

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ: ОСОБЕННОСТИ, ПРОБЛЕМЫ, ПОДХОДЫ

Олькова А.С.¹, Будина Д.В.¹, Даровских Л.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Вятский государственный гуманитарный университет», Киров, Россия (610005 Россия, г. Киров, ул. Красноармейская, 26), e-mail: morgan-abend@mail.ru

Рассматриваются основные проблемы анализа и интерпретации данных биотестирования. Обсуждается вопрос о влиянии химического состава не только тестируемой среды, но и культивационных вод на ответные реакции тест-организмов. Показаны недостаточный учет эффектов, предшествующих гибели организма, и некоторые варианты биотестирования с оценкой сублетальных эффектов, в том числе учет морфологических особенностей, двигательной и трофической активностей и наличия abortивных яиц в тесте с *Daphnia magna*. Построен ряд тест-функций, последовательно проявляющихся в экспериментах с *Daphnia magna* и *Ceriodaphnia affinis*: трофическая активность → гибель в остром эксперименте → время появления первой молоди → морфологические изменения → наличие abortивных яиц → плодовитость → гибель в хроническом эксперименте. Особое внимание уделяется интерпретации явлений стимуляции тест-функций организмов. Приводится опыт интерпретации результатов биотестирования природных вод со сложным составом загрязняющих веществ.

Ключевые слова: биотестирование, тест-объект, тест-функция, загрязняющее вещество, токсический эффект

ANALYSIS OF THE RESULTS BIOASSAY: FEATURES, PROBLEMS, APPROACHES

Olkova A.S.¹, Budina D.V.¹, Darovskikh L.V.¹

¹ Federal public budgetary educational institution of higher education «Vyatka State Humanities University», Kirov, Russia, e-mail: morgan-abend@mail.ru

The main problems of the analysis and interpretation of biological testing data. The question of the influence of the chemical composition of the test not only the environment but also the cultivation of water on responses of test organisms. It shows a lack of accounting effects preceding the death of the body. Variants bioassay with the assessment of sublethal effects, including consideration of the morphological features of the motor and trophic activity and the presence of abortive eggs in the test with *Daphnia magna*. It built a number of test functions, consistently manifested in experiments with *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia affinis*: trophic activity → death in the acute experiment → time of occurrence of the first young → morphological changes → the presence of abortive eggs → fertility death in chronic experiment. Particular attention is paid to the interpretation of phenomena stimulation test functions. The experience of the interpretation of the results of bioassays of natural water with a complex composition of pollutants.

Keywords: bioassay, test object, test function, pollutant, toxic effect

В природоохранной практике методы биотестирования востребованы, поэтому наблюдается бурное развитие подходов, критериев, методик определения интегральной токсичности. Сочетание результатов химического анализа и исследование ответных реакций живых организмов позволяют наиболее глубоко и детально охарактеризовать исследуемый компонент окружающей среды: установить причинно-следственные связи между антропогенным воздействием и наблюдаемыми откликами, прогнозировать дальнейшее развитие и состояние района исследования.

Наиболее эффективным как в российской, так и мировой природоохранной практике считается использование нескольких тест-организмов для установления токсичности [5; 16].

При несомненных достоинствах биотестирования исследователи сталкиваются с рядом трудностей в процессе объяснения получаемых результатов. Изложение опыта работы с результатами биотестирования стало целью данной статьи.

Материал и методы исследования

Объектами наших многолетних исследований являются компоненты окружающей среды как относительно благополучных фоновых территорий, так и районов, подверженных техногенному прессу. Кроме того, проводятся эксперименты по моделированию действия приоритетных загрязняющих веществ на тест-организмы различной систематической принадлежности.

Интегральная токсичность водных сред (природных вод, вытяжек из почв, донных отложений) определяется по методикам биотестирования, допущенным для целей государственного экологического контроля и мониторинга и внесенным в федеральный реестр методик РФ [9, 11–13]. Разрабатываются и апробируются авторские методы.

