

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ И ПИТЬЕВЫХ ВОД

**В.В. Гончарук, В.Ф. Коваленко**

Институт коллоидной химии и химии воды  
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев

Поступила 12. 07. 2011 г.

*Представлены научно-теоретические основы биотестирования природных и питьевых вод. Рассмотрено структурное построение процедуры биотестирования в целом и методические подходы оценки качества вод с низким уровнем загрязнения в частности. Даны определения процесса биотестирования и охарактеризованы физико-химические факторы, влияющие на формирование результата биотестирования. Приведены примеры положительного опыта применения комплексного биотестирования природных и питьевых вод.*

**Ключевые слова:** биотестирование вод, методические подходы, оценка качества питьевых вод, физико-химические факторы.

**Введение.** Одним из важных направлений прикладной экологии является разработка эффективных биологических методов оценки состояния гидросферы, загрязнение которой токсическими веществами в настоящее время приобрело комплексный характер. Даже при определении содержания всех загрязняющих веществ в поверхностных водах, такая информация остается недостаточной для каких-либо прогнозов, так как токсикометрические параметры установлены лишь для незначительной части этих веществ. Кроме того, результат комбинированного действия двух и более токсических веществ, имеющихся в исследуемом образце в небольших количествах, предвидеть достаточно сложно. Так, нетоксические вещества при изолированном действии могут вызывать значительный патологический эффект при их комбинировании. Поэтому для оценки токсичности природных вод, в том числе и питьевых, используют тесты на различных животных и растительных организмах. Предоставляя мало информации о природе поллютанта, биотестирование дает возможность с большей достоверностью определить степень интегральной токсичности объекта исследования.

Методы биотестирования обладают высокой чувствительностью, экспрессностью, надежностью, универсальностью и малой себестоимостью. Они просты в проведении, поддаются инструментализации и автома-

© В.В. ГОНЧАРУК, В.Ф. КОВАЛЕНКО, 2012

тизации, а их результаты легко интерпретируемы. В отличие от химических и физико-химических методов анализа, биотестирование позволяет прогнозировать интегральное воздействие исследуемой воды на живые организмы, поскольку реакция биологической тест-системы зависит не только от отдельных токсических соединений, содержащихся в объекте исследования, но и от их взаимодействия между собой. Следует также отметить, что по сравнению с биотестами на высших теплокровных животных они обладают значительными преимуществами в экономической, методической и этической сферах.

Недостаточность теоретического описания биотестирования на животных и растительных организмах влечет за собой разнообразные проблемы в практическом воплощении конкретных методик. Тест-организмы зачастую подбираются без учета их биологических особенностей. Они культивируются на нестандартных средах и в произвольных условиях; во многих методиках процесс подготовки тест-системы к анализу отсутствует как таковой; уровень чувствительности у биотестов далеко не всегда соответствует поставленным задачам. Используемые критерии для оценки степени проявления тест-реакции в ряде случаев имеют малую информативность по сравнению с альтернативными. Все это приводит к искажению результатов, неверной их интерпретации, снижению объективности выводов, а иногда и к дискредитации биотестирования как метода научного исследования.

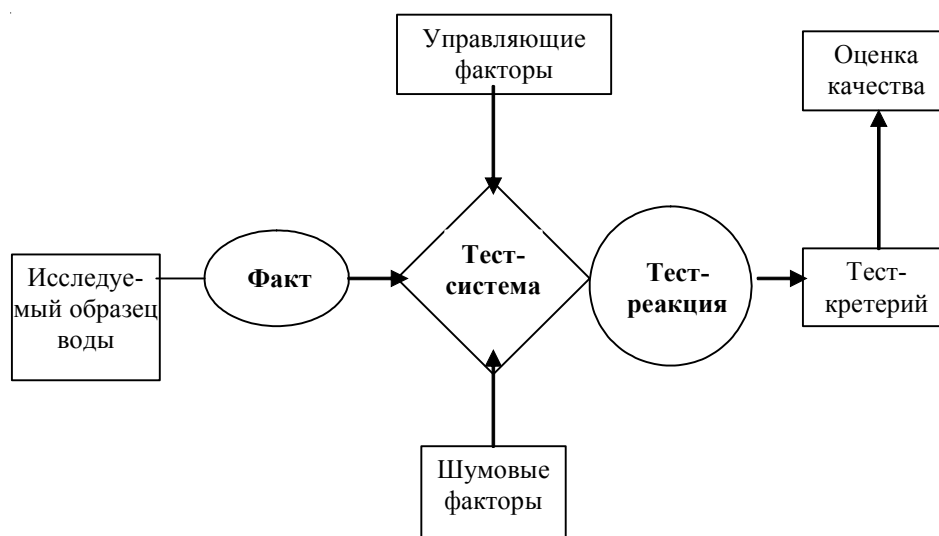
По этим причинам в настоящее время особую важность приобретает вопрос о комплексном подходе в биотестировании. В первую очередь необходим глубокий теоретический анализ этой группы методов. Создание единой концепции оценки качества водной среды по реакции тест-организмов должно способствовать развитию, стандартизации и унификации уже разработанных методов, а также созданию новых, более совершенных.

