО «Поволжский государственный технологический университет» (г. Йошкар-Ола) - Лаборатория биотестирования и биомониторинга РЦ СГЭКиМ по Курганской области (г. Курган) - Филиал ФГБУ «Центр лабораторного анализа и технических измерений по Приволжскому федеральному округу» (г. Нижний Новгород); - Лаборатория охраны окружающей среды ООО «ГалоПолимер Кирово-Чепецк» (г. Кирово-Чепецк); - гидробиологическая лаборатория Омутнинского металлургического завода (г. Омутнинск); - Экологическая лаборатория ОАО «Кировского завода обработки цветных металлов» (г. Киров); - Лаборатория биомониторинга и биотестирования Регионального центра государственного экологического контроля и мониторинга по Кировской области (г. Киров); - СИАК КОГБУ «Областной природоохранный центр» (г. Киров); - Научно-исследовательская экоаналитическая лаборатория ВятГУ (г. Киров);
2	Лаборатория является аккредитованной или аттестованной?	9/10 – аккредитованные 1 – аттестованная
3	Реализуются ли в Вашей Лаборатории методы биотестирования?	10/10 – реализуются
4	Имеется ли в Лаборатории климатостат для тест-организмов?	9/10 - имеется
5	Какие тест-организмы Вам известны?	Приведены различные виды микроорганизмов, одноклеточных водорослей, простейших, моллюсков, низших и высших ракообразных, рыб.

6	Какие тест-организмы используются в Вашей Лаборатории?	1 ответ: <i>Daphnia magna</i> 2 ответа: <i>Daphnia magna</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i> 4 ответа: <i>Daphnia magna</i> ; <i>Ceriodaphnia affinis</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i> 1 ответ: <i>Daphnia magna</i> ; <i>Ceriodaphnia affinis</i> , <i>Artemia salina</i> , <i>Paramecium caudatum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Escherichia coli</i> , сперматозоиды быка 1 ответ: <i>Daphnia magna</i> ; <i>Ceriodaphnia affinis</i> , <i>Paramecium caudatum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Poecilia reticulata</i> 1 ответ: <i>Daphnia magna</i> ; <i>Ceriodaphnia affinis</i> , <i>Paramecium caudatum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Poecilia reticulata</i>
7	Какой тест-организм Вы назвали бы базовым (основным) для определения токсичности водных сред?	10/10 - <i>Daphnia magna</i>
8	Бывают ли проблемные ситуации при культивировании в Лаборатории тест-организмов? (да/нет)	9/10 – да 1/10 – нет
9	Вы или сотрудники в Вашей Лаборатории когда-нибудь меняли культуру тест-организмов?	9/10 – да 2/10- нет
10	если да, то укажите вид организма	5/10 - <i>Daphnia magna</i> 2/10 - <i>Daphnia magna</i> ; <i>Ceriodaphnia affinis</i> 1/10 - <i>Paramecium caudatum</i>

Часть 2

№ п/п	Вопрос	Ответы
1	При какой фактической плотности посадки Вы содержите <i>Daphnia magna</i> , чтобы Вам это было удобно, и плодовитость культуры удовлетворяла потребностям Лаборатории?	5 ответов: 20-25 шт./1000 мл воды 2 ответа: 10 шт./300 мл воды 1 ответ: 17 шт./1000 мл воды 1 ответ: 25-30 шт./1000 мл воды 1 ответ: 30 шт./1000 мл воды