Результаты исследования и их обсуждение

На результаты биотестирования, кроме загрязняющих веществ, присутствующих в пробе, влияет естественная «матрица» водной среды. Матрицей природной воды мы называем здесь весь комплекс веществ, включенных в поверхностные или подземные воды естественным образом и активно формирующих химические, физико-химические и токсикологические свойства вод [6]. Аспекты проблемы:

- 1) при оценке интегральной токсичности вод нередко «матрица» природной воды, которая принимает загрязнение, маскирует вредные вещества (например, за счет комплексообразования);
- 2) «матрица» как среда для культивирования тест-организмов, обладая региональными и локальными особенностями, влияет на общее состояние биообъектов, их чувствительность и устойчивость к различным соединениям;
- 3) кроме того, при реализации многих методик биотестирования культивационная вода используется для приготовления серий разбавлений тестируемой среды, влияя на итоговый результат.

Токсичные вещества могут «маскироваться» за счет органоминеральных взаимодействий, комплексообразования, антагонизма веществ и других явлений, происходящих при приготовлении водных вытяжек из отходов, донных отложений и других тестируемых сред [10; 15]. Показано, что сорбционно-аккумулирующие процессы под влиянием гидробионтов и комплексообразующая способность растворенного органического вещества – определяющие факторы буферной емкости пресных вод [2].

Проблема отчасти решается приемами стандартизации тест-объектов, в том числе поддержанием чувствительности к модельному токсиканту в установленном диапазоне, что предполагается всеми аттестованными методиками.

Выбор подходящей воды для выращивания тест-культуры является одной из первоочередных задач всех лабораторий биотестирования. Для ее решения нередко требуется дополнительная подготовка вод: отстаивание, фильтрация, а также использование воды после содержания в ней высшей водной растительности. Последний прием дает положительные результаты, особенно при выращивании низших ракообразных. Это связано с тем, что нормативно чистые воды, которыми располагают специалисты, чаще всего подземного происхождения, тогда как низшие ракообразные – обитатели поверхностных вод. В этом случае такая предварительная подготовка отчасти приближает физико-химические свойства культивационной среды к требуемым.

Следующая проблема свойственна для методик, в которых в качестве тест-функции выступает гибель организма. Наиболее известными нормативными документами, ориентирующимися на этот показатель, можно назвать методики с использованием низших ракообразных [11, 12]. Дело в том, что до проявления крайней степени токсического эффекта, т.е. гибели, можно наблюдать и использовать для оценки качества тестируемой среды массу показателей. Такие эффекты, как изменение двигательной, пищевой активности, скорости размножения, и другие реакции хорошо идентифицируются, особенно в экспериментах по установлению хронического токсического действия [14]. Однако существующие аттестованные методики этого не предусматривают, вероятно, в силу усложнения процедуры обработки результатов. Например, классический биотест с использованием *D. magna* в части определения хронических воздействий предполагает подсчет количества abortивных яиц, но при обработке результатов эти данные не используются. В научных работах учет abortивных яиц обсуждается достаточно давно [1].

Для учета количества abortивных яиц предлагаем усовершенствование алгоритма аттестованной методики путем введения дополнительного критерия хронической токсичности: если количество abortивных яиц превысило 10% от числа молодежи за период эксперимента, то пробу следует признать оказывающей хроническое токсическое действие. Критерий апробирован. Например, при исследовании водоемов г. Кирова резкого снижения плодовитости *D. magna* не наблюдалось, но в ряде проб отмечено появление abortивных яиц, что считается крайне негативным явлением (табл. 1).

