

УДК 574.64 (28)

**В.В. Гончарук<sup>1</sup>, А.В. Сыроешкин<sup>2</sup>,  
В.Ф. Коваленко<sup>1</sup>, И.А. Злацкий<sup>2</sup>**

**ФОРМИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ И ВЫБОР  
ТЕСТ-КРИТЕРИЕВ ПРИ БИОТЕСТИРОВАНИИ  
ПРИРОДНЫХ ВОД**

<sup>1</sup>Институт коллоидной химии и химии воды  
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев;

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, г. Москва  
zlatskiy@ukr.net

*Описаны основные проблемы биотестирования природных вод. Определены принципы формирования тест-системы и факторы, влияющие на нее. Предложены главные направления выбора чувствительных тест-реакций организмов и тест-критериев для оценки качества природных вод по результатам их биотестирования.*

**Ключевые слова:** биотестирование вод, оценка качества вод, тест-система, тест-реакции, тест-критерии.

**Введение.** В настоящее время гидробиологами и водными токсикологами предложено несколько методик классификации природных вод с учетом экологических рисков, возникающих при воздействии источников загрязнения на водные объекты [1 – 3]. Такие исследования основаны на определении наличия или отсутствия в природной воде индикаторных видов гидробионтов (биоиндикация) с учетом физико-химических показателей водных экосистем. Следует отметить, что анализ и оценка экологических рисков особо эффективны в тех случаях, когда имеются значительные неопределенности в исходных данных об антропогенных нагрузках на водные экосистемы, реакции экосистем на эти нагрузки также неопределенны и имеют вероятностный характер. Кроме того, при тестировании вод не учитываются факторы микробиологического характера, которые могут

© В.В. Гончарук, А.В. Сыроешкин, В.Ф. Коваленко, И.А. Злацкий, 2016

существенно влиять на токсичность водной среды. Поэтому для определения влияния загрязнения на состояние экосистем эффективнее использовать методы биотестирования, нежели традиционные методологии, ориентированные на установление ПДК и норм качества воды и др. При этом биотестирование дает интегральную оценку степени токсичности загрязненных вод для живых организмов с учетом синергизма и антогонизма взаимодействия разных растворенных веществ.

В результате можно определить степень токсичности воды, которая, по данным химико-аналитических анализов, не показывает высоких концентраций загрязняющих веществ. Во многих случаях процедура биотестирования проще и значительно дешевле, не требует специального сложного приборного оснащения, экспрессивна, более точна и чувствительна в сравнении с другими анализами. В целом это приводит к заметному упрощению исследовательского процесса.

**Тест-системы для оценки качества природных вод.** Для корректной интерпретации результатов биологического теста необходимо создавать тест-системы определенного состава и перед использованием приводить их в строго нормированное начальное состояние [4].

Рассматривая состав тест-системы, следует упомянуть ее небактериологическую составляющую – водную среду, в которой распределены тест-объекты. Химический состав последней оказывает заметное влияние на чувствительность организмов к внешним воздействиям. Одни вещества, такие, как белки, антиоксиданты, гумины и некоторые микроэлементы, могут оказывать протекторное действие на жизнедеятельность клеток в процессе интоксикации. Другие, как, например, ПАВ и некоторые органические растворители, даже в незначительных концентрациях, напротив, способны многократно усиливать воздействие токсических веществ на живые объекты. Кроме того, микробиологические параметры могут значительно влиять на показатели качества воды. По этой причине тест-системы должны включать лишь те среды, которые готовят на основе растворов с известным и постоянным химическим и микробиологическим составом.

В экспериментах на основе дистиллированной воды использовали раствор четырех солей кальция, магния, натрия и калия – так называемая контрольная водная среда, с которой можно сравнивать исследуемые образцы воды [5] (таблица).

