

Водные биологические ресурсы

УДК: 574.64, 502.1

Требования национальных и международных стандартов к качеству культивационной воды в практике применения гидробионтов для оценки экологической токсичности

Е.В. Федосеева¹, к.б.н., М.М. Гладкова², П.В. Учанов³, В.А. Терехова^{1,2}, д.б.н.

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

³ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Обобщены требования стандартов и методических руководств к условиям культивирования пресноводных гидробионтов в токсикологических исследованиях по оценке качества окружающей среды. Подчеркивается влияние качества воды на результаты биотестов. Критически рассмотрен перечень показателей, рекомендуемых для контроля химических и физических характеристик исследуемых проб вод непостоянного качества. Приводится оптимальный состав синтетических сред, используемых для культивирования пресноводных гидробионтов. *Обосновываются рекомендации* по применению воды идентичного состава для культивирования пресноводных гидробионтов и разведения проб при исследовании степени их экотоксичности, а также оценке чувствительности тест-культур к модельному токсиканту (токсиканту сравнения).

Ключевые слова: экологическая токсичность, биотестирование, гидробионты, отходы, стандарты, межлабораторные сравнения, культивационная вода, природная вода, синтетические среды.

Введение

Биотестирование как способ оценки токсичности объектов окружающей среды включено в экологическое законодательство во многих странах, в том числе в России. В нашей стране широко практическому использованию биотестов способствовало издание в 2001 г. приказа № 511 МПР России «Об утверждении Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды». До этого биотестирование в природоохранной сфере применялось в основном для оценки качества рыбохозяйственных водоемов. Согласно данному документу, при характеристике опасности отходов, наряду с расчетом содержания определенных токсичных компонентов, анализируемых химическими методами, проводят экспериментальную оценку токсичности объектов на основе реакции гидробионтов. В настоящее время необходимость такой оценки регламентируется приказом Минприроды России от 04.12.2014 № 536 «Об утверждении Критери-

ев отнесения отходов к I-V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду».

Процедура биотестирования описана в большом количестве соответствующих международных стандартов. Наиболее распространенные стандартные методики подготовлены Организацией экономического сотрудничества и развития (OECD) и Международной организацией по стандартизации (ISO). Наряду с этим стандартные методы также регламентированы такими организациями как Американский центр по испытанию материалов (ASTM), Министерство экологии и изменений климата Канады (EC), Британский институт стандартов (BSI) и Немецкий институт по стандартизации (DIN). В России приемы биотестирования отражены в государственных стандартах и методиках токсикологического анализа, зарегистрированных, в частности, в реестре Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений. Ранее для экологического

анализа рекомендовались методики, также зарегистрированные в федеральных реестрах методик выполнения измерений Росстандарта (МВИ ФР) и природоохранных нормативных документов (МВИ ПНД Ф).

Широкий спектр методик биотестирования, соответствующих отдельным стандартам, на практике нередко приводит к сбоям в определении степени безопасности исследуемых веществ, в установлении класса опасности отходов, к различным несоответствиям при межлабораторных сравнительных испытаниях, когда испытания проводятся по одной и той же методике в разных лабораториях. Причиной этому, как оказалось, в большинстве случаев является разнообразие требований, а нередко несоблюдение условий проведения анализа водных сред.

Цель работы — привлечь внимание к вопросу влияния качества фоновой водной среды при испытании проб на ответные реакции тест-организмов. Предпринята попытка проанализировать разнообразие требований к условиям проведения биотестов на основе гидробионтов, вычленив и систематизировав наиболее значимые и важные, которые неукоснительно должны соблюдаться в высококачественных исследованиях.

Требования к качеству природной и водопроводной воды при биотестировании

Приемлемость биотестов как эффективных аналитических инструментов гарантируется их *стандартизацией* и соответствием метрологическим характеристикам [1, 2]. Согласно методическим руководствам OECD [3-6], основными условиями биотестирования, которые должны быть стандартизованы, являются: а) способы подготовки исходных проб и испытуемых растворов (разбавлений); б) характеристика и состав культивационной воды и воды для разбавления проб; в) условия экспозиции (температура, режим и интенсивность освещенности, уровень растворенного кислорода, рН и др.). В российской практике, к сожалению, требования к стандартизации условий не всегда строго выдерживаются, поскольку многие лаборатории не оснащены оборудованием для обеспечения климат-контроля при культивировании тест-организмов и проведении биотестирования [7].

Исключительная важность *качества воды*, используемой для культивирования тест-культур и разведения проб, подчеркивается во многих нормативных документах и научной литературе [3-9]. Зарубежными стандартами [3-6, 8, 10] допускается использование несколько вариантов получения водных сред, пригодных для культивирования организмов и разведения проб: природная вода

(поверхностная или подземная), дехлорированная водопроводная вода и синтетические среды (английские варианты: synthetic medias, synthetic water, reconstituted water, artificial media, reagent water). Природная и водопроводная вода в английском варианте объединяются под названиями receiving water или acceptable water (далее в тексте «вода приемлемого качества»). Рекомендуется применение одной и той же воды для культивирования и разведения проб.