Комплексное рассмотрение биологических тестов позволило нам вычленивать их общие черты и составить универсальную формулировку определения, в котором преодолены проблемы узости сферы использования биотестирования и адекватности описания биологической основы, на которой проводится тест. Итак, *биотестирование – это оценка свойств изучаемого объекта по его воздействию на биологическую тест-систему в стандартных условиях*. Данная формулировка включает в сферу рассмотрения любые методы, в которых для изучения какого-либо явления используются биологические объекты. Это позволяет анализировать и сопоставлять с единой точки зрения биологические тесты, применяемые в разных областях [1].

Введение понятия "тест-система" не является случайным. Как правило, для обозначения живого элемента, на котором проводится биоло-

гическое тестирование, используют иные понятия, как, например, "тест-организм" и "тест-объект". Между тем в общем случае мы имеем дело не просто с отдельными организмами, а с биологической системой с внутренней структурой, определяемой связями между ее биологическими элементами и средой, в которой они находятся. Такая система может состоять из группы организмов одного вида, сообщества нескольких видов, целой экосистемы, или же может включать отдельные органы и ткани организма, культуру клеток, изолированные органеллы, ферменты и др. Эти биологические элементы распределены в среде и заключены в определенном объеме. Именно тест-система, а не просто отдельные живые организмы, является центральным элементом процесса биотестирования, и уяснение сути этого термина дает ключ к научному пониманию процесса биотестирования как такового, а следовательно, и к целенаправленному управлению им. *Тест-система – это пространственно ограниченная совокупность чувствительных биологических элементов и среды, в которой они находятся.*

Принцип, лежащий в основе биотестирования как процесса преобразования материального потока в информационный, можно представить в виде схемы (рисунок).



*Принципиальная схема биотестирования.*

Процесс постановки биологического теста начинается с того, что исследуемый образец переводят в состояние, удобное для проведения эксперимента, т.е. получают действующую форму, после чего осуществляют ее контакт с тест-системой. На тест-систему действуют три группы

факторов. Первая группа объединяет факторы исследуемого образца. К ним, например, относятся токсические вещества, которые содержатся в исследуемом объекте. Воздействие факторов этой группы и подлежит оценке в процессе биотестирования, т. е. является целевым. Вторая группа факторов объединяет различные посторонние воздействия и "шумовые" помехи. Это могут быть изменения температуры, освещения и прочих условий, которые сказываются на состоянии тест-системы. Данные факторы не всегда удается учитывать и устранять, тем не менее необходимо стремиться к минимизации их воздействия. К третьей группе факторов относятся разнообразные воздействия, которые наносят на тест-систему намеренно с целью регулирования ее чувствительности. Они играют роль физиологической нагрузки и их применение может повысить чувствительность тест-систем на один – два порядка.

В результате действия всех указанных факторов тест-объекты и вся тест-система в целом претерпевают некоторую трансформацию, что проявляется в изменении состояния тест-системы и появлении ряда реакций на различных уровнях ее функционирования. Данные реакции различаются по чувствительности, скорости проявления, легкости наблюдения и другим параметрам. Одну или несколько из этих реакций выбирают в качестве тест-реакции. Этот термин можно определить следующим образом. *Тест-реакция – это одна из закономерно возникающих ответных реакций тест-системы на воздействие комплекса внешних факторов, выбранная для анализа состояния данной тест-системы.*