2	Какую культивационную воду Вы используете для <i>Daphnia magna</i> ?	6 ответов: поверхностная 3 ответа: подземная 1 ответ: смесь подземной с водопроводной 1 ответ: водопроводная биологизированная	
3	Проводите ли Вы контроль чувствительности <i>Daphnia magna</i> к модельному токсиканту раз в квартал? (да/нет)	10/10 - да	
4	Если да, то встречались ли Вам случаи, когда чувствительность <i>Daphnia magna</i> не соответствует требуемому диапазону? (да/нет)	9/10 – да 1/10 – нет	
5	Встречались ли Вам случаи, когда результаты параллельных испытаний (повторности опыта) не удовлетворяют требованиям приемлемости результатов? (да/нет)	8/10 – да 2/10 – нет	
6	Как долго Вы содержите синхронизированную культуру <i>Daphnia magna</i> (от момента посадки группы особей в емкость для культивирования до смены «старых» особей новыми)?	5 ответов: 30 дней 2 ответа: 45 дней 1 ответ: 60 дней 1 ответ: 90 дней 1 ответ: затрудняюсь ответить	
7	Замечали ли Вы какие-либо ответные реакции <i>Daphnia magna</i> кроме смертности и изменения плодовитости, которые не отмечаются в рабочих журналах и протоколах испытаний в соответствии с используемой методикой?	6/10 – нет 4/10 – да	
8	Замечали ли Вы сезонные колебания состояния рачков <i>Daphnia magna</i> ? (да/нет, если да, то наиболее проблемный сезон)	6/10 – нет 4/10 – да При ответе «да» 2 лаборатории наиболее «проблемным» сезоном назвали зиму, 2 лаборатории весну и осень.	
9	Отметьте проблемы, которые встречались Вам при культивировании <i>Daphnia magna</i> Straus	- Стабильное снижение плодовитости синхронизированной и маточной культур - Периодическое (сезонное) снижение плодовитости культуры	0/10 9/10

		<ul style="list-style-type: none"> - Морфо-физиологические отклонения у дафний в культуре (уменьшение размеров тела, бледность покровов, розовая или красноватая окраска, движения только у поверхности сосуда, движения только у дна сосуда, иное) - Регулярное наличие abortивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры - Периодическое наличие abortивных яиц, отмечаемое при отмывании культуры - Снижение пищевой активности рачков в культуре, диагностируемое по появлению зеленого осадка при одинаковом ежедневном объеме кормления; - Гибель молоди в культуре - Массовая гибель взрослых особей в культуре - Появление самцов 	<p>9/10</p> <p>1/10</p> <p>5/10</p> <p>6/10</p> <p>2/10</p> <p>1/10</p> <p>1/10</p>
10	Отметьте проблемы, которые встречались Вам при проведении экспериментов с <i>Daphnia magna</i> Straus	<ul style="list-style-type: none"> - Смертность контрольных особей выше 10% - Появление первой молоди в контроле при определении хронического токсического действия позднее 12 суток со дня начала эксперимента - Морфо-физиологические отклонения у дафний в контроле (уменьшение размеров тела, бледность покровов, розовая или красноватая окраска, движения только у поверхности сосуда, движения только у дна сосуда, иное) - Появление abortивных яиц в хроническом эксперименте - Стабильное (долговременное) снижение плодовитости контрольных особей относительно условной лабораторной нормы - Сезонное снижение плодовитости контрольных особей относительно условной лабораторной нормы - Снижение пищевой активности рачков в контроле, диагностируемое по появлению зеленого осадка при одинаковом ежедневном объеме кормления 	<p>5/10</p> <p>3/10</p> <p>4/10</p> <p>3/10</p> <p>1/10</p> <p>1/10</p> <p>6/10</p>
11	Отметьте проблемы культивирования тест-организмов, которые не затронуты в этом опросном листе	<p>4/10 предоставили ответы:</p> <ul style="list-style-type: none"> - появление гриба аспергилла в климатостате, вследствие чего гибнет культура <i>Daphnia magna</i> - появление в емкостях для биологизации воды нитей сине-зеленых водорослей, которые в некоторых случаях приводят к гибели дафний в контрольных вариантах - колебания качества культивационной воды, что сказывается на состоянии тест-организмов - реакции низших ракообразных на кормление хлебопекарными дрожжами разных марок (подозрение на добавку консервантов) 	

Форма протокола регистрации результатов биотестирования по системе
последовательной оценки спектра тест-функций *D. magna*

1. Тест-функция «гибель». Экспозиция 96 часов.

Определение острой токсичности
пробы без разбавления / концентрированного тестируемого раствора
(нужное подчеркнуть)

Вариант	Экспозиция, часы / количество живых особей, шт.							A*, %
	1	2	3	4	24	72	96	
Контроль								
Наименование пробы								

Примечание: A – смертность, %

Рекомендуемая БКР: _____ раз.

Использованная кратность разбавления: _____ раз.

