

МЕТОДИЧЕСКАЯ БАЗА БИОТЕСТИРОВАНИЯ В МОНИТОРИНГЕ КАЧЕСТВА ВОД

Бакаева Е.Н.^{1,2}, Коваленко И.А.²

¹Гидрохимический институт Росгидромета, г. Ростов-на-Дону

²Институт наук о Земле, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону

E-mail: rotaria@mail.ru

Аннотация. Анализ нормативно-методической базы биотестирования показал расширение его направлений и выявил ряд проблем. Показаны особенности применения разных биотестов. Приоритет отдают набору биотестов. Проблема итоговой оценки экотоксикологического состояния экосистем остаётся открытой. Необходима разработка региональных оценочных шкал.

Ключевые слова: биотестирование, методология, тест-объект, токсичность, нормативно-методические документы

Характеристика качества поверхностных вод, являющихся средой обитания гидробионтов, включает такое опасное свойство воды, как токсичность. Учитывая биологическую основу токсичности, её следует расценивать как интегральную характеристику качества воды, обусловленную проявлением негативных в отношении гидробиоты свойств всего комплекса химических веществ, присутствующих в воде.

Согласно современным представлениям и мировому опыту оценка эколого-токсикологического состояния водных объектов невозможна без данных оценки интегральной токсичности с помощью биотестирования – экспериментальной оценке токсичности водной среды, основанной на регистрации физиологических, этологических и биологических откликов биологических тест-объектов. С помощью биотестирования можно получить адекватную оценку изменений состояния поверхностных водных объектов в части качественных показателей состояния водных ресурсов [1].

В настоящее время биотестирование является одним из направлений совершенствования системы оценок и контроля качества объектов окружающей среды. Не заменяя количественный химический анализ, биотестирование предваряет и дополняет его благодаря экспрессности, простоте исполнения и невысокой стоимости анализа.

В России в настоящее время биотестирование применяется для оценки токсичности вод водоохранными организациями различных ведомств. Установлены нормативы качества воды по данным биотестирования [1]. Материалы доступны в докладах о состоянии окружающей среды как регионального, так и федерального уровня. На сегодняшний момент развития водной экотоксикологии наработанная методологическая база биотестирования, частично представлена в нормативно-методических документах по их применению: природоохранных нормативных документах федеративных токсикологических (ПНД Ф Т), рекомендациях (Р), руководящих документах (РД). В системе государственного мониторинга поверхностных вод суши ведомственным документом Росгидромета [2] выполнение работ по биотестированию предусмотрено в качестве рекомендуемого. Полный список нормативно-методических документов, разработанных в ФГБУ «Гидрохимический институт» (Р и РД) и утверждённых Росгидрометом методик биотестирования представлен на сайте института.

Биотестирование оценивает существующее на данный момент загрязнение и нацелено на получение быстрого сигнала о токсичности и необходимости принятия управленческих решений [3]. Как показала практика, биотестирование представляет собой незаменимый чуткий элемент системы биодиагностики качества не только водных экосистем, но и всех компонентов окружающей среды [3].

В методологии биотестирования поверхностных вод общепринятыми тест-объектами являются представители фитопланктона из отдела зелёных микроводорослей (Chlorophyta) родов *Chlorella*,

Scenedesmus, представители зоопланктона родов *Daphnia* (Ракообразные/ Crustacea), *Brachionus* (Коловратки/Rotifera/Rotatoria), *Paramecium* (Инфузории/Infusoria). К настоящему моменту стало очевидно, что для адекватной оценки токсичности компонентов окружающей среды, целесообразно использовать не один биотест, а набор биотестов (biotest battery).

На данном этапе развития методологии биотестирования следует выделить следующие современные направления и проблемы: «адресность» биотестирования; инструментализация существующих биотестов; разработка новых, позволяющих экспрессно получать информацию о сублетальном действии, распределённых в водной экосистеме загрязняющих веществ; формирование и использование набора биотестов (biotest battery); оценка токсичности воды по набору биотестов или комплексу тест-показателей одного тест-объекта.

Рассмотрим, что сделано по указанным направлениям методологии биотестирования по нормативно-методическим документам России.

