

УДК 628.394.6:57/59(262.54)

## О ПРОБЛЕМЕ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ КОМПОНЕНТОВ ВОДНОЙ СРЕДЫ МЕТОДАМИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

© 2008 г. И.Г. Корпакова, Д.Ф. Афанасьев, И.Е. Цыбульский, А.Ю. Виноградов, М.А. Сазыкина, С.Ю. Чередников

Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Ростов-на-Дону 344002

Поступила в редакцию 24.09.2008 г.

Окончательный вариант получен 29.10.2008 г.

В статье рассматриваются методологические проблемы биологического тестирования на гидробионтах различного трофического уровня. Обнаружено, что показатели неспецифического стресс-синдрома организмов могут успешно применяться в целях биотестирования. Обсуждаются теоретические аспекты использования методов биологического тестирования в практике оценки качества среды водных экосистем.

Существенное негативное воздействие на биологические ресурсы водоемов оказывает антропогенное загрязнение, являющееся одним из главных факторов, обуславливающих ущерб рыбному хозяйству. В этой связи, в оценке направленности происходящих изменений качества водной среды значительную информативную ценность представляет оценка токсикологической опасности компонентов экосистемы биологическими экспресс-методами, поскольку химическая характеристика поллютантов водной среды не может одновременно обеспечить адекватную оценку их токсичности и степень потенциальной опасности для живых организмов (Дятлов, 2000).

Обилие химических соединений, которые, по мере их появления, необходимо проверить на биологическую активность, обуславливает необходимость разработки комплекса простых, надежных, обладающих большой информативностью и коротким временем тестирования, методов. Поскольку накопление ксенобиотиков идет преимущественно в донных отложениях акваторий, то в первую очередь для определения экотоксикологического риска необходимо проводить исследование токсичности этого компонента экосистем.

Одним из перспективных направлений решения проблем биотестирования является применение биологических методов анализа с использованием микроорганизмов, культуры тканей, растительных и животных объектов. При этом биологический объект проявляет обобщенную (интегральную) реакцию на действие неблагоприятных компонентов загрязнения и служит индикатором биологической доброкачественности природной среды (Бурдин, 1985; Никитина, 1991).

В настоящее время существуют стандартные международные методы биотестирования морской воды, разработанные под эгидой ISO (International Standard Organization) с использованием *Phaeodactylum tricorutum* и *Skeletonema costatum* (Water quality..., 1994). В России принята система оперативного мониторинга Росгидромета, включающая методы оценки острой токсичности, измеряемой по таким тест-реакциям, как выживаемость и подвижность дафний, двигательная активность бентосных беспозвоночных (пиявки, моллюски), флюоресценция водорослей (Никаноров, 2005). Однако, ведущее значение сейчас приобретает контроль над состоянием водной среды, которая подвергается хроническому антропогенному воздействию, связанному с поступлением в водоем

комплекса токсикантов, в концентрациях индивидуальных веществ на уровне предельно допустимых концентраций (ПДК) и ниже. Такой комплекс не приводит к гибели организма и вызывает только первичные повреждения, иными словами, задолго до момента полной элиминации организм испытывает стресс. Таким образом, показатели стресс-синдрома вполне могут быть использованы для целей биотестирования и, особенно, когда исследователь имеет дело с хронической токсичностью.

Однако, поскольку любой стресс может быть индуцирован целым рядом причин, то, как правило, регистрируемые показатели стресса неспецифичны, что, впрочем, отвечает требованиям биотестирования, так как позволяет получить интегральную оценку действия комплекса токсикантов. Использование показателей стресс-синдрома особенно необходимо, когда исследователь имеет дело с тестированием донных отложений, поскольку чаще всего токсичность отобранных образцов оценивается не прямыми методами, а косвенно, через оценку токсичности их экстрактов, преимущественно водных. Принимая во внимание, что при экстрагировании в воду переходят далеко не все токсические вещества и не в одинаковых объемах – гидрофильные больше, гидрофобные меньше – то токсические свойства полученного экстракта окажутся существенно измененными, а в ряде случаев значительно ослабленными, по сравнению с токсичностью исходного грунта.

Говоря о стресс-синдроме, необходимо отметить, что, по мнению В.А. Барабой, неспецифическая составляющая перестройки жизнедеятельности, включающая общие механизмы повышения устойчивости, индуцируется в первую очередь окислительным стрессом (Барабой и др., 1991). В норме окислительно-восстановительные реакции лежат в основе продуктивных процессов растений, деструкции органического вещества и т.д.