Определение острой токсичности
пробы с разбавлениями / разбавленного тестируемого раствора
по гибели *D. magna*
(нужное подчеркнуть)

Вариант	Экспозиция, часы / количество живых особей, шт.							A, %
	1	2	3	4	24	72	96	
Контроль								
Наименование пробы								
Наименование пробы								

Заключение № 1: проба «_____»
оказывает/не оказывает острое токсическое действие, при разбавлении пробы
в _____ раз острого токсического действия не наблюдается.

2. Тест-функция «двигательная активность». Экспозиция 96 часов.

Определение предлетальной токсичности пробы без разбавления / пробы с разбавлением
по двигательной активности *D. magna* (нужное подчеркнуть)

Вариант	Экспозиция, часов / двигательная активность, к.п.л. *		
	3	24	96
Контроль	$M \pm S$	$M \pm S$	$M \pm S$
Наименование пробы	$M \pm S$	$M \pm S$	$M \pm S$
Наименование пробы	$M \pm S$	$M \pm S$	$M \pm S$

Примечание: здесь и далее M – среднее арифметическое учитываемого показателя,
 S – среднеквадратическое отклонение оцениваемых значений; * отмечается достоверное
отклонение от контроля, значение без * - отличия по сравнению с контролем не
достоверны, $p < 0,05$.

Заключение №2: проба «_____» относится к _____ группе токсичности по двигательной активности – проба _____ (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

3. Тест-функция «трофическая активность». Экспозиция 5 суток.

Определение предлетальной токсичности пробы без разбавления / пробы с разбавлением по трофической активности *D. magna* (нужное подчеркнуть)

Вариант	Оптическая плотность водной среды	Относительная оптическая плотность, % к контролю	Снижение трофической активности, раз	Группа токсичности
Контроль	$M \pm S$			
Наименование пробы	$M \pm S$			
Наименование пробы	$M \pm S$			

Заклучение № 3: проба _____ обладают _____ по показателю угнетения трофической активности *D. magna* (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

4. Тест-функция «Задержка/стимуляция созревания особей». Экспозиция 5-10 суток.

Определение времени массового появления выводковых камер у *D. magna*

Вариант	Время появления выводковых камер, сут.	Сдвиг созревания, сут.	Группа токсичности
Контроль			
Наименование пробы			
Наименование пробы			

Заклучение №4: проба _____ обладает _____ (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

5. Тест-функция «линейные размеры тела». Экспозиция 10 и 25 суток. Показатели линейных размеров *D. magna*

Вариант	Экспозиция, сут. / линейные размеры тела, мм		Группа токсичности
	10	24	
Контроль	-	$M \pm S$	-
Наименование пробы	не отмечено/ не отмечено	$M \pm S$	
Наименование пробы	не отмечено/ не отмечено	$M \pm S$	

Примечание: * отмечается достоверное отклонение от контроля, значение без * - отличия по сравнению с контролем не достоверны, $p < 0,05$.

Заключение №5: проба _____ не обладают/обладает _____ (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

6. Тест-функция «пигментация». Экспозиция 10 суток и 25 дней.

Определение отличий в пигментации тела опытных особей *D. magna* и контрольных

Вариант	Экспозиция, сут. / отметка о наличии нарушения пигментации		Группа токсичности
	10	24	
Контроль	-	-	-
Наименование пробы	отмечено/ не отмечено	не отмечено / отмечено (укажите конкретный признак)	
Наименование пробы	отмечен/ не отмечено	не отмечено / отмечено (укажите конкретный признак)	

Заключение №6: проба _____ обладает/не обладает (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

7. Тест-функция «задержка/стимуляция первого появления молодежи». Экспозиция 7-12 дней.

Определение времени первого появления молодежи у *D. magna*

Вариант	Время появления первой молодежи, сут.	Сдвиг созревания, сут.	Группа токсичности
Контроль			
Наименование пробы			
Наименование пробы			

Заклучение №7: проба _____ не обладает / обладает (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

8. Тест-функция «качество молодежи». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольных и опытных пробах.

Морфологические отклонения у молодежи контрольных и опытных групп *D. magna*

Вариант	Диагностический признак				Группа токсичности
	Деформация раковины	Деформация задней иглы	Отсутствие щетинок	Мертвая молодежь	
Контроль	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	-
Наименование пробы	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	
Наименование пробы	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	отмечено/ не отмечено	

Закключение №8: проба _____ обладают/не обладает (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

9. Тест-функция «плодовитость». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольных и опытных пробах.

