

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ольковой Анны Сергеевны на тему «Разработка стратегии биотестирования водных сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности
03.02.08 – Экология (биология)

Актуальность диссертационного исследования Ольковой А.С. не вызывает сомнений, поскольку существует проблема адекватной оценки загрязнений окружающей среды соединениями техногенного происхождения. Решение этой проблемы требует развития и применения методов, направленных на обнаружение отдельных химических веществ и их смесей в окружающей среде, оценку их опасности и влияния на живые системы разного уровня, обоснование проведения природоохранных мероприятий.

В настоящее время известны сотни методик биотестирования, десятки из них допущены для целей государственного экологического контроля и мониторинга или аналогичных процедур во многих странах мира. Но эта позитивная тенденция имеет и недостатки. Многообразие методик ставит перед исследователями вопрос их выбора в условиях конкретных практических задач. Широкое применение в практике экологических исследований методов определения качества окружающей среды с помощью биотестовых систем сдерживается из-за отсутствия научно-обоснованных критериев для использования тех или иных биологических объектов в реакциях биотестирования, комплексной оценки их чувствительности к приоритетным экотоксикантам. Не разработаны технологические режимы выращивания многих тестовых микроорганизмов, как объектов длительного культивирования; нет научной основы, доказывающей правомочность их использования для оценки токсичности объектов окружающей среды и класса опасности отходов экспериментальным методом.

Безусловными преимуществами методов биотестирования, основанных на применении одноклеточных организмов в качестве тест-объектов, по мнению многих авторов, является их простота, низкая себестоимость проведения анализов и большая экспрессность. Несмотря на распространенность и востребованность методов биотестирования в охране окружающей среды, у этой группы методов остаются нерешенные научно-методологические проблемы. Во-первых, из-за недостаточности экспериментальных данных, свидетельствующих о высокой чувствительности биотестов к определенным экотоксикантам. Во-вторых, из-за отсутствия научно-теоретического обоснования возможности экстраполяции и частичного переноса экспериментальных данных, полученных в реакциях биотестирования с использованием одноклеточных организмов, на представителей флоры и фауны более высокого филогенетического уровня.

В этой связи цель диссертационной 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 – отражает актуальность решения методологических проблем биотестирования, направленных на получение достоверных и экологически значимых результатов, позволяющих адекватно оценивать воздействие экотоксикантов на объекты окружающей среды.

Общая характеристика работы. Диссертация изложена на 265 страницах основного текста, с учетом 10 приложений общий объем составил 358 страниц, включая 60 таблиц и 23 рисунка. В работе представлено введение, 3 главы собственных исследований, в том числе обзор литературы и описание материалов и методов, заключение и выводы. В списке литературы 419 источников, в том числе 147 на иностранных языках.

В первой главе «Биотестирование в охране окружающей среды» обобщены и систематизированы современные научные данные о биотестировании. Ольковой А.С. проведен детальный анализ баз научных публикаций, диссертационных исследований, методических работ, материалов специализированных конференций, что позволило ей сформулировать тенденции развития методологии биотестирования. Отмечено, что многими разработчиками апробируются и внедряются биотесты с использованием новых организмов, которые не всегда доступны широкому кругу исследователей; разработка специализированного оборудования для биотестирования и его автоматизация открывает новые возможности, но современные приборы (весьма дорогостоящие) должны быть включены в федеральный реестр оборудования.

Большой интерес представляет анализ данных о направлениях исследований в области биотестирования в Российской Федерации и мире. Приведены работы многих авторов отечественных школ, в том числе по такому важному направлению развития методологии биотестирования, как интерпретация результатов токсикологического анализа компонентов окружающей среды. Показана повышенная сложность в поиске закономерностей «доза-эффект» и «время-эффект» в условиях реальных экосистем.

Ольковой А.С. доказано, что 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.); не унифицированы условия содержания и культивирования низших ракообразных. Выявлено, что в мировой практике биотестирования применяют различные протоколы испытаний для определения острой и хронической токсичности с помощью *D. magna* и *D. pulex*. Часть методик используется и обсуждается только в научных работах, некоторые протоколы приняты международными организациями по охране окружающей среды. В практике биотестирования

нет единства также в части продолжительности токсикологического эксперимента. Все это приводит к трудностям при сравнении результатов биотестирования, полученным по различным методикам, или с помощью культур низших ракообразных, содержащихся в разных условиях.

Таким образом, Ольковой А.С. убедительно показано, что 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.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов, использованных в процессе выполнения диссертационного исследования. Детально представлены методологические подходы к планированию работы, проведению лабораторных испытаний; методы отбора проб природных вод и почв, в том числе с техногенных объектов: на территориях воздействия объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» (Кировская обл.), в районе комплекса химических предприятий г. Кирово-Чепецка (Кировская обл.), завода «Электроцинк» (г. Владикавказ). Все пробы анализировались современными физико-химическими методами с использованием поверенного оборудования.

В работе представлены оригинальные материалы, собранные в результате многолетних (2006–2019 гг.) лабораторных и полевых экспериментальных исследований автора. Лабораторные опыты выполнены на базе аккредитованной Научно-исследовательской экоаналитической лаборатории Вятского государственного университета (г. Киров).

Автором были использованы стандартные аттестованные и в авторской модификации методы биотестирования на разных тест-объектах одноклеточных организмов модельных образцов и растворов экотоксикантов, водных вытяжек из экспериментально и хронически загрязненных почв минеральными и органическими веществами, с репрезентативной выборкой для адекватной статистической обработки результатов. Математическая обработка данных выполнялась стандартными методами, вычисляя среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (S). Достоверность различий оценивали по t -критерию Стьюдента с учетом уровня значимости (p), рассчитанного для двух сравниваемых значений (в программном продукте Microsoft Excel).

Детальное описание методических подходов и приемов свидетельствует о высокой квалификации автора, как исследователя. Эффективность предложенных методических подходов подтверждена актами лабораторных испытаний, приведенных в приложениях к диссертационной работе.

В третьей главе «Разработка и апробация научно-методологической стратегии биотестирования с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов» представлен комплекс собственных исследований согласно разработанному плану и схеме исследований, логично и обоснованно изложенных в 4-х подглавах и 12 разделах главы.

На первом этапе работы был обоснован целевой выбор биотестов для диагностики установленного основного фактора токсичности. Для этого автором был разработан и апробирован алгоритм предварительного целевого выбора биотестов для экологических исследований.

На основании проведенных исследований предложено проводить диагностику загрязнения по наиболее чувствительному биотесту, устанавливаемому в предварительных испытаниях по разработанному алгоритму, схема которого представлена в диссертации и описана в ряде опубликованных авторских работ.

Ольковой А.С. реализован разработанный алгоритм на группах модельных токсикантов минеральной и органической природы в водной среде. Ею проведена разработка и апробация рядов чувствительности биотестов к минеральным веществам: соединениям тяжелых металлов, азота и фосфора. Построены ряды чувствительности биотестов к тяжелым металлам, к минеральным соединениям азота: моделировалось загрязнение природной воды нитратом натрия, нитритом натрия и хлоридом аммония. Следует отметить, что чувствительность биотестов определялась как в условиях раздельного воздействия на организмы, так и при совместном загрязнении среды нитрат- и нитрит-ионами. По аналогии проведено определение чувствительности биотестов к минеральным соединениям фосфора на модельных токсикантах пирофосфата и фосфата натрия. Это позволило автору решить задачу сравнения токсичности фосфатов и пирофосфатов. Выявленные закономерности подтверждены в условиях полевого опыта. В диссертации приведен итоговый ряд чувствительности биотестов к минеральным соединениям фосфора.

Разработка и апробация рядов чувствительности биотестов к водным средам, содержащим органические вещества, проведена Ольковой А.С. на примере гербицидов на основе производных пиридина (клопиралид и пикорам) и имидазолинонов, нефтепродуктов и фталатов. В отношении исследуемых модельных токсикантов также были построены ряды чувствительности тест-объектов.

При исследовании влияния нефтепродуктов автор моделировала загрязнение дерново-подзолистой почвы, широко представленной в лесной зоне Кировской области, добавкой бензина с параллельным оцениванием свойств торфа и торфогеля для ремедиации почвы после ее загрязнения.

Весьма интересные данные получены при исследовании чувствительности биотестов в оценке безопасности поливинилхлоридных пластикутов. В эксперименте, предваряющем основные исследования, было показано, что из этих пластикутов возможна миграция вредных веществ в контактирующую среду, прежде всего фталатов (солей ортофталевой кислоты). Ольковой А.С. проведено ранжирование чувствительности биотестов к воздействию водных вытяжек из ПВХ пластикутов трех рецептур, содержащих фталаты.

Следует отметить, что представленные в диссертационной работе обобщенные данные могут служить опорным материалом при планировании

экологических исследований на территориях, подверженных действию исследованных ею веществ.

Целевой выбор биотестов был использован Ольковой А.С. и для оценки действия веществ с потенциальным протекторным действием в отношении токсикантов. На четырех модельных одноклеточных организмах – биотестах было показано протекторное действие восстановленного глутатиона и мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов в условиях загрязнения сульфатом меди. Показано, что выявленные ряды чувствительности биотестов соблюдаются при оценке токсичности нативных сред – природных вод и водных вытяжек из почв.

Таким образом, автором на этом этапе работы была обоснована эффективность целевого выбора биотестов с использованием универсального алгоритма биотестирования водной среды, загрязненной минеральными и органическими токсикантами.

Следующий большой раздел работы был посвящен биотестированию водных сред в условиях неустановленного фактора токсичности по реакциям базового тест-организма *D. magna*.

Ольковой А.С. было отмечено, что при неустановленном факторе токсичности важно сочетание оперативных оценок токсичности исследуемых сред и подробное изучение токсических эффектов для прогноза экологических последствий загрязнения. В качестве экспресс-биотеста был предложен модифицированный метод биотестирования по двигательной активности дафний. Для подтверждения экспрессности и информативности биотеста была проведена оценка токсичности модельных растворов с витальными и летальными дозами цинка и меди, водных вытяжек из урбаноземов, антропогенно загрязненных этими металлами и природных вод, пробы которых характеризовались высоким содержанием минеральных соединений азота. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что с помощью тест-функции смертности *D. magna* часто не удается диагностировать токсичность даже в случае высоких уровней загрязнения, что связано с физико-химическими процессами, происходящими в нативных средах.

Ольковой А.С. предложено проводить системное биотестирование по спектру тест-функций *D. magna* для более адекватной оценки экологически значимых последствий загрязнения среды по результатам предлетальных, летальных и отсроченных эффектов действия веществ. Стратегия сочетания экспресс-биотестирования с системной оценкой спектра тест-функций *D. magna* апробирована в работе, и представлена в ряде публикаций в высоко рейтинговых изданиях. Автором описан подробный порядок проведения исследований, включающий ранжирование степени проявления ответных реакций, а также разработана форма протокола регистрации результатов системного биотеста по спектру тест-функций *D. magna*.

Критерий пригодности тест-организмов к биотестированию по чувствительности к модельному токсиканту предложено дополнить периодическим определением показателей здоровья тест-культуры:

продолжительности жизни, способности особей к размножению и связанных с ними параметров. Ольковой А.С. предложено определение «здоровье культуры тест-организмов», обосновано экспериментальное определение количественных параметров здоровья тест-культуры по показателям средней и максимальной продолжительности жизни *D. magna*. В работе убедительно показано, что при длительном культивировании биотеста вследствие изменения химического состава воды происходит изменение чувствительности синхронизированной молодежи тест-культуры, а при повышенном содержании природных солей даже в рамках нормативов происходит снижение чувствительности *D. magna*. В четырехлетнем эксперименте показано, что максимальные различия между показателями LD₅₀ в отношении модельного токсиканта (K₂Cr₂O₄) у *D. magna* наблюдаются зимой и весной с ослаблением культуры в зимний период и нормализацией параметра весной.

На основе проведенных экспериментов Ольковой А.С. разработаны научно обоснованные рекомендации по контролю здоровья тест-культуры на примере *D. magna*, учитывающие факторы влияния культивационной воды и сезона года; предложена схема визуальных признаков здоровых и угнетенных особей. Предложенная стратегия стандартизации тест-культур была апробирована в аккредитованной лаборатории биотестирования, что отражено в соответствующих актах в приложении.

Для внедрения предложенных автором мероприятий в менеджмент качества результатов биотестирования разработана функциональная модель научно-обоснованной стратегии единого процесса планирования и проведения биотестирования, представленная схемой в диссертации.

Таким образом, в диссертационной работе изложено научное обоснование стратегии биотестирования, основанной 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. Применение разработанного автором комплексного менеджмента качества анализов с использованием методов биотестирования, учитывающего многофакторность получения достоверных результатов биотестов, вносит значительный вклад в развитие аспектов прикладной экологии, и является эффективным научным решением в фундаментальной экологии (в области биологических наук).

Научная новизна исследований, полученных результатов и выводов заключается в доказательстве эффективности и перспективности стратегии научно-обоснованного выбора методов биотестирования и использования надежных стандартизированных тест-культур.

Ольковой А.С. проведен сравнительный анализ чувствительности четырех аттестованных методик биотестирования к приоритетным по распространенности и опасности экотоксикантам минеральной и органической природы по унифицированному алгоритму.

Впервые предложена диагностика экологически значимых эффектов при неустановленном факторе токсичности по единому, базовому тест-организму *Daphnia magna* Straus при исследовании спектра откликов.

К приоритетам работы также относится доказательство целесообразности оценки реакций *D. magna* в течение жизненного цикла опытных особей, а также второго и третьего опытных поколений, что позволяет выявлять летальные, сублетальные и отсроченные во времени эффекты токсикантов. Это определяет целесообразность и научную ценность использования стратегии сочетания экспресс-биотестирования и системного биотестирования, предложенного автором.

На основании анализа основных результатов диссертационного исследования Ольковой А.С. впервые показано, что тест-организмы, удовлетворяющие требованиям чувствительности к эталонному токсиканту, могут значительно различаться по другим критериям благополучия, объединенных в понятие «здоровье тест-организмов». Установлены оперативные и пожизненные критерии здоровья *D. magna*, выявлены их качественные и количественные ориентиры.

Безусловным приоритетом работы является доказательство необходимости новой стратегии стандартизации тест-культур и определения их пригодности к биоанализам.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Теоретическое значение работы заключается в систематизации современных научных данных в области биотестирования; в предложении нового определения понятия «методология биотестирования», введении новых понятий – «базовый тест-организм» и «здоровье тест-организмов». Предложенная и апробированная стратегия планирования и проведения исследований с использованием биотестов и с учетом многофакторности их ответных реакций вносит вклад в развитие современной методологии биотестирования.

Практическая значимость результатов работы связана с возможностью получения достоверных и экологически значимых оценок токсичности тестируемых сред в рамках экологического мониторинга территорий при использовании разработанной автором стратегии планирования и проведения биотестирования. Комплекс предложенных методических подходов для практических лабораторий может использоваться для всей группы методов, применяться для любых тест-систем и организмов.

Результаты диссертационного исследования используются при чтении лекций и проведении практических занятий для студентов бакалавриата и магистратуры по профильным дисциплинам направления «Экология и природопользование», что подтверждено актами в приложении.

Материалы диссертационного исследования представлены на многочисленных научных конференциях различного ранга. По теме диссертации опубликовано 95 работ, из них 29 научных статей в рецензируемых журналах из списка рекомендованных ВАК РФ, 9 статей,

входящих в международные базы научного цитирования Scopus и Web of Science, 1 патент, 3 учебно-методические работы, 53 публикации в материалах международных и всероссийских конференций.

Содержание автореферата соответствует основным результатам, изложенным достаточно полно в диссертационной работе.

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

Наряду с высокой оценкой диссертационной работы в целом, возникли некоторые вопросы уточняющего характера:

1. Предложенная стратегия сочетания экспресс-биотестирования и системного биотестирования на тест-объекте *D. magna* может быть экстраполирована на другие традиционные биотест объекты – одноклеточные организмы? Или для них также должна быть разработана система визуальных признаков здоровых и угнетенных особей?

2. Какие сенсорные системы тест-объекта *D. magna* могут быть выделены в качестве основных в биотестировании экотоксикантов? Будут ли принципиальные отличия от сенсорных систем инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, описанных в диссертационной работе Шемаровой И.В. (2012 г.).

3. В чем принципиальные отличия модифицированного автором метода биотестирования по двигательной активности дафний, предложенного в качестве экспресс-биотеста, от модификаций, разработанных другими авторами? В частности, аттестованные в 2015 году методики, разработанные коллективом сотрудников отдела биомониторинга и биотестирования ГосНИИ «Промышленной экологии» (представленные в научных статьях журналов «Теоретическая и прикладная экология», «Поволжский экологический журнал»).

4. В работе 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. Есть ли данные о корреляции между собой и взаимосвязи показателей химического состава культивационной воды и температуры культивирования с плотностью модельных групп и особенностью биоритмов организмов?

5. Каковы перспективы реального внедрения разработанных методических подходов в практику биотестирования в качестве нормативных документов или РД?

В работе присутствуют некоторые опечатки и недостатки оформительского плана, не влияющие принципиально на качество представленной работы.

Заключение. Диссертационная работа Ольковой Анны Сергеевны «Разработка стратегии биотестирования водных сред с учетом многофакторности ответных реакций тест-организмов» является законченной научно-квалификационной работой, в которой разработана и научно обоснована стратегия биотестирования водных сред, сочетающая получение оперативного ответа о токсичности тестируемых сред, и определение экологически значимых эффектов загрязняющих веществ в условиях неустановленного фактора токсичности. По актуальности, научной новизне и практической значимости полученных результатов, современности методического уровня и объему проведенных исследований представленная работа полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Автор диссертационной работы – Олькова Анна Сергеевна – заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология (биология).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук
(03.00.16 – экология (ныне 03.02.08) и
03.02.03 – микробиология), профессор,
заведующая кафедрой «Экология»
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Саратовский государственный
технический университет имени Гагарина Ю.А.»

Тихомирова Елена Ивановна



12.11.2020г.

Подпись д.б.н., профессора Е.И. Тихомировой
«Заверяю»

Ученый секретарь Ученого совета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Саратовский государственный
технический университет имени Гагарина Ю.А.»
доктор культурологии, доцент



Н.В. Тищенко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.» (СГТУ имени Гагарина Ю.А.)

Адрес: 410054, г. Саратов, ул. Политехническая, 77

Телефоны: (8452)99-85-30, 89053230419

E-mail: ecology@sstu.ru, tichomirova_ei@mail.ru