**Тест-организмы.** Правильный подбор тест-организма является не менее важным, чем использование стандартной водной среды. В экспериментах были использованы животные и растительные тест-организмы различных систематических групп и трофических уровней: низшие ракообразные (*Daphnia magna* и *Ceriodaphnia affinis*), пресноводная гидра (*Hydra attenuata*), аквариумные рыбы (*Brachidanio rerio*) и растения (*Triticum vulgare*, *Allium cepa*) [6].

#### *Химический состав искусственной пресной воды*

Вода	Реактив, мг/дм <sup>3</sup>				рН (через 24 ч)	Жесткость (через 24 ч)	Щелоч- ность (через 24 ч)
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	NaHCO <sub>3</sub>	KCl	CaSO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O			
Мягкая	30	48	2	30	7,2 – 7,6	40 – 48	30 – 35
Средней жесткости	60	96	4	60	7,4 – 7,8	80 – 100	60 – 70
Жесткая	120	192	8	120	7,8 – 8,0	160 – 180	110 – 120
Очень жесткая	240	384	16	240	8,0 – 8,4	280 – 320	225 – 245

Существенные морфологические и физиологические различия этих организмов обуславливают разнообразие сфер их применения в биологической практике. До настоящего времени не сделано обоснованного выбора универсального тест-объекта, идеально пригодного для любых методик биотестирования, возможно, что таковой не может быть найден в принципе. Анализ индивидуальных особенностей перечисленных тестовых животных и растений, а также сравнение их чувствительности по отношению к ряду токсических веществ позволили сформулировать общие требования, которым должны отвечать используемые тест-организмы. Эти тест-объекты отличаются простотой культивирования; легко воспроизводимы в лабораторных условиях; обеспечивают постоянство генетических и физиологических характеристик; обладают высокой чувствительностью к основным поллютантам природных вод; их тест-реакции легко наблюдаемы и воспроизводимы [7, 8]. При подборе вида животных или растений для каких-либо специфических биологических тестов могут быть составлены и другие дополнительные требования, но указанные выше сохраняют свое значение.

В результате комплексных целенаправленных исследований был получен набор из животных и растительных тест-организмов, которые обладают видоспецифической чувствительностью к токсическим веществам различной природы и могут служить характеристикой генетической и физиологической однородности тест-системы.

**Тест-реакция и тест-критерии.** В зависимости от природы и интенсивности возмущающего воздействия на тест-системы, ее ответные реакции могут проявиться на различных уровнях функционирования. По данным [9], наблюдение таких реакций, как угнетение роста, ингибирование биохимических и физиологических процессов и др., позволяет регистрировать более низкие концентрации токсических веществ, чем те, что регистрируются при гибели биотестов.

Кроме чувствительности, ответные реакции тест-систем характеризуются различной скоростью проявления и легкостью наблюдения. Поэтому выбор одной из таких ответных реакций тест-системы в качестве тест-реакции является достаточно важным. Он может быть решен лишь с учетом специфических особенностей задач в каждом отдельном случае. Общие требования, которым должна отвечать тест-реакция, а именно: достаточная чувствительность к изучаемому фактору; высокая оперативность; соответствие уровня организации тест-системы уровню моделируемого процесса; интегральность; нетребовательность к специальному оборудованию, а также к квалификации персонала.

Выбор тест-критерия ряд авторов [10, 11] также предлагают осуществлять согласно определенным требованиям. Однако, по нашему мнению, наиболее целесообразно использовать следующие: эффективность; универсальность; количественность и возможность выражения одним числом; наличие биологического смысла; простота и легкость интерпретации и вычисления; сопоставимость при получении в разные сроки наблюдения.