По степени проявления тест-реакции судят о свойствах (качествах) исследуемого водного образца. Степень проявления тест-реакции определяют по некоторому критерию. При этом одной реакции может соответствовать несколько различных критериев. Например, исследуя тест-реакцию гибели организмов, можно регистрировать либо количество погибших особей за определенный промежуток времени, либо время, в течение которого погибает определенная часть задействованных в опыте животных [2]. *Тест-критерий – это показатель, на основании которого оценивают изменение состояния тест-системы, находящейся под воздействием комплекса внешних факторов.*

Таким образом, основной результат биотестирования – оценка свойств исследуемого объекта зависит от ряда факторов [3]: способа донесения действующего начала до тест-системы, характеристик самой тест-системы (вид тест-организмов, из которых состоит тест-система; их количество; состояние в момент тестирования и состав среды, в которой они находятся), комплекса посторонних воздействий, выбранной тест-реакции и способа ее наблюдения, тест-критерия и, наконец, квалификации исследователя.

**Воздействия на тест-систему.** В общем случае ответные реакции формируются в тест-системе, как результат целого комплекса внешних воздействий. Основным из них, интересующим исследователя в первую очередь, является фактор изучаемого образца. Как правило, практические работники имеют дело с комплексным загрязнением исследуемой воды. И ценность биотестирования во многом обусловлена возможностью проводить оценку интегральной токсичности объекта исследования. 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 в сочетании с другими способны снижать воздействие, а иные, не являясь сами по себе токсическими, могут его увеличивать. Важно, что только методы биотестирования способны дать адекватное представление о воздействии смесей различных химических веществ в воде на живые системы.

**Практическая реализация научных основ биотестирования.** Одной из задач, стоявших перед авторами, явилась разработка комплексного подхода в биотестировании вод с низким уровнем загрязнения – природных и питьевых вод. Применение батареи животных и растительных тест-организмов позволяет определять качество водных образцов с высокой эффективностью, экспрессностью, низкой себестоимостью и не требует привлечения специалистов высокой квалификации. В лаборатории биотестирования Института коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского НАН Украины созданы условия, которые позволяют осуществлять полный цикл мероприятий по систематическому культивированию 5 – 6 линий тест-организмов с помощью стандартных технических средств, имеющихся в любой специализированной лаборатории.

Естественно, что биотестирование, особенно при использовании одиночных биотестов, должно применяться совместно с методами аналитической химии, а в случаях оценки риска для здоровья человека изучаемых водных проб – с результатами стандартных санитарно-гигиенических методик. Однако перспективность и эффективность биологического подхода для экспресс-анализа качества различных типов вод, а также оценки токсичности растворенных веществ не вызывают сомнений.

С целью наиболее эффективного анализа качества природных и питьевых вод различного происхождения методами биотестирования подбираются тест-организмы, как правило, гидробионты, которые отвечают определенным требованиям. Критерии отбора, оптимальные для конкретных условий и в то же время простые для использования набора биотестов, следующие:

– наличие тест-организмов не менее двух трофических уровней. Это тот минимум, который обеспечит необходимый спектр чувствительности к воздействиям токсических веществ;

– биотесты из набора должны обладать высокой чувствительностью на действие многих токсических веществ, видоспецифичность тестов по чувствительности к действию различных агентов должна дополнять друг друга;

– методы биотестирования должны быть стандартизированными и легко воспроизводимыми.

При тестировании сточных и загрязненных природных вод не возникает трудностей с получением четкого и достоверного ответа тест-организмов на токсичность водной среды. А определить качество вод с низким уровнем загрязнения или питьевых вод возможно только с подключением чувствительных тест-функций, изменения которых при действии неблагоприятных факторов начинаются задолго до гибели тест-объекта.

Из стандартизированных биотестов для оценки качества питьевых вод рекомендуется применение методов биотестирования с помощью ветвистоусых рачков: дафний (*Daphnia magna*) и цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*). Эти методы детально разработаны Украинским научно-исследовательским институтом экологических проблем Мин-экоресурсов и утверждены как национальные стандарты Украины: ДСТУ 4173:2003 и ДСТУ 4174:2003 [4,5]. Украинские стандарты соответствуют в модифицированной форме международным стандартам – ISO 6341:1996 и ISO 10706:2000 [6,7]. Сущность методов заключается в регистрации разницы между выживаемостью или плодовитостью дафний и цериодафний в исследуемых водах и водной средой, в которой тест-организмы культивируются (контроль). Критерием острой летальной токсичности является гибель 50% и более особей дафний или цериодафний в опыте по сравнению с контрольными показателями. Основной принцип биотестирования основан на адаптации тест-организмов к "образцовым" условиям культивирования, и при переносе их в другие исследуемые условия – регистрации наличия тест-реакций. Этот принцип предложен Н.В. Тимофеевым-Ресовским [8] на примере плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*) с регистрацией генетических изменений. Методики биотестирования достаточно просты, не требуют дорогостоящего специального оборудования, информативны и экспрессивны.

Кроме ракообразных в батарею биотестов включены и кишечнополостные – пресноводная гидра (*Hydra attenuata*), рыбы данио рерио (*Brachidanio rerio*), а также эмбриогенез их яйцеклеток, и представитель растительных организмов – озимая пшеница (*Triticum durum*) сорта "Мионовская 808".

Используя ряд растительных и животных тест-объектов, а также цитологические и генетические методики, проделан большой объем работ по оценке качества различных питьевых вод: водопроводной, обессоленных [9], артезианских бюветных [10], а также около 50 марок бутилированных вод [11, 12]. Полученные результаты биотестирования объективно отражают качество исследованных питьевых вод и подтверждаются данными химико-аналитических методик.

**Выводы.** Изучены основные теоретические аспекты биотестирования как метода токсикологического анализа природных и питьевых вод. Они включают в себя:

- связанную систему оригинальных определений основных терминов, используемых в биотестировании;
- схему постановки биологического теста как процесса превращения материального потока, представленного исследуемым водным образцом и его действующей формой, в информационный, результатом которого является оценка этого образца;
- описание внутренней структуры тест-системы как центрального звена процесса биотестирования, а также трех групп факторов внешних воздействий на тест-систему;
- пути оптимизации, стандартизации и управления тест-системой и процессом биотестирования в целом.

Приведены примеры положительного опыта использования методов биотестирования для оценки качества природных и питьевых вод.

**Резюме.** Надані науково-теоретичні засади біотестування природних та питних вод. Розглянута структурна побудова процедури біотестування в цілому і методичні підходи оцінки якості вод з низьким рівнем забруднення зокрема. Подано визначення процесу біотестування та охарактеризовані фізико-хімічні фактори впливу на формування результату біотестування. Наведені приклади використання комплексного біотестування природних та питних вод.

*V.V. Goncharuk, V.F. Kovalenko*

## **THEORETICAL ASPECTS OF BIOASSAYS OF NATURAL AND DRINKING WATERS**

### **Summary**

Provided scientific and theoretical basis of natural and biological testing of drinking water. The structural construction procedures bioassays in general and methodological approaches assess water quality with low pollution in

particular. Field defining bioassays and characterized physical-chemical factors influence the outcome of bioassays. The examples of the use of complex natural and biological testing of drinking water.

#### Список литературы

- [1] Лесников Л.А. // Теоретические вопросы биотестирования. – Волгоград, 1983. – С.3 – 12.
- [2] Строганов Н.С. // Критерий токсичности и принципы методик по водной токсикологии. – М., 1973. – С.14 – 29.
- [3] Флеров Б.А. // Теоретические вопросы биотестирования. – Волгоград, 1983. – С.13 – 29.
- [4] ДСТУ 4173:2003. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea). – Київ: Держспоживстандарт України, 2004. – 17 с.
- [5] ДСТУ 4174:2003. Визначення хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea). – Київ: Держспоживстандарт України, 2004. – 22 с.
- [6] ISO 6341:1996. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.
- [7] ISO 10706:2000. Water quality – Determination of long term toxicity of substances *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- [8] Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. – М.: Наука, 1978. – 408 с.
- [9] Архипчук В.В., Гончарук В.В. // Химия и технология воды. – 2003. – 25, №2. – С.191 – 200.
- [10] Исламов В.О., Вергальяс М.Р., Мосійчук Т.В. // Оцінка якості артезіанських та бутильованих питних вод методами біотестування. Охорона водного басейну та контроль якості води. – Київ, 2004. – С.121 – 124.
- [11] Архипчук В.В., Гончарук В.В. // Химия и технология воды. – 2004. – 26, №5. – С.485 – 525.
- [12] Гончарук В.В., Архипчук В.В., Терлецька Г.В., Корчак Г.І. // Вісн. НАН України. – 2005. – №3. – С.47 – 58.