1. «Адресность» биотестирования подразумевает, во-первых, использование тест-объекта, экологически соответствующего гидрохимическому составу водного объекта, во-вторых, выбор тест-показателя, отвечающего требованиям чувствительности, разрешающей способности и экологической значимости. В нормативно-методическом документе [4] указан список гидробионтов, используемых в качестве тест-объектов для оценки токсического загрязнения вод водотоков и водоемов различной солености и зон смешения речных и морских вод, в связи с их экологическими особенностями. Приведены видовые названия гидробионтов и их принадлежность к экологическим группам по отношению к основным показателям среды обитания: пресноводные/солонатоводные, теплолюбивые/холодолюбивые, алкофилы/ацидофилы, олигосапробы/мезосапробы.

2. Инструментализация существующих и разрабатываемых биотестов, т.е. использование приборов и устройств, компактных в техническом исполнении, облегчающих проведение биотестов и позволяющих в сжатые сроки получать биологическую информацию. К настоящему времени разработаны и достаточно активно применяются приборы Биотокс-10 [5] и Биотестер [6, 7], комплект устройств для поддержания культур тест-объектов и проведения биотестирования с тест-объектами *Chlorella vulgaris* и *Daphnia magna* [8]. Прибор Биотокс имеет биосенсор «Эколюм», представляющий собой лиофилизированные люминесцентные бактерии или бесклеточные препараты, содержащие бактериальную люциферазу. Прибор Биотестер измеряет величину хемотаксической реакции по количеству переместившихся в тестируемую пробу инфузорий *Paramecium caudatum*. В [8] изложена методика биотестирования оценки токсичности проб воды, донных отложений, грунта по оптической плотности суспензии микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer на приборе ИПС (измеритель плотности суспензии), по этому же тест-показателю - в Р 52.24.905 [9] проводится оценка токсичности воды и донных отложений.

Предлагаются микробиотесты (токскиты) (Protoxkit F, Rotoxkit F и Daphtoxkit F) и микробный анализ Microtox. Токскиты – новое поколение биотестов, разработанных в лаборатории экологической токсикологии и водной экологии Университета Гент (Бельгия) под руководством профессора Г. Персоне. Они предназначены для проведения исследований острой токсичности природных сред и содержат все необходимые материалы для выполнения биотестирования или экотоксикологических исследований (тест-организмы в анабиотическом состоянии, эфиппиумы дафний, покоящиеся яйца коловраток, яйца артемии, культуры водорослей).

Существующие нормативно-методические документы по биотестированию, как правило используют "классические" биологические тест-показатели – гибель и размножение водных беспозвоночных. Однако, как выявила практика, показатель гибели хорошо проявляет себя при тестировании поверхностных вод в случаях ЧС, обязателен для сточных вод и при разработке ПДК химических веществ. Для оценки токсичности поверхностных вод необходимы более чувствительные

тест-показатели, "работающие" в любых условиях. Таковым показателем является основная функция живых организмов – питание, обеспечивающая их жизнедеятельность. В случае загрязнения водных объектов экосистема для своего сохранения в первую очередь выдвигает организмы-фильтраторы. Именно такой способ питания гидробионтов как фильтрация (скорость фильтрации, трофическая активность, пищевая активность, скорость осветления среды), наиболее приемлем в качестве экспрессного тест-показателя. Им обладают представители основной группы гидробионтов – зоопланктона (инфузории, коловратки, ракообразные). По тест-объекту коловраткам, принадлежащих к тонким фильтраторам – вертикаторам, разработаны нормативные документы по экспресс-биотестам оценки токсичности воды и донных отложений на основе микроскопирования [10-13]. Исследования трофической активности дафний, сопровождаемые одновременно разработкой соответствующих устройств, проводятся в Сибирском федеральном университете группой [14].

3. Разработка новых биотестов, позволяющих в краткие сроки получать информацию о сублетальном действии токсикантов, проводится, как правило, на микроуровне. В этом направлении результативны и перспективны работы по использованию биомаркеров, разрабатываемые в Институте биологии внутренних вод РАН [15,16]. Активно разрабатываются биотесты с бактериальными люминесцентными сенсорами в Южном федеральном университете [17,18].

В настоящее время перечень методик биотестирования и сферы их применения существенно расширились. Систематизация существующих методик представлена в работе [19]. Перечисленные биотесты используются для характеристики эколого-токсикологического состояния и экологического благополучия водной экосистемы.