Симптоматика неспецифического адаптационного синдрома включает ряд биологических и биофизических показателей, обусловленных нарушением баланса образования и гашения в клетке свободных радикалов. Сюда относятся уменьшение резерва антиоксидантов, нарушение мембранного транспорта в результате перекисного окисления фосфолипидов, явления биохемилюминесценции и другие реакции. Таким образом, свободные радикалы кислорода являются первичными медиаторами повреждений растений и животных.

Представление о неспецифическом общем синдроме адаптации (стресс-синдроме) было сформулировано Г. Селье (1987) для всех живых систем, прежде всего многоклеточных. Стресс-синдром последовательно проходит три стадии. Первая стадия – тревоги – состоит в быстрой перестройке жизнедеятельности на более напряженный режим; при этом устойчивость живой системы к экстремальному воздействию несколько снижается. Вторая стадия резистентности соответствует состоянию повышенной устойчивости, адаптации живой системы к трудным условиям. Третья стадия – истощения – при длительном и тяжелом стрессе сопровождается истощением резервов и снижением устойчивости, вплоть до гибели. Г. Селье, в свое время, выдвинул представление о «первичном медиаторе» стресса, непосредственно вырабатываемом в ответ на экстремальное воздействие и в свою очередь включающем механизм реализации стресса. Разработана и обоснована концепция, рассматривающая продукты активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) (при различных воздействиях) как искомым первичный медиатор стресса (Барабой, 1976; Барабой и др., 1991).

Таким образом, при интерпретации данных, полученных при тестировании среды с

использованием показателей стресс-синдрома, крайне важно учитывать стадию стресса, в которой находится организм. В противном случае результаты исследования могут оказаться сложно объяснимыми, а иногда и вовсе непонятными. Такая фазовость ответа живой системы, обусловленная имманентно изменяющимся состоянием организма, является одной из сложнейших проблем в биотестировании. Еще раз повторим, что реакция живой системы на хроническое действие токсиканта может кардинально меняться в зависимости от длительности этого действия, причем, очевидно, существуют критические периоды, когда несущественному изменению времени экспозиции могут соответствовать катастрофические сдвиги в тест-реакции.

В связи с тем, что на тест-реакцию лабораторной культуры могут влиять, кроме токсикантов, еще и естественные факторы, такие как температура, качественный и количественный состав естественных вод, их окислительно-восстановительный потенциал и т. п., то весьма важно проводить тестирование на выборках аборигенных видов тест-объектов, взятых из условно чистого участка исследуемой акватории. Кроме того, после проведения тестирования в таком случае представляется возможным экстраполировать полученные данные на существующие в природе популяции тех систематических единиц, представители которых были использованы в эксперименте в качестве тест-объектов.

Универсальной биотест-системы, позволяющей обнаруживать воздействие всех возможных токсикантов одинаково надежно, не существует. Поэтому все более широкое применение в практике экологического контроля находят наборы тестов с использованием различных тест-организмов, включая микроорганизмы, высшие животные и растения, клеточные линии (Фомченков и др., 1996; Davoren, Fogarty, 2004; Escher et al., 2005). Токсичные соединения могут быть высоко специфичны для разных организмов (прокариотов или эукариотов, животных, растений или грибов, точно влиять на деление клетки, блокировать дыхание, питание, стимулировать неспецифический стресс и т.д.). В связи с этим для получения объективной оценки целесообразно проводить комплекс тестов на ряде организмов, занимающих разные уровни трофической цепи. В каждом таком конкретном случае преимущества одних тестов восполняют ограничения других, и точность оценки интегральной токсичности природной среды возрастает. Таким образом, один из основных принципов практического лабораторного биотестирования – применение одновременно нескольких тест-организмов, представляющих разные трофические, систематические группы и уровни организации живой материи: бактерий, осуществляющих процессы самоочищения; водорослей и высших растений – продуцентов, дающих начало большинству пищевых цепей в водоеме; животных – представителей верхних уровней трофической цепи, в частности – моллюскам – одним из основных фильтраторов и седиментаторов в водоемах. Представляется логичным, кроме того, проводить исследование также на простейших (одноклеточных инфузориях), как изучение ответа клетки на введение в среду поллютанта (клеточный уровень), на водорослях и моллюсках (организменный уровень - исследование ответа организма по изменению морфологии, физиологических или биохимических показателей). Отдельно необходимо указать на перспективность метода кислородного баланса (баланс активности авто-гетеротрофных организмов (Брагинский, 1979) – для изучения реакций целой модельной экосистемы. В оценке направленности происходящих изменений качества водной среды значительную информативную ценность представляет, кроме того, биотестирование генетической опасности различных компонентов экосистемы.

Правильный выбор тест-организма для биотестирования является чрезвычайно важным. Это связано с многочисленными объективными обстоятельствами, ограничивающими применение того или иного метода: условия культивирования, чувствительность к токсикантам и т.д. Организмы, используемые для биотестирования должны удовлетворять ряду требований:

- Быть генетически однородными (принадлежать одному штамму, чистой линии), что обеспечит сходство их чувствительности и резистентности, единообразие ответных реакций на воздействие токсикантов;
- Не должны иметь сезонной периодичности их функциональной активности, что обеспечит однородность реакций при проведении работ в разные сезоны;
- Иметь высокий уровень метаболизма, что обеспечит быстроту возникновения у них ответных реакций на воздействие токсикантов;
- Быть стрессоустойчивы к связанным с процедурой тестирования операциям; накопление загрязняющих веществ не должно приводить к гибели тест-организмов;
- Быть одновозрастными и характеризоваться, по-возможности, близкими свойствами;
- Быть достаточно многочисленными, что обеспечит необходимый для эксперимента отбор без влияния на их воспроизводство.

В целом, методы должны удовлетворять условиям:

- Относительной экспрессности проведения тестирования;
- Получения достаточно точных и воспроизводимых результатов.

Таким образом, существенное значение для анализа экологической ситуации в водоеме имеет выбор как самих тест-объектов, так и комплекса методов биологического тестирования, способных оценить токсичность компонентов среды для организмов различных трофических уровней и модельной экосистемы в целом. Интегральная оценка состояния токсичности водной среды и экстрактов донных отложений может быть дана только по совокупности результатов тестирования разными методами.

Практически все компоненты экосистем Азовского и Черного морей в большей или меньшей степени загрязнены (Кленкин и др., 2007), что негативно сказывается на состоянии биоресурсов бассейна и обуславливает необходимость проведения регулярного мониторинга среды и биоты. С целью проведения биотестирования на аборигенных организмах для Азовского моря подобран ряд видов, отвечающих всем требованиям современного подхода к биотестированию (Методы..., 2005). В настоящее время нами применяется следующая система тестов, основанная на сочетании определения токсичности для разных компонентов экосистемы с использованием чистых линий и штаммов аборигенных организмов, адаптированных по диапазону солености, другим абиотическим характеристикам и содержащихся в стандартных условиях.

1) *Метод оценки токсичности воды и донных отложений с использованием параметров хемилюминесценции.* Метод основан на определении параметров индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) водных экстрактов донных осадков в системе перекись водорода – люминол в ТРИС-Н<sub>1</sub> буфере. Хемилюминесценция возникает в

результате рекомбинации образующихся в системе свободных радикалов – химически и биологически активных соединений, являющихся продуктами одноэлектронных (свободно-радикальных) окислительно-восстановительных реакций. Токсичность устанавливается в случае, как избытка свободных радикалов в среде (токсичность по сверхокислительному типу), так и их недостатка (токсичность по восстановительному типу). Метод аттестован на реальных пробах донных осадков (Свидетельство об аттестации № С 4.24-2007) и внесен в федеральный реестр методик выполнения измерений ФР.1.31.2007.03317.

2) *Определение генотоксичности донных отложений.* Многочисленные исследования последних лет показывают, что химические соединения, поступающие в живой организм из окружающей среды, взаимодействуют с ДНК, что может приводить к тератогенезу, мутагенезу и канцерогенезу. В последние годы было принято несколько руководящих документов, в которых рекомендовано тестирование генотоксикантов в морских экосистемах. Так, US Environmental Protection Agency рекомендовало исследование присутствия поллютантов дополнять тестированием мутагенности (Dixon et al., 2002). Нами используется модифицированный вариант SOS-люкс-теста и следующая шкала оценки генотоксичности: если при достоверном отличии опыта от контроля фактор индукции (I) (как с метаболической активацией, так и без активации) в каждом варианте не превышает 1,5, генотоксичность не регистрируется; если фактор индукции в любом из вариантов или в каждом варианте не превышает двух единиц  $1,5 < I < 2,0$ , то регистрируется слабый генотоксический эффект; если фактор индукции в любом из вариантов не более 10 единиц ( $2 < I < 10,0$ ), а в другом  $I < 2,0$  – генотоксический эффект средней силы; если фактор индукции в каждом варианте превышает две единицы ( $2 < I$ ), или если в одном из вариантов  $10 < I$  – сильный генотоксический эффект.

3) *Метод оценки токсичности по изменению люминесценции светящихся бактерий.* Среди разрабатываемых в настоящее время методов биотестирования особое место занимают методы оценки токсичности по изменению люминесценции светящихся бактерий. Принцип биолюминесцентного теста заключается в измерении интенсивности свечения фотобактерий и изменении его при добавлении токсикантов. В измерительной системе используются интактные клетки фотобактерий, обладающие специфической способностью с высокой квантовой эффективностью переводить в излучение оптического диапазона энергию химических реакций. Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб. Апробация метода тестирования токсичности донных отложений продемонстрировала возможность использования штаммов *Vibrio fischeri* (депонированы в ВКПМ ФГУП ГосНИИГенетика под номерами В-9579 и В-9580), а также некоторых других для биотестирования. Работа по разработке метода оценки токсичности по изменению люминесценции светящихся бактерий была выполнена при финансовой поддержке РФФИ и региональных инвесторов (грант № 06-04-96803).

4) *Оценка токсичности компонентов среды по влиянию на репродуктивную способность простейших.* Методом биотестирования на простейших оценивается токсичность водной среды на клеточном уровне организации живой материи. В основе метода лежит известный способ оценки качества воды, традиционно применяющийся в водной токсикологии (Методы..., 2005). Для оценки качества воды соленостью 6-18%

использован типичный обитатель морской литорали – донная цилиата *Euplotes harpa* Stein (Ciliophora), адаптированная к аквариальным условиям. Тестирование заключается в оценке влияния компонентов среды на индивидуальные линии лабораторных культур *Euplotes harpa*. В качестве тест-параметров рассматривается темп деления клеток (коэффициент прироста), рассчитанный за единицу времени (24 часа) и степень выживания индивидуальных линий за 1, 3 и 7 суток. Донные цилиаты являются важным звеном в энергетических цепях водных экосистем. Поэтому снижение репродукционного потенциала деструкционного уровня трофической цепи, зарегистрированного в ходе тестовых испытаний, свидетельствует о существенных нарушениях в экосистеме, способных привести к накоплению высокомолекулярных органических соединений в донных отложениях. Чрезмерное увеличение скорости репродукции, как правило, является следствием обилия в среде легкоминерализуемой органики и может свидетельствовать об эвтрофикации акватории.

5) *Определение токсичности компонентов среды методом оценки фильтрационной активности моллюсков.* Метод основан на скорости фильтрации моллюсками *Mytilus galloprovincialis* морских микроводорослей *Phaeodactylum tricorutum*. В зависимости от качества водной вытяжки изменяется фильтрационная активность животных, что является показателем изменения функционального состояния организма. Для тестирования используются адаптированные мидии, отобранные в условно чистом районе Черного моря с искусственных коллекторных поселений. Степень загрязнения оценивается по отклонению скорости фильтрации в опытных вариантах от контрольных показателей. При интерпретации результатов исходят из того, что при обилии взвешенной органики в воде скорость фильтрации мидий возрастает (Хрусталева, 1999), а при повышенном содержании различных химических токсикантов (нефтепродукты, пестициды, фенолы и пр.), скорость фильтрации, напротив, снижается.

6) *Метод кислородного баланса.* Указанным методом оценивается состояние продукционно-деструкционных процессов в водных экстрактах тестируемых объектов. Учитываемый баланс между первичной продукцией (П) и деструкцией (Д) отражает уровень «метаболизма экосистемы» (баланс вещества и энергии) (Брагинский, 1979). Система сбалансирована при П/Д  $\approx$  1. Обнаружение положительного отклонения в указанном соотношении свидетельствует о сдвиге в сторону повышения продуктивности экосистемы (возможно, из-за обилия легкоминерализуемой органики), т.е. в узком смысле, к эвтрофикации. Следовательно, в точке отбора пробы можно ожидать и интенсификацию процессов самоочищения воды. Напротив, отрицательное отклонение от контроля свидетельствует об общей деградации экосистемы и о сложном комплексном загрязнении поллютантами различного действия. Чем ближе отношение П/Д к нулю, тем ближе состояние «экологической смерти», при котором функционирование экосистемы прекращается полностью (Брагинский, 1979). Обычно баланс в соотношении фотосинтеза растительных компонентов и потребления кислорода всеми остальными компонентами системы в виду его высокой сложности без учета типов грунтов и их окислительно-восстановительного потенциала не может быть описан с высокой степенью достоверности каким-либо одним типом загрязнения, что подтверждается отсутствием значимых корреляций с качественными характеристиками отдельных аналитических определений. Однако, именно эта высокая степень учета большого количества абиотических факторов, влияющих на экосистемный гомеостаз, позволяет судить о результирующем воздействии на биоценоз, и даже оценивать

тенденции его дальнейшей эволюции. Показано, что имеет место совпадение нескольких типов загрязнения на уровне ПДК и выше с их суммарным влиянием, оцениваемым по результатам биотестирования (Корпакова и др., 2007).