Таблица 1

Использование abortивных яиц как критерия хронической токсичности
(тест-объект *Daphnia magna*)

Вариант	Плодовитость на 1 самку	Количество абортивных яиц (их доля от общего числа молоди)	Заключение о токсичности пробы по аттестованной методике	Заключение о токсичности пробы с учетом абортивных яиц
Контроль	17,0	0	-	-
Проба 1	9,1	0	Оказывает хроническое токсическое действие	Оказывает хроническое токсическое действие
Проба 2	16,2	9 (5,6 %)	Не оказывает хронического токсического действия	Не оказывает хронического токсического действия
Проба 3	17,7	33 (18,6%)	Не оказывает хронического токсического действия	Оказывает хроническое токсическое действие

Представленные данные демонстрируют три распространенные ситуации:

- 1) плодовитость рачков значительно угнетена по сравнению с контролем, но абортивных яиц не обнаружено;
- 2) плодовитость рачков достоверно не отличается от контрольных показателей, количество абортивных яиц не превышает предложенного критического уровня;
- 3) плодовитость рачков достоверно не отличается от контрольных показателей, но количество абортивных яиц превышает 10% от общего числа молоди, рожденной в тестируемой среде.

Таким образом, появляется возможность учесть еще одну значимую тест-функцию низших ракообразных.

Продолжая эту серию исследований, в модельных экспериментах при изучении влияния сублетальных доз токсикантов на *D. magna* и *C. affinis* оценивали следующие эффекты:

- 1) день появления (вымета) первой молоди, свидетельствующий о своевременном созревании особей;
- 2) угнетение трофической функции — оценивали качественно, т.е. визуально. Кормление особей во всех опытных вариантах равнялось контрольному (1 мл суспензии водорослей на 100 мл водной среды). В случае угнетения трофической активности наблюдали зеленый осадок из водорослей, а также зеленый оттенок тестируемой среды;
- 3) наличие абортивных яиц: в таблице (приводим наличие или отсутствие);
- 4) к морфологическим изменениям, диагностируемым визуально, относили уменьшение размеров тела по сравнению с контрольными параметрами, а также окраску покровов тела (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение токсических эффектов *D. magna* и *C. affinis* в ответ на действие токсикантов (концентрация в расчете на Cr, Zn, Sr, B, F равна 0,5 ПДКр.-х.)

Вариант	День вымета первой молоди		Угнетение трофической функции		Наличие абортивных яиц		Морфологические изменения	
	<i>D. m.</i>	<i>C. aff.</i>	<i>D. m.</i>	<i>C. aff.</i>	<i>D. m.</i>	<i>C. aff.</i>	<i>D. m.</i>	<i>C. aff.</i>
Контроль	10	4	-	-	-	-	-	-
K ₂ Cr ₂ O ₇	12	- *	+	+	+	-	Бледные покровы	Уменьшение размеров
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	13	4	+	-	-	-	Бледные покровы	Уменьшение размеров
SrCl ₂ ·6H ₂ O	13	4	-	-	-	-	Уменьшение размеров, бледные покровы	Уменьшение размеров, бледные покровы
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10	4	-	-	+	-	Бледные покровы	Уменьшение размеров
NaF	13	4	-	+	-	-	-	Уменьшение размеров

Примечание: «-» — эффект не наблюдали; «+» — эффект наблюдали, * — гибель

Угнетение трофической функции, наличие абортивных яиц, бледность покровов, уменьшение размеров тела особей сигнализировали о стрессе организмов.

Различия во времени созревания особей ярче проявились в опытах с *D. magna*: первый приплод дафний в чистых водах произошел на 10-й день, тогда как при внесении добавок наблюдали торможение созревания яиц (до 13-го дня). *C. affinis* развиваются быстрее, поэтому время первого появления потомства фиксируется сложнее.

В результате проведения подобных экспериментов на природных и модельных средах выявлена последовательность появления тест-реакций низших ракообразных: трофическая активность → гибель в остром эксперименте → время появления первой молоди → морфологические изменения → наличие абортивных яиц → плодовитость → гибель в хроническом эксперименте. Оценка такого спектра тест-реакций и учет сублетальных эффектов позволяют выявлять специфическое токсическое действие веществ.