4. Формирование и использование набора биотестов (biotest battery). Одна и та же проба на разные тест-объекты оказывает разный уровень воздействия. Это обусловлено экологическими особенностями жизнедеятельности видов, взятых в качестве тест-объектов в биотестовый анализ. Поэтому использование набора тест-объектов является основой методологии биотестирования токсичности вод при разработке нормативов токсичности отдельных веществ для водных объектов (ПДК р/х), гигиенических нормативов питьевых вод, при оценке токсичности отдельных химических веществ, сточных, природных поверхностных и подземных вод.

Существует представление о целесообразности использования в качестве тест-объектов для экспрессных анализов представителей трёх основных звеньев трофической цепи биогеоценозов: продуцентов, консументов, редуцентов. В Р 52.24.868- 2017 [13] предложены наборы биотестов для режимного мониторинга поверхностных вод суши. Также при наличии можно использовать микробиотесты (токскиты) (Protoxkit F, Rotoxkit F и Daphtoxkit F) и микробный анализ Microtox, применяемых в европейских странах.

5. Оценка токсичности тестируемой пробы является наиболее важной методической задачей биотестирования. Опираясь на принципы водной токсикологии, где существует оценка токсичности химических веществ и сточных вод, биотестирование подразумевает воздействие химической компоненты. Результаты биотестирования выражаются не количественными значениями. Качество воды методами биотестирования принято оценивать словесно как токсичное/нетоксичное, степень токсичности – хроническое (ХТД), подострое (ПОТД) и острое (ОТД) токсическое действие.

Оценка токсичности по набору биотестов или комплексу тест-показателей одного тест-объекта является наиболее востребованным на данном этапе направлением. Однако результаты биотестирования при использовании набора тест-объектов нередко имеют неоднозначный характер. Что в значительной степени осложняет проводить итоговую оценку токсичности как пробы, так и в целом водного объекта.

Итоговая оценка токсичности в нормативных документах основана на «наихудшем» результате. В этом случае, к сожалению, неучтёнными остаются результаты отклика других тест-

объектов. Интерпретация стимулирующего действия тестируемых проб в плане оценки токсичности является спорной. Часто её просто игнорируют. В некоторых случаях расценивают как токсическое действие. Спорным также является оценивание токсичности тестируемых проб по отклонению значений тест-показателей от контроля на 10 % (принято в некоторых руководствах), что находится в пределах ошибки биотестового анализа.

В биотесте с одним тест-объектом и комплексом тест-показателей, например, гибель, плодовитость, трофическая активность одного теста-объекта, позволяет учесть и биологические, и физиологические характеристики организма. А в сопряжении с экспозицией биотеста позволяет дать более объективную информацию о степени токсичности водного объекта и экологически обоснованный прогноз развития этой группы гидробионтов разработан авторами в [10,12]. Разработаны шкалы оценки токсичности вод с использованием гетеротрофных тест-объектов по двум тест-показателям [10], по двум тест-показателям автотрофных тест-объектов [13]. Метод биотестирования двух составляющих водных экосистем (вод и донных отложений) является самостоятельным биологическим методом, позволяющим оценить состояние экосистемы водного объекта [13]. Результаты биотестирования, согласно шкале методики, позволяют оценить пять состояний водного объекта (от благополучного до экологического бедствия).

По результатам комплексных исследований в соавторстве сделан первый реальный шаг в итоговой оценке токсичности по комплексу биотестовых и гидрохимически данных для водотоков шахтной территории Ростовской области. Разработана шкала по оценке качества природных вод по комплексу биотестовых (на основе набора биотестов) результатов и содержанию металлов [20].

Таким образом анализ нормативно-методической базы биотестирования показал расширение его направлений и выявил ряд проблем. Разработать один универсальный набор биотестов невозможно как вследствие разнообразия природных особенностей водных экосистем разных природно-климатических зон, так и в силу значительного количества применяемых документов по определению токсичности природных сред. Приоритет отдают набору биотестов. Однако проблема итоговой оценки экотоксикологического состояния экосистем остаётся открытой. Разработка универсальной оценочной шкалы для всего многообразия водных объектов и типов загрязнений является весьма трудной и, вероятно нереализуемой задачей. Необходим учёт региональных особенностей исследуемых водных объектов.