Плодовитость *D. magna*

Вариант	Плодовитость, количество особей на 1 взрослую самку		Количество молоди за весь жизненный цикл, шт.	Количество молоди за весь жизненный цикл, % от контроля	Группа токсичности
	1 – 25 сутки	26 – 50 сутки			
Контроль	$M \pm S$	$M \pm S$	$M \pm S$	-	
Наименование пробы	$M \pm S$	$M \pm S$	$M \pm S$		
Наименование пробы	$M \pm S$	$M \pm S$	$M \pm S$		

Примечание: * отмечается достоверное отклонение от контроля, значение без * - отличия по сравнению с контролем не достоверны, $p < 0,05$.

Закключение №9: проба _____ обладают/не обладает (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

10. Тест-функция «доля abortивных яиц от общего числа потомства». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольных и опытных пробах.

Учет abortивных яиц *D. magna*

Вариант	Количество abortивных яиц за весь жизненный цикл, шт.	Доля abortивных яиц от общего числа молоди, %	Группа токсичности
Контроль	0	-	-
Наименование пробы	$M \pm S$		
Наименование пробы	$M \pm S$		

Закключение №10: проба _____ обладает / не обладают (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

11. Тест-функции «продолжительность жизни». Экспозиция – весь период жизни *D. magna* в контрольных и опытных пробах.

Учет продолжительности жизни *D. magna*

Вариант	Средняя продолжительность жизни, сут.	Снижение/увеличение продолжительности жизни, % от контрольного значения	Группа токсичности
Контроль	$M \pm S$		
Наименование пробы	$M \pm S$		
Наименование пробы	$M \pm S$		

Примечание: отрицательные значения означают снижение продолжительности жизни на указанную величину относительно контрольных значений; положительные значения – увеличение продолжительности жизни на указанную величину относительно контрольных значений.

Заключение № 11: проба _____ обладает / не обладает (см. формулировки в «порядке проведения исследований») по тест-функции «продолжительность жизни».

12. Тест-функция «смертность в поколениях F2 и F3». Экспозиция – 25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколений F2 и F3.

Учет смертности в поколениях F2 и F3 *D. magna*

Вариант	Смертность, %	Группа токсичности
Контроль	F2	-
	F3	-
Наименование пробы	F2	
	F3	
Наименование пробы	F2	
	F3	

Заключение № 12: проба _____ обладает / не обладает отсроченным летальным токсическим действием в поколении _____ *D. magna* ((см. формулировки в «порядке проведения исследований»)).

13. Тест-функция «плодовитость в поколениях F2 и F3». Экспозиция – 25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколений F2 и F3.

Учет плодовитости в поколениях F2 и F3 *D. magna*

Вариант	Плодовитость, %	Группа токсичности
Контроль	F2	$M \pm S$
	F3	$M \pm S$
Наименование пробы	F2	$M \pm S$
	F3	$M \pm S$
Наименование пробы	F2	$M \pm S$
	F3	$M \pm S$

Примечание: * отмечается достоверное отклонение от контроля, значение без * - отличия по сравнению с контролем не достоверны, $p < 0,05$.

Заключение №13: проба _____ обладает / не обладает отсроченным токсическим действием в поколении (-ях) _____ *D. magna* по тест-функции плодовитость (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

14. Тест-функция «доля абортивных яиц от общего числа потомства в поколениях F2 и F3». Экспозиция – 25 суток с момента продолжения эксперимента с особями поколений F2 и F3.

Учет абортивных яиц *D. magna*

Вариант		Количество абортивных яиц за 25 дней, шт.	Доля абортивных яиц от общего числа молоди, %	Группа токсичности
Контроль	F2	$M \pm S$	-	-
	F3	$M \pm S$	-	-
Наименование пробы	F2	$M \pm S$		
	F3	$M \pm S$		
Наименование пробы	F2	$M \pm S$		
	F3	$M \pm S$		

Заключение №14: проба _____ обладает / не обладают отсроченным эмбриотоксическим токсическим действием в поколении (-ях) _____ для *D. magna* по тест-функции плодовитость (см. формулировки в «порядке проведения исследований»).