В настоящей работе были изучены две тест-реакции. Первая из них – тест-реакция гибели – подробно исследована на ветвистых ракообразных, *D.magna* и *C.affinis* [5, 12, 13], пресноводной гидре, *H.attenuate* [14], аквариумных рыбах, *B.rerio* [15, 16]. В качестве тест-критерия для оценки степени проявления этой тест-реакции можно регистрировать либо количество погибших особей за определенный промежуток времени, либо время, за которое погибает какая-то часть задействованных в опыте животных. Вторая тест-реакция – регистрация морфологических (у растений) и поведенческих (у живот-

ных) реакций на действие токсического агента водной среды. Например, у проросших зерен пшеницы, *T.vulgare* и репчатого лука, *A.cepa* [17] измеряли существенные морфологические изменения размерно-весовых показателей корешков, у пресноводной гидры *H.attenuata* – физиолого-морфологические реакции, которые проявлялись в сворачивании стрекательных щупалец.

Сравнение чувствительности к токсическим веществам тест-реакции – гибели *C.affinis* и высших животных показывает, что гидробионты реагируют на концентрации на один-два порядка ниже, чем теплокровные. Таким образом, тест-реакция гибели стандартных простейших организмов может быть использована для анализа объектов водной среды в области острой и хронической токсичности. Более ранние ответные реакции тест-организмов можно получить, используя биохимические и физиологические показатели при биотестировании. Например, изменения показателей крови у тест-организмов регистрируются задолго до их гибели, вызванной токсическим воздействием.

**Особенности биотестирования с использованием одноклеточных эукариот.** При проведении анализа водных растворов (включая растворы с измененным изотопным составом) методом биотестирования оптимальным является использование в качестве тест-объектов свободноживущих в объемной фазе простейших (*Protozoa*) [18 – 21]. Данные модели являются неприхотливыми в кормлении, достаточно крупными, что упрощает наблюдение за их состоянием в исследуемом образце. Простейшие одновременно могут совмещать функции клетки и организма. Инфузории являются олиготрофами, что позволяет уловить реакцию на любой химический лиганд в водном растворе. Биотестирование с использованием одноклеточных при различных температурах дает возможность описать скорость их гибели с помощью аррениусовских уравнений химической кинетики [19]. В [20] обнаружена связь между реакцией *Spirostomum ambiguum* и результатами клинических испытаний глицина с различными вспомогательными веществами.

*S.ambiguum* широко применяют как тест-культуру для токсикологических и фармакологических исследований, при этом она достаточно информативна при биотестировании поверхностных вод [18, 21]. Будучи потревоженной, клетка дает мгновенный ответ, сокращаясь по своей длине в 2 – 3 раза. В норме *S.ambiguum* совершает свободные передвижения в толще раствора с характерным чередованием сжатия/вытягивания клетки. В среде, содержащей компоненты токсической

природы, такое передвижение может сопровождаться конвульсивными подергиваниями, фиксацией около стенки ячейки, прецессионными движениями и другими отклонениями [18].

При определении роли дейтерия в жизнедеятельности эукариотической клетки было установлено, что зависимость продолжительности жизни клеточного биосенсора от концентрации дейтерия в воде (в интервале от 0 до 99%) имеет колоколообразную форму с явно выраженными зонами угнетения жизнедеятельности как при избытке, так и недостатке последнего. Необходимо отметить, что в природном геохимическом диапазоне концентраций дейтерия от  $D/H = 90$  ppm (антарктический лед) до  $D/H = 150$  ppm (глубинная морская вода) вариации продолжительности жизни клеточного биосенсора незначительны. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дейтерия для обеспечения нормального функционирования клетки. Кроме того, было показано, что с помощью изменения соотношения  $H/D$  возможно управление субпопуляционным составом полиморфной бактериальной культуры [19].

**Факторы взаимодействия токсикантов в тест-системе.** В общем случае ответные реакции формируются в тест-системе как результат целого комплекса внешних воздействий. Основным из них является фактор исследуемого образца. Как правило, имеют дело с комплексным загрязнением воды. Ценность биотестирования во многом обусловлена возможностью проводить оценку интегральной токсичности объекта исследования [22]. Однако проблема действия смесей токсических веществ на живые организмы все еще остается недостаточно изученной. Принято считать, что токсичность при комбинированном воздействии нескольких различных веществ в общем случае не является аддитивной величиной. Некоторые токсические вещества способны снижать эффект воздействия в сочетании с другими веществами, а иные, не являясь сами по себе токсическими, могут увеличивать действие токсикантов.