Открытым вопросом реализации и разработки новых методик биотестирования является интерпретация явлений стимуляции тест-функций живых организмов. Под стимуляцией мы понимаем здесь увеличение количественных характеристик состояния организма или их совокупности в процессе эксперимента по установлению токсичности по сравнению с контрольным вариантом. Большинство методик такие эффекты не учитывают. Например, в ФР.1.39.2015.19242 (тест-объект инфузории) согласно пункту 9.4: «отрицательные значения свидетельствуют об отсутствии токсичности и могут быть оценены как нулевые» [13]. Фактически при проведении эксперимента наблюдается

стимуляция хемотаксиса инфузорий по сравнению с контролем. Инфузории за 30 мин тест-реакции поднимаются в верхнюю часть кюветы, что характерно для нетоксичных проб, и начинают активно двигаться, завышая измеряемые показатели. Такая реакция может быть начальной стадией токсического эффекта. При увеличении экспозиции после стимуляции двигательной активности особи часто погибают. Однако гибель после стимуляции не является обязательным развитием ситуации. Если причиной стимуляции явилось повышенное содержание питательных веществ, то наступления крайней степени токсического эффекта мы не увидим.

Показано, что влияние многих загрязняющих веществ проявляется до определенного порога в стимуляции как тест-функций, так и продуктивности целых экосистем, и только при повышении дозы начинается угнетение [4; 7]. Для инфузорий наличие стадии стимуляции в динамике токсического эффекта показано авторами при воздействии малого содержания многих загрязняющих веществ (солей металлов, фенолов, пестицидов) [3].

Нами делаются попытки интерпретации явлений стимуляции тест-функций как при работе с естественными средами, так и при проведении модельных экспериментов.

Моделировалось загрязнение почв фторидами, техногенными источниками которых могут являться производства алюминия, заводы, производящие фторполимеры, и объекты уничтожения фторсодержащих отравляющих веществ [8]. Наблюдали стимуляцию хемотаксиса инфузорий и биолюминесценции тест-системы «Эколюм» в ответ на внесение высоких доз фторидов в почвы. При этом степень стимуляции снижалась в ответ на увеличение дозы токсиканта (табл. 3).

Таблица 3

Снижение эффекта стимуляции тест-функций при увеличении дозы фторид-иона

Вариант модельного опыта	Стимуляция биолюминесценции тест-системы «Эколюм» по сравнению с контролем, %	Стимуляции хемотаксической реакции инфузорий по сравнению с контролем, %
Контроль	100	100
100 ПДК	176	213
150 ПДК	94	166
200 ПДК	90	109
250 ПДК	79	94
300 ПДК	64	31
350 ПДК	53	угнетение

В данном примере проявляется также и эффект «матрицы»: комплекс веществ, насыщающих водную вытяжку из почвы, вероятно, снижает биодоступность и воздействие введенного вещества вплоть до значительных превышений норматива.

При определении токсичности природных вод, как поверхностных, так и подземных, также нередко встречается стимуляция тест-объектов на фоне относительно невысокого загрязнения поллютантами, а также сложного комплексного загрязнения. Приводим несколько примеров (табл. 4).

Таблица 4

Эффект стимуляции хемотаксиса инфузорий в сопоставлении с данными химического анализа при исследовании природной поверхностной воды

№ пробы	Стимуляции тест-функции по сравнению с контролем, %	Кратность превышения ПДК
1	15	As — 1,14; Be — 1,1; Pb — 1,3; F — 1,8; Al — 8,5
2	17	As — 0,85; F — 3; Mg — 1,5; Mn — 56; Fe — 10
3	18	As — 1,2; Mg — 1,5; Mn — 92; Br — 15; Ni — 1,1
4	22	Mg — 2; Mn — 216; Fe — 2,7; Sr — 7,5; Ba — 2,5; Br — 1,1; Ni — 9; Cd — 3; Tl — 1,3

Сопоставляя данные биотестирования и химического анализа, можно утверждать, что представленные пробы нельзя назвать безопасными. При всей неоднозначности вывода о токсичности пробы по показателю стимуляции потребность в таком критерии есть.