Итоговое заключение о токсичности пробы (проб – в случае если речь идет о последовательных разбавлениях одной пробы) _____ :

Перечисляются установленные эффекты, прогнозы, сделанные в ходе эксперимента и отмечается реализация прогнозов.

Визуальная диагностика некоторых отклонений здоровья культуры *D. magna*



Внешний вид яловых самок с бледными (слева) и окрашенными покровами (справа)



Внешний вид дафнии с желто-коричневой окраской – норма (слева).
Внешний вид дафнии с красной окраской – признак кислородного голодания (справа).



Появление abortивных яиц в культуре *D. magna*

Акты апробации и внедрения результатов работы

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник

специализированной

инспекции аналитического

контроля

КОГБУ «Областной

природоохранный центр»

Э.Ю. Перминова

«18» сентября 2019 г.**АКТ АПРОБАЦИИ И ВНЕДРЕНИЯ**

На базе специализированной инспекции аналитического контроля КОГБУ «Областной природоохранный центр» экологом 1 категории СИАК Репиной Ириной Львовной апробированы и внедрены следующие результаты научных работ канд. техн. наук, доцента Вятского государственного университета Ольковой Анны Сергеевны:

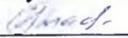
– контроль здоровья тест-культуры *Daphnia magna* Straus и ее пригодности для целей биотестирования по дополнительным параметрам (относительно методики ФР.1.39.2007.03222): время созревания особей, время появления первой молодежи рачков, удельная плодовитость особей, средняя продолжительность жизни, максимальная продолжительность жизни, коэффициент суточного прироста смертности;

– комплексный учет колебаний химического состава культивационной воды и сезонных биоритмов тест-культуры *D. magna* при организации ее лабораторного содержания;

– метод оценки токсичности водной среды по двигательной активности *D. magna*, позволяющий прогнозировать безвредную кратность разбавления токсичных проб.

Перечисленные научные результаты способствуют совершенствованию системы контроля качества работ по биотестированию.

Репина И.Л., эколог 1 категории СИАК
КОГБУ «Областной природоохранный центр»

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник Испытательного
центра АО «Кировские
коммунальные системы»
 Н.С. Власова
« 14 » мая 2019 г.

АКТ АПРОБАЦИИ И ВНЕДРЕНИЯ

На базе Испытательного центра АО «Кировские коммунальные системы», Сарканич Натальей Васильевной апробированы и внедрены следующие научные подходы для оптимизации процедур биотестирования, разработанные канд. техн. наук, доцентом Вятского государственного университета Ольковой Анной Сергеевной:

– прогнозирование степени токсичности и безвредной кратности разбавления водных сред по результатам изменения двигательной активности *Daphnia magna* Straus в тестируемой среде;

– системный подход планирования и проведения внутреннего контроля качества работ отделения биотестирования, включающий: контроль качества химического состава культивационных вод, учет сезонных изменений химического состава культивационных вод, учет сезонных биоритмов тест-организмов, оперативную оценку пригодности тест-культуры *Daphnia magna* Straus по времени созревания особей и появлению первой молоди, дополнительный контроль здоровья культуры *Daphnia magna* Straus по параметрам удельной плодовитости особей, средней продолжительности жизни, максимальной продолжительности жизни, коэффициента суточного прироста смертности.

Перечисленные научные результаты позволили усовершенствовать систему контроля качества работ по биотестированию.

Сарканич Н.В., заместитель начальника
Испытательного центра
АО «Кировские коммунальные системы»



УТВЕРЖДАЮ



Начальник Испытательной лаборатории
по Кировской области филиала
«ЦЛАТИ по Кировской области»
ФГБУ «ЦЛАТИ по ПФО»
Е.А.Суслопарова
» 11 2019 г.

АКТ АПРОБАЦИИ И ВНЕДРЕНИЯ

На базе Испытательной лаборатории по Кировской области филиала «ЦЛАТИ по Кировской области» ФГБУ «ЦЛАТИ по ПФО» ведущим инженером сектора контроля почв, отходов и донных отложений Пересторопиной Людмилой Витальевной апробированы и внедрены следующие результаты научной работы канд. техн. наук, доцента Вятского государственного университета Ольковой Анны Сергеевны:

– наблюдение за здоровьем культуры *Daphnia magna* Straus по качественным признакам согласно «Опорной схеме визуальных признаков здоровой и угнетенной культур»;

– наблюдение за здоровьем культуры *D. magna* по количественным признакам. Параметры «день появления первой молодежи» и «день первого массового приплода» использовали в качестве оперативных критериев пригодности культуры к биотестированию. Параметры средней и максимальной продолжительностей жизни особей, удельной плодовитости за полный жизненный цикл рачков, коэффициента суточного прироста смертности использовали для дополнительной оценки здоровья тест-культуры *D. magna*;

– сочетание контроля стабильности химического состава воды с регулярными процедурами контроля здоровья тест-культур для прогноза снижения качества культуры *D. magna*.

Настоящим актом подтверждаем эффективность подходов, предложенных А.С. Ольковой, для оптимизации процессов биотестирования, в частности оценки пригодности тест-культуры *D. magna* для биотестирования.

Начальник сектора контроля
почв, отходов и донных отложений Шубина Г.В. Шубина Г.В.

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий лабораторией
физиологии и токсикологии водных
животных

ФГБУН Института биологии внутренних вод
им. И.Д. Павловского РАН, д.б.н.

Г. М. Чуйко

« 20.06.2018 г.

АКТ

апробации и внедрения
результатов исследования кандидата технических наук, доцента
Анны Сергеевны Ольковой

№ п/п	Параметр	Расшифровка параметра
1	Наименование исследования автора	Оценка токсичности природных и техногенных сред по двигательной активности <i>Daphnia magna</i>
2	Вид исследования	Разработка и апробация метода биотестирования
3	Место издания результатов исследования (с выходящими данными)	Олькова А.С., Салинкова Е.А., Булина Д.В., Кутявина Т.И., Зимонова Н.М. Оценка токсичности природных и техногенных сред по двигательной активности <i>Daphnia magna</i> // <i>Современные проблемы науки и образования</i> – 2017. – № 3.; URL: https://www.science-education.ru/ru/article/ (дата обращения: 05.06.2017)
4	Наименование работ с включением апробируемого и внедряемого метода	1. Оценка качества водорастворяемых соединений, ассоциированных с донными отложениями, по двигательной активности <i>Daphnia magna</i> (на примере донных отложений р. Карлутка г. Ижевск, Удмуртская Республика) 2. Влияние наночастиц SeO_2 на двигательную активность <i>Daphnia magna</i>
5	Период отработки и внедрения метода на реальных пробах	25.06-13.07.2018
6	Вид проб для отработки и внедрения метода биотестирования	1. Водная суспензия наночастиц SeO_2 2. Полная вытяжка нативных донных отложений
7	Количество проб	9

Заключение: на основании выполненных испытаний и научно-исследовательских работ считать «Метод оценки токсичности природных и техногенных сред по двигательной активности *Daphnia magna*» апробированным и внедренным на базе лаборатории физиологии и токсикологии водных животных ФГБУН Института биологии внутренних вод им. И.Д. Павловского РАН с получением положительного отзыва.

В качестве рекомендаций для авторов с целью уменьшения погрешностей непосредственного прямого счета количества пересеченных линий *Daphnia magna* и ускорения данного процесса необходимо внедрение программы автоматического счета.

Томкина И.И., к.б.н., в.н.с.,
лаборатория физиологии и токсикологии
водных животных ИИВ РАН

Ложкина Р.А., к.б.н., в.н.с.,
лаборатория физиологии и токсикологии
водных животных ИИВ РАН



**АКТ ВНЕДРЕНИЯ
РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ**

Сотрудниками испытательной канализационной химико-бактериологической лаборатории (г. Волгоград) внедрена система организационных приемов и мер, направленная на оптимизацию процессов биотестирования в специализированных лабораториях.

Автор разработок: кандидат технических наук, доцент Вятского государственного университета (г. Киров) Олькова Анна Сергеевна.

Краткое описание содержания научных разработок: стандартизация культивирования тест-организмов и условий проведения биотестов, влияние культивационной воды на ответные реакции тест-организмов, колебания чувствительности тест-организмов к модельным токсикантам, установление зависимости доза-эффект при биотестировании модельных и негативных сред, интерпретация явлений стимуляции тест-функций живых организмов.

Область применения разработок: улучшение системы менеджмента качества работ и анализов лаборатории биотестирования.

Начальник лаборатории

О.Е. Николова