При этом различают три разных вида влияния токсических веществ при их взаимодействии с тест-системой. Аддитивный тип характеризуется тем, что токсический эффект, вызываемый смесью этих веществ, складывается из токсических эффектов, вызываемых каждым компонентом такой смеси при их изолированном воздействии. Происходит это, вероятно, из-за того, что механизм действия данных веществ на тест-систему единообразен.

Антагонистический тип взаимовлияния токсических компонентов смеси наблюдается тогда, когда результат токсического действия смесей на животные и растительные тест-организмы был меньше суммы токсического действия изолированных эффектов. Такой тип взаимоотношений этих веществ нивелирует повышенную токсичность каждого эффекта в смеси. Поэтому только процедура биотестирования раскрывает механизмы поведения отдельных веществ, находящихся в смеси водного раствора.

Синергизм во взаимоотношениях токсических веществ характеризуется тем, что их суммарный токсический эффект превышает сумму изолированных отдельных эффектов. При этом можно регистрировать острую токсичность с помощью тест-организмов, тогда как при использовании химико-аналитических методов токсических веществ, превышающих нормативные ПДК, в водном растворе не обнаружено.

Практическое использование биологических тестов ставит задачу целенаправленного искусственного изменения порога реагирования тест-системы на внешние воздействия [23]. Для этого могут быть использованы так называемые физиологические (функциональные) нагрузки. Их роль заключается в искусственном изменении состояния тест-системы путем того или иного стрессового воздействия. Механизмы подобных воздействий на живой организм могут быть достаточно разнообразными. В некоторых случаях организм вынужден компенсировать влияние нагрузки путем перестройки метаболизма и расходовать на это часть своих внутренних ресурсов. К тому же снижаются возможности организма для противодействия влиянию исследуемой воды и, соответственно, увеличивается чувствительность к токсическому воздействию. Таким образом, порог чувствительности тест-организма к внешним воздействиям может быть искусственно изменен путем применения функциональной нагрузки.

Еще одну группу внешних воздействий на тест-систему составляют "шумовые" факторы. К ним относятся колебания температуры, изменение кислотности среды, осмотические воздействия и так называемый "ударный" эффект, вызванный манипуляциями экспериментатора при перемещении организма из водной среды культивирования в исследуемый образец. Воздействие этих факторов на тест-систему обычно не приводит к значительному искажению результатов, однако определенный вклад в погрешность при определении тест-критерия они все же вносят.

**Выводы.** Исходя из того, что природные воды могут быть как мало-, так и высокотоксичными, причем токсичность этих вод может формироваться за счет различных факторов водной среды, для определения их качества необходимо формировать тест-системы, включающие несколько видов животных и растительных тест-организмов, с суммированием результатов биотестирования (комплексный подход). При этом следует тщательно выбирать чувствительные ответные тест-реакции и тест-критерии, которые позволят надежно оценить качество исследуемой воды.

**Резюме.** Описано основні проблеми біотестування природних вод. Визначено принципи формування тест-системи, розглянуті фактори, що впливають на неї. Запропоновано основні напрямки вибору чутливих тест-реакцій організмів і тест-критеріїв для оцінки якості природних вод за результатами їх біотестування.

*V.V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, V.F. Kovalenko, I.A. Zlatskiy*

## **FORMATION OF A TEST SYSTEMS AND SELECTION OF TEST CRITERIA IN NATURAL WATERS BIOASSAY**

### Summary

The basic problem of biological testing of natural waters. Defined principles of the test system, considered factors influence it. The basic directions of selecting sensitive test reactions of organisms and test criteria for assessing the quality of natural waters based on the results of biological testing.

### Список использованной литературы

- [1] *Константинов А.С.* Общая гидробиология. – М.: Высш. шк., 1986. – 472 с.
- [2] *Романенко В.Д.* Основы гідроекології. – К.: Обереги, 2001. – 728 с.
- [3] *Афанасьев С.А., Гродзинський М.Д.* Методика оценки экологических рисков, возникающих при воздействии источников загрязнения на водные объекты. – К.: АйБи, 2004. – 59 с.
- [4] *Багдасарян А.С.* // Экология и пром-сть России. – 2007. – С. 44 – 48.
- [5] *ДСТУ 4174:2003.* Якість води. Визначення хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* і *Ceriodaphnia affinis* (Cladocera, Crustacea). – К.: Держстандарт, 2004.

- [6] *Goncharuk V.V., Kovalenko V.F.* // J. Water Chem. and Technol. – 2012. – **34**, N 2. – С. 171 – 178.
- [7] *РД-118-02-90.* Методическое руководство по биотестированию воды. – Утв. пост. Госкомприроды СССР №37 от 06.08.1990 г. – М., 1991. – 48 с.
- [8] *Goncharuk V.V., Kovalenko V.F., Zlatskii I.A.* // J. Water Chem. and Technol. – 2012. – **34**, N 1. – Р. 98 – 104.
- [9] *Лукьяненко В.О., Карпович Т.А.* Биотестирование на рыбах. – Рыбинск: Госкомиздат РСФСР, 1989. – 96 с.
- [10] *Vergolyas M.R., Lutsenko T.V., Zlatskii I.A., Goncharuk V.V.* // J. Water Chem. and Technol. – 2014. – **36**, N 5. – Р. 467 – 475.
- [11] *Коваленко В.Ф.* // Гидробиол. журн. – 2004. – **40**, № 2. – С. 97 – 103.
- [12] *Архипчук В.В., Малиновская М.В.* // Химия и технология воды. – 2000. – **22**, № 4. – С. 428 – 443.
- [13] *ДСТУ 4173-2003.* Якість води. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* та *Ceriodaphnia affinis* (Cladocera, Crustacea). – К.: Держстандарт, 2004.
- [14] *Бресткина М.Д., Тушмалова Н.А., Данильченко О.П.* // Теоретические вопросы биотестирования. – Волгоград, 1983. – С. 133 – 136.
- [15] *ДСТУ 4074-2001.* Якість води. Визначення гострої летальної токсичності хімічних речовин та води на прісноводній рибі [*Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae)]. – К.: Держстандарт, 2001.
- [16] *ISO 12890:1999.* Water quality – Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish – Semi-static method. – London, 1999.
- [17] *Fiskesju G.* // Hereditas. – 1985. – N 102. – Р. 99 – 112.
- [18] *Nalecz-Javecki G.* // Environ. Toxicol. – 2004. – **19**, N 4. – Р. 359 – 364.
- [19] *Сыроешкин А.В., Суздалева О.В., Кискина Л.П., Долгополова В.А., Быканова С.Н., Плетенева Т.В.* // Вест. РУДН, Сер. "Медицина". – 2002. – № 3. – С. 25 – 32.
- [20] *Буканова С.Н., Кин'ко Т.У., Волошина Т.А., Сыроешкин А.В., Комиссарова И.А.* // Eur. J. Pharmac. Sci. – 2003. – **19**, Suppl. 1. – Р. 41.
- [21] *Ershov Yu.A., Pleteneva T.V., Siniuk T.F., Dolgopolova V.A.* // Biull. Eksp. Biol. Med. – 1999. – **127**. – Р. 717 – 720.
- [22] *Крайнюкова А.Н.* // Вост.-Европ. журн. передовых технол. – 2009. – **37**, № 1. – С. 30 – 34.
- [23] *Seng W.L.* // Toxicologist. – 2007. – **96**. – Р. 145.

Поступила в редакцию 21.09.2016 г.