Заключение

При работе с живыми организмами исследователи сталкиваются с необходимостью многофакторного анализа причин наблюдаемых явлений. Это создает определенные трудности, в частности и при анализе результатов биотестирования. Выход при решении множества проблем данной области стоит искать в унификации группы методов и разработке строгой системы метрологического обеспечения методов биотестирования.

Перспективы развития группы методов биотестирования относятся к поиску еще более чувствительных тест-функций, разработке экспрессных методов установления токсичности, и, безусловно, автоматизации наблюдений за тест-объектами.

Список литературы

1. Лесников Л.А. Дафнии, как тест-организм при установлении степени и характера влияния сточных вод на рыбохозяйственные водоемы: Дисс....канд. биол. наук. – Л.: ГосНИОРХ, 1967. – 230 с.
2. Никаноров А.М., Жулидов А.В. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. – Л.: Гидрометеиздат, 1991. – 312 с.
3. Никаноров А.М., Трунов Н.М. Внутриводоемные процессы и контроль качества природных вод / под ред. А.И. Бедрицкого. – СПб.: Гидрометеиздат, 1999. – 150 с.
4. Никаноров А.М., Хоружая Т.А., Бражникова Л.В., Жулидов А.В. Мониторинг качества вод: оценка токсичности. – Санкт-Петербург: Гидрометеиздат, 2000. – 159 с.

5. Олькова А.С. Биотестирование в научно-исследовательской и природоохранной практике России // Успехи современной биологии. – 2014. – Т. 134. – № 6. – С. 614–622.
6. Олькова А.С. Особенности и проблемы биотестирования водных сред по аттестованным методикам // Вода: химия и экология. – 2014. – № 10. – С. 87–94.
7. Олькова А.С., Дабах Е.В. Опыт интерпретации результатов биотестирования поверхностных вод при химическом и радиоактивном загрязнении // Теоретическая и прикладная экология. – 2014. – № 3. – С. 21–28.
8. Олькова А.С. Некрасова Ю.Н., Дабах Е.В. Влияние фторида натрия на интегральную токсичность почв в модельном эксперименте // Биологический мониторинг природно-техногенных систем: Сб. материалов Всерос. научно-практической конференции. Ч. 2. – Киров: ООО «Лобань», 2011. – С. 36–39.
9. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04; 16.1:2.3:3.8-04. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». – С.Пб.: ООО «НЕРА-С», 2010. – 18 с.
10. Филенко О.Ф. Михеева И.В. Основы водной токсикологии. – М.: Колос, 2007. – 144 с.
11. ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. – М.: Акварос, 2007. – 48 с.
12. ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. – М.: Акварос, 2007. – 48 с.
13. ФР.1.39.2015.19242 (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98 (ред. 2015 г.)). Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «БИОТЕСТЕР». СПб.: ООО «Спектр-М», 2015. — 22 с.
14. Dave G. Effect of copper on growth, reproduction, survival and hemoglobin in *Daphnia magna* // *Comp. Biochem. and Phisiol.* – 1984. – № 2. – P. 439–443.
15. Hammond K.S., Hollows J.W., Townsend C.R. Effect of temperature and water calcium concentration on growth, survival and moulting of freshwater crayfish, *Paranephrops zealandicus* // *Aquaculture.* – 2006. – V. 251. – № 2-4. P. – 271–279.
16. Persoone G. Ecotoxicology and water quality standards. In: *rier water quality – ecological assessment and control* / Eds: P. Newman, A. Piavaux, R. Sweeting. – Bruselas: Commission of European Communities, EUR III, 1992. – 751 p.

Рецензенты:

Ямскова В.П., д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы регуляторных белков лаборатории биохимии процессов онтогенеза ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва;

Охапкина В.Ю., д.б.н., доцент, старший научный сотрудник НИЦ (Вч 23527, г. Киров) ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров.