

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ОЦЕНКЕ ТОКСИЧНОСТИ МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ В МИКРОКОСМЕ ВОДНЫХ РАКООБРАЗНЫХ

DEVELOPMENT OF METHODOICAL APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF TOXICITY IN THE MICROCOSM OF AQUATIC CRUSTACEANS

Е. В. Дроздова, А. В. Фираго
A. Drazdova, A. Firago

Научно-практический центр гигиены,
г. Минск, Республика Беларусь
water@rspch.by

Scientific practical centre of hygiene, Minsk, Republic of Belarus

Проведены исследования по отработке подходов к тестированию острой токсичности воды и водных вытяжек на микрокосме водных тест-организмов – низших ракообразных – Cladocera (*Daphnia magna*) и Ostracoda (*Cypridopsis vidua* и *Heterocypris incongruens*) в лабораторных условиях.

Research on development of methodical approaches for the acute toxicity testing of water and water extracts on the aquatic test-organisms microcosm – lower crustaceans – Cladocera (*Daphnia magna*) and Ostracoda (*Cypridopsis vidua* and *Heterocypris incongruens*) in the laboratory conditions has been conducted.

Ключевые слова: водная токсичность, интегральная токсичность, тест-модели, микрокосм.

Keywords: aquatic toxicity, acute toxicity, aquatic test-models, microcosm.

Основным перспективным направлением, позволяющим оценить интегральную токсичность исследуемых объектов, является биотестирование. Методы биотестирования широко внедряются во всем мире и позволяют оценить риск неблагоприятного воздействия факторов антропогенного происхождения на живые объекты. Цель биотестирования – измерение действительной токсичности образца, обусловленной потенциально присутствующими контаминантами, вызывающими токсический эффект у живых организмов. Под биотестированием понимают процедуру установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Благодаря сравнительной простоте, оперативности, экономичности биотестирование получило широкое признание [1–2].

В настоящее время одной из тенденций совершенствования системы тестирования и оценок объектов среды обитания является максимальное приближение методических подходов биотестирования к естественным условиям. Это позволяет увеличить достоверность получаемых результатов исследований с позиций учета межвидовых взаимодействий. Обозначены несколько тенденций в данном направлении. Наиболее актуальным является разработка подходов по тестированию с применением стандартизованных тест-моделей и тест-моделей на основе видом организмов, характерных для местных экосистем.

Ранее в республиканском унитарном предприятии «Научно-практический центр гигиены» были разработаны тест-модели на основе водных ракообразных, характерных для водных систем Республики Беларусь, – методы оценки острой водной токсичности на *Cypridopsis vidua* и *Heterocypris incongruens*, относящимся к классу ракушковых (Ostracoda). Они позволяют более объективно установить интегральную токсичность объектов окружающей среды, высокочувствительны к присутствию в среде тяжелых металлов, органических поллютантов (в частности – хлорорганических пестицидов) [1–4]. Методики заключаются в экспонировании молоди *C. vidua* или *H. incongruens* водными растворами веществ (их смесей), вытяжек из объектов среды, продукции народного потребления в разных концентрациях в течение 96 и 72 часов соответственно. Интегральная токсичность исследуемых субстратов оценивается по их влиянию на подвижность животных за период экспозиции. Определение иммобилизации проводится визуально в проходящем свете после легкого встряхивания исследуемого субстрата, а при необходимости – микроскопированием. Оценка интегральной токсичности основывается на установлении средней эффективной кратности разбавления вод/вытяжек, вызывающей иммобилизацию 50 % тест-объектов за время экспозиции (ЭКР₅₀) и их безвредной кратности разбавления, вызывающей иммобилизацию не более 10 % тест-объектов за экспозицию (БКР₁₀). Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю эффективную концентрацию (ЭК₅₀) и ее доверительный интервал (P=0,05).

На этапе подготовки к тестированию собирают информацию о тестируемом веществе: растворимость в воде, давление насыщенного пара, химическая устойчивость, константы диссоциации, биоразлагаемость вещества. Дополнительно принимают во внимание: структурную формулу вещества, степень чистоты и стабильность исследуемого вещества в воде и на свету, происхождение и содержание значимых примесей, присутствие добавок, коэффициент распределения n-октанол/вода. Разрабатывают схему исследования: выбор тест-системы (статиче-

ской, полустатической, проточной) в зависимости от стойкости вещества; вспомогательных веществ для тестирования веществ с низкой водорастворимостью, подходящего тест-организма семейства ракообразных (если есть данные об избирательной чувствительности к отдельным классам химических соединений). Для тестирования используют особей из синхронизированных одновозрастных культур без симптомов стресса. Не реже раза в полгода культуру проверяют на пригодность к биотестам путем оценки чувствительности к эталонному (референсному) веществу двухромовокислому калию ($K_2Cr_2O_7$). Тест-культура должна реагировать на референсный токсикант в установленном диапазоне.

В ходе эксперимента ракообразные подвергаются воздействию растворенного в воде вещества в диапазоне концентраций, растворы которых должны готовиться непосредственно перед внесением тест-организмов. Обязательна параллельная постановка контроля (разбавляющая вода без вещества). Контролируют концентрации и pH в начале и конце теста. Для опытов используется инертная в химическом отношении лабораторная посуда. В каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 животных. Повторность в опыте и контроле 3–4-кратная. В течение теста животных не кормят. Через каждые 24 ч подсчитывают количество иммобилизованных животных и удаляют из после регистрации наблюдений.

Тест на установление границ исследования проводится с целью установления диапазона концентраций для окончательного тестирования. Ракообразные экспонируются концентрациям в широком диапазоне, например: 1, 10, 100 мг/л не менее 5 животных на концентрацию. Окончательный тест (2-ой этап биотестирования) заключается в экспонировании животных пятью и более концентрациями, выбранным в геометрической прогрессии с отношением от 1,5 до 2 (например, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 мг/л). На основании полученных данных строят кривую зависимости «концентрация – ответ» и устанавливают значения 48-ч ЭК₅₀.

Результаты испытания считаются достоверными, если иммобилизация в контролях не превышает 10 %.

На основании результатов параллельных определений в контроле и опыте находят средние арифметические количества иммобилизованных животных в контроле (опыте) и рассчитывают в процентах количество иммобилизованных животных в опыте по отношению к контролю. Если полученная величина ≤ 10 % тестируемая проба не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления), при ≥ 50 % считают, что анализируемая проба проявляет острую токсичность. Если проба проявляет острую токсичность, для количественной оценки устанавливают среднее эффективное разбавление (ЭКР₅₀).

Тестирование в микрокосме учитывает все особенности биотестирования на единичной тест-модели, основана на применении 3 тест-организмов: стандартизованного *Daphnia magna* и разработанных нами *Cypridopsis vidua* и *Heterocypris incongruens*. Их помещают в инертные лабораторные емкости – стеклянные стаканы объемом 250 мл, 4 повторности на концентрацию. В зависимости от цели исследования и тестируемого субстрата соотношение организмов различных видов в емкости может быть: 10:10:10 или 10:5:5 или 5:5:5. При учете результатов иммобилизованных животных суммируют вне зависимости от вида. Учет результатов каждые 24 ч, длительность экспозиции – 96 часов. Оценка результатов по критериям для стандартизованных тест-моделей. Выполнены серии экспериментов по апробации подходов при тестировании вытяжек из полимерной продукции, используемой в водоподготовке, и опытных образцов новых наноструктурированных материалов с разной загрузкой тест-объектов. Показано, что при тестировании в микрокосме полученные данные отличаются от данных, полученных в моно моделях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дроздова, Е. В. Оценка интегральной токсичности факторов и объектов среды обитания с использованием альтернативных биологических тест-моделей: методология и технологии / Е. В. Дроздова, Н. В. Дудчик, С. И. Сычик, В. В. Шевляков; М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. унитар. предприятие «Науч.-практ. центр гигиены». – Минск: БелНИИТ «Транстехника», 2017. – 212 с.

2. Дудчик, Н.В. Альтернативные биологические тест-модели в оценке риска воздействия факторов среды обитания / Н. В. Дудчик, Е. В. Дроздова, С. И. Сычик; М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. Унитар. Предприятие «Науч.-практ. Центр гигиены». Минск: БелНИИИ «Транстехника», 2015. – 195 с.

3. Инструкция по применению № 093-1008 «Определение острой токсичности химических веществ, их смесей, природных и сточных вод методом биотестирования с применением ракообразных в качестве тест-объектов (*D.magna* и *C. vidua*)», утв. Главным государственным санитарным врачом РБ 30.12.2008.

4. Дроздова, Е. В. Способ оценки острой водной токсичности тяжелых металлов или веществ органической природы: пат. BY 16203 G 01N 33/00 от 30.08.2012 Респ. Беларусь / Е. В. Дроздова [и др.]; заявитель Респ. науч.-практ. центр гигиены № а 20100814; заявл. 25.05.2010; опубл. 30.08.2012 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – № 4(87). – С. 138.