В завершение стоит заметить, что применение какой-либо выбранной комплексной оценки качества воды в каждом конкретном случае требует дополнительных исследований для более полной разработки практической и универсальной системы оценки качества природных вод.

Литература

1. Приказ Министерства природных ресурсов РФ от 15 июня 2001 г. N 511 "Об утверждении Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды".
2. РД 52.24.309-2016. Организация и проведение режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши. Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2016.-100 с.
3. Бакаева Е.Н., Никаноров А.М. Биологические подходы к оценке экотоксикологического состояния водных экосистем. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*, 2015. 1: 72–83. [In Russian].<https://doi.org>
4. Р 52.24.690-2006 Оценка токсического загрязнения вод водостоков и водоёмов различной сложности и зон смешения речных и морских вод методом биотестирования. Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2008. 28 с.
5. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (ПНД Ф 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».

6. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98 Методика определения токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий.
7. Р 52.24.695-2007. Оценка токсического загрязнения природных вод и донных отложений водных экосистем по коэффициенту регенераций популяции, Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2008. 32 с. 102.
8. ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09 и Т 16.1:2:3:3.14-09 (Издание 2012 г.). Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов производства и потребления по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer).
9. Р 52.24.905-2020. Оценка токсичности воды и водных вытяжек донных отложений поверхностных водных объектов методом биотестирования по изменению оптической плотности культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2021.-34 с.
10. Р 52.24.662-2004. Оценка токсического загрязнения природных вод и донных отложений пресноводных экосистем методом биотестирования с использованием коловраток. СПб.: Гидрометеиздат, 2006.-56 с.
11. РД 52.24.669-2005. Унифицированные методы биотестирования для обнаружения токсического загрязнения поверхностных вод суши с использованием микрозоопланктона. СПб.: Гидрометеиздат, 2006.- 57 с.
12. Р 52.24.741-2010. Оценка токсичности поверхностных вод суши в условиях чрезвычайных ситуаций методом экспрессного биотестирования // Обеспечение безопасности поверхностных вод суши РФ в условиях чрезвычайных ситуаций: Сборник рекомендаций. Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2011 - С.67-90.
13. РД 52.24.784-2013. Массовая концентрация хлорофила *a*. Методика измерений спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом. Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2013.-32 с.
14. Р 52.24.868 2017. Использование методов биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов. Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2020 -57 с.
15. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 ПНД Ф Т 16.1:2:2:3:3.7-04 Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris*) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. - М., 2014. - 36 с.
16. Чуйко Г.М., Томилина И.И., Холмогорова Н.В. 2022. Методы биодиагностики в водной экотоксикологии. *Токсикологический вестник* 30(5):315-22. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-5-315-322>
17. Сазыкина М.А. 2014. Экотоксикологическая оценка водных экосистем с использованием биосенсоров на основе люминесцентных бактерий Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 358 с.
18. Сазыкина М.А., Мирина Е.А., Сазыкин И.С. 2015.Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод. *Вода: Химия и экология*, 10: 67-79.
19. Филенко О.Ф., Чуйко Г.М. 2017. Водная экотоксикология в России: от прошлого к настоящему.Труды Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. 77 (80): 124-142
20. Закруткин В. Е., Решетняк О. С., Бакаева Е. Н. 2020. Гидроэкологические особенности поверхностных вод углепромышленных территорий Восточного Донбасса. Известия РАН. Серия географическая, 84(3): 451–46.

METHODOLOGICAL BASIS OF BIOTESTING IN MONITORING WATER QUALITY

^{1,2} **Bakaeva E.N.**, ² **Kovalenko I.A.**

¹Hydrochemical Institute of Roshydromet, Rostov-on-Don

²Institute of Earth Sciences, Southern Federal University, Rostov-on-Don

Annotation. The analysis of the regulatory and methodological base of biotesting showed the expansion of its directions and revealed a number of problems. The features of the use of different biotests are shown. Priority is given to a set of biotests. The problem of the final assessment of the ecotoxicological state of ecosystems remains open. It is necessary to develop regional assessment scales.

Key words: biotesting, methodology, test object, toxicity, regulatory and methodological documents