Особую значимость приобретает внедрение разработанных методов биотестирования для оперативного контроля качества среды в районах разработки и добычи углеводородного сырья в Азовском и Черном морях. Возможность быстрого и точного количественного определения токсичности среды делают описанную систему тестов наиболее пригодной для анализа загрязненности среды приоритетными токсикантами при их комбинированном действии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Барабой В.А.* Биологическое действие растительных фенольных соединений. Киев: Наукова думка, 1976. 260 с.

*Барабой В.А., Жадько С.И., Кордюм Е.А., Сидоренко П.Г.* ПОЛ растений при микрогравитационном стрессе // Вестник МГУ. Сер. биолог. 1991. №3. С. 368-374.

*Брагинский А.П.* Комплексные критерии устойчивости водных экологических систем к действию токсических веществ. Сб. Оценка и классификация качества поверхностных вод для водопользования. Харьков, 1979. С. 41.

*Бурдин К.С.* Основы биологического мониторинга. М.: МГУ, 1985. С. 32.

*Дятлов С.Е.* Роль и место биотестирования в комплексном мониторинге загрязнения морской среды // Экология моря. 2000. №51. С. 83-87.

*Кленкин А.А., Корпакова И.Г., Павленко Л.Ф., Темердашев З.А.* Экосистема Азовского моря: антропогенное загрязнение. Краснодар: Просвещение-Юг, 2007. С. 78-98.

*Корпакова И.Г., Афанасьев Д.Ф., Цыбульский И.Е. и др.* Методологические проблемы оценки токсичности компонентов среды методами биотестирования // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2007. №9. С. 23-29.

Методы рыбохозяйственных и природоохранных исследований в Азово-Черноморском бассейне (ред. С.П. Воловик, И.Г. Корпакова). Сб. научн. тр. Краснодар: АзНИИРХ, 2005. 350 с.

*Никаноров А.М.* Научные основы мониторинга качества вод. СПб.: Гидрометеоздат, 2005. 504 с.

*Никитина З.И.* Микробиологический мониторинг наземных экосистем. Новосибирск: Наука, 1991. 222 с.

*Селье Г.* Стресс без дистресса. М.: Наука, 1987. 53 с.

*Фомченков В.М., Холоденко А.Л., Ирхина И.А. и др.* Биотестирование интегральной токсичности загрязненных почв и вод. М.: Изд-во НИИ экономики медицинской промышленности, 1996. 31 с.

*Хрусталеv Ю.П.* Основные проблемы геохимии седиментации в Азовском море. Апатиты: Изд. КНЦ РАН, 1999. 278 с.

*Davoren M., Fogarty A.M.* A test battery for the ecotoxicological evaluation of the agri-chemical Environ // Ecotoxicol Environ Saf. 2004. V. 59. №1. Pp. 116-122.

*Dixon D.R., Pruski A.M., Dixon L.R., Jha A.N.* Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview // Mutagenesis. 2002. V. 17. №6. Pp. 495-507.

*Escher B.I., Bramaz N., Maurer M. et al.* Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater // Environ Toxicol Chem. 2005. V. 24. №3. Pp. 750-758.

Water quality – Algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum*. Draft International Standard ISO/DIS 10253.2. 1994. 12 p.

**ON THE PROBLEM OF TOXICITY ASSESSMENT OF AQUATIC ENVIRONMENTAL COMPONENTS BY METHODS OF BIOLOGICAL TESTING**

© 2008 y. I.G. Korpakova, D.F. Afanasyev, I.E. Tsybul'skij, A.Yu. Vinogradov, M.A. Sazykina, S.Yu. Cherednikov

*Research Institute of the Azov Sea Fishery Problems, Rostov-on-Don*

Methodological problems of biological testing on hydrobionts of different trophic levels are considered. Indices of a nonspecific stress caused in organisms by toxicants can be used successfully for bio-testing. Theoretical aspects are discussed of applying methods of biological testing to assess the quality of aquatic ecosystems.