В российской практике воду для культивирования и разведения проб (в экспериментах с ракообразными и простейшими) чаще всего готовят на основе питьевой водопроводной воды отстаиванием и аэрацией в течение 3-7 суток в стеклянных емкостях в присутствии высшей водной растительности, так называемую, «биологизированную» воду. При отсутствии водопроводной воды удовлетворительного качества допускается использование бутилированной негазированной питьевой воды или поверхностной пресной или грунтовой воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через мембранный фильтр с размером пор 3,5 мкм [11].

Качество воды для биотестов можно оценить по ряду основных показателей: минерализация, жесткость воды, уровень рН и концентрация растворенного кислорода [12]. Рекомендуемые значения рН и содержания растворенного кислорода в культивационной воде природной и/или водопроводной несколько варьируют в методических документах разных стран, но в целом укладываются в диапазоны, указанные в *табл. 1*. Рекомендуемые значения жесткости (CaCO_3 , мг/дм³) являются более видоспецифичными и в документах различаются в существенно большей степени: от 25 [10] до 400 мг/дм³ [6]. Например, уровень жесткости в пределах 140-250 мг/дм³ рекомендуется для дафний в международных стандартах [3,5]; 80-250 мг/дм³ — для дафний в отечественной практике [11-13]; 80-100 мг/дм³ — для теста с цериодафниями в руководстве ЕРА [8];

Наряду с этим подчеркивается необходимость контроля и ряда других параметров, в том числе количества ионов металлов, органического углерода, хлора и хлорпроизводных соединений. Так, количество Al, As, Cr, Co, Fe, Pb, Ni, Zn не должно превышать 1 мкг/дм³ каждого; содержание Cd, Hg, Ag не должно превышать 100 нг/дм³ каждого [3-6, 8, 15]. Согласно этим же документам, содержание общих органических хлорсодержащих пестицидов, включая полихлорированные бифенилы, должно быть <50 нг/дм³. При использовании воды из природных источников следует контролировать проводимость и общее содержание органического углерода (<2 мг/дм³), или химическое

Некоторые показатели культивационной воды, рекомендованные разными нормативными документами для биотестирования

Показатель	Методики [3,5]	Методика [8] Вода средней жесткости	Стандарты и методические рекомендации РФ [11-13, 16-17]
pH	6-9	7,4-7,8	7,0-8,5
Жесткость по CaCO ₃ , мг/дм ³	<400	80-100	80-250
Кислород, мг/дм ³	≥ 3	-	≥ 6,0
Взвешенные частицы, мг/дм ³	<20	-	-
Общий органический углерод, мг/дм ³	<2	-	-
Неионизированный аммиак, мкг/дм ³	<1	-	-
Остаточный хлор, мкг/дм ³	<10	-	-
Общие органические фосфоросодержащие пестициды, нг/дм ³	<50	<50	-
Общие органические хлорсодержащие пестициды, включая полихлорированные бифенилы, нг/дм ³	<50	<50	-
Общий органический хлор, нг/дм ³	<25	-	-

потребление кислорода (<25 мг/дм³) [3-6]. При использовании дехлорированной *водопроводной воды* желателен анализ хлора (<10 мкг/дм³) [3-6]. В российских методиках [11] указывается также на недопустимость присутствия в культивационной воде антагонистических для тест-культур организмов и пищевых конкурентов.

Тест-культура, помещенная в культивируемую воду, не должна проявлять признаков стресса и хорошо воспроизводиться. Тип воды может зависеть от цели исследования [8]. Документ [18] предлагает следующие типы воды для различных водных образцов: для стоков, элюатов и фильтратов – вода приемлемого качества или синтетические среды; для природной воды – синтетические среды или вода, отобранная на станции отбора проб, расположенной выше по течению; для модельных токсикантов – синтетические среды; для химикатов – вода приемлемого качества или синтетические среды.

К качеству *природной воды* предъявляются особые требования в связи с тем, что состав природных вод может значительно меняться в зависимости от сезона и региона [19]. Поэтому в период экспериментальных испытаний необходимо следить за тем, чтобы вода соответствовала заданным химическим характеристикам и была постоянного качества. Состав природной, а также водопроводной, воды и ее пригодность для биотестов, рекомендуется оценивать, по крайней мере, дважды в год или когда есть подозрение, что ее характеристики могут значительно измениться [8]. Вода может быть адаптирована до оптимальных условий обитания с помощью особых процедур, например, фильтрованием, дехлорирова-

нием, подщелачиванием или подкислением и т.п. В отдельных случаях для культивирования рыб успешно использовали водопроводную воду, профильтрованную с помощью активированного угля (в английском варианте – charcoal filtered water) [20]. В отсутствие доступной природной или водопроводной воды приемлемого качества возможны следующие варианты получения качественной среды для культивирования и разбавления.

Описание системы подготовки биологизированной воды в аквариумах

В лаборатории водной токсикологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова предложена *система подготовки лабораторной воды*, состоящая из трехступенчатой очистки и ее биологизации [21]. В лаборатории экотоксикологического анализа почв МГУ им. М.В. Ломоносова (ЛЭТАП) апробирована данная система, и предложен вариант для непрерывной производственной работы лаборатории, представляющий собой две независимые системы, размещенные на стеллаже и состоящие из трех аквариумов каждая. Перед заполнением первого аквариума каждого из ярусов вода проходит трехступенчатую очистку через бытовой проточный фильтр (Гейзер ЗИВС люкс). В первом аквариуме вода отстаивается и дехлорируется в течение двух недель с использованием микрокомпрессора (Sera air 550 R plus) для ее принудительной аэрации атмосферным воздухом. Далее вода из первого аквариума переливается во второй с кварцевым песком и высшей водной растительностью, необходимой для ее биологизации. Многочисленные данные свидетельствуют об активной средообра-

зующей роли высших водных растений, насыщением воды метаболитами макрофитов [22]. Вода во втором аквариуме непрерывно фильтруется внешним фильтром (Tetra EX 600 Plus), которой необходим для очистки воды от мути, перемешивания верхних и нижних слоев воды, способствуя газообмену воды аквариума с воздухом помещения. Освещение в аквариуме работает 12 часов в сутки, регулируется розеткой-таймером. Вода во втором аквариуме биологизируется в течение 14 дней, далее готовая вода переливается в третий аквариум с микрокомпрессором. Затем вода используется для культивирования гидробионтов и разведения проб в ходе экотоксикологических экспериментов. Во всех аквариумах для перелива применяются шланги с помпами (Sera FP 350), что обеспечивает более удобную подготовку воды.

Полученная биологизированная вода имеет следующие гидрохимические показатели воды, которые варьируют в пределах: pH – 8,0-8,5; солесодержание – 0,2-0,3 г/дм³, содержание кислорода – 8-11,5 мг/дм³. Адаптация гидробионтов *Daphnia magna* и *Ceriodaphnia affinis* к биологизированной воде дала воспроизводимый результат по определению чувствительности тест-культур к модельному токсиканту – дихромату калия. Согласно методикам биотестирования для дафний [13] и цериодафний [14], эффективные (действующие) концентрации модельного токсиканта (калий дихромат), при действии которого в течение 24 часов гибнет 50% особей, лежит в диапазоне 0,9-2,0 мг/дм³ [13]. В ЛЭТАП по полученным кварталным исследованиям полулетальная концентрация дихромата калия ЛК₅₀₋₂₄ находилась в диапазоне 0,96-1,33 мг/дм³ для дафний и

0,91-1,65 мг/дм³ для цериодафний. Это говорит о том, что биологизированную воду можно использовать для целей культивирования гидробионтов и биотестирования, с учетом контроля качества исходной водопроводной воды.

Пресноводные синтетические среды

Наиболее успешные для культивирования различных беспозвоночных организмов и применяемые сегодня синтетические среды представлены в табл. 2.

Состав сред M4 and M7 достаточно сложен. Помимо питательных макроэлементов (указанных в табл. 2), в данные среды включают следовые количества H₃BO₃, MnCl₂*4H₂O, LiCl, RbCl, SrCl₂*6H₂O, NaBr, Na₂MoO₄*2H₂O, CuCl₂*2H₂O, ZnCl₂, CaCl₂*6H₂O, KI, Na₂SeO₃, NH₄VO₃, Na₂EDTA*2H₂O, FeSO₄*7H₂O, а также витамины – тиамин гидрохлорид, цианокобаламин (B12), биотин. Причем, среда M4 является более жесткой, и микроэлементы (кроме ZnCl₂, CaCl₂*6H₂O, KI, Na₂SeO₃, NH₄VO₃) в ее составе содержатся в 4-кратном количестве по сравнению со средой M7. Среда M4 впервые была описана ученым Б.П. Элендтом в 1990 г., тем не менее, сегодня она готовится согласно описанию 1990 г. двух авторов, Элендта и Биаса [23].

Необходимо отметить, что в случае ожидаемого взаимодействия между ионами жесткости и тестируемым веществом, рекомендуется использование воды меньшей жесткости, поэтому применение среды M4 весьма нежелательно [3, 5-6]. Документ [8] также предусматривает приготовление синтетических сред с градацией жесткости: очень мягкая, мягкая, средней жест-

Таблица 2

Состав некоторых синтетических сред для культивирования водных беспозвоночных животных

Питательные элементы	* Стандартная пресная вода на деионизированной воде согласно [8] Вода средней жесткости	** Стандартная пресная вода на деионизированной или дистиллированной воде согласно [10] (ISO medium)	*** Среды M4 и M7 согласно стандартам [3,5-6]
	Концентрация, мг / дм ³		
NaHCO ₃	96	67,75	64,8
CaCl ₂ *2H ₂ O	120	294	293,8
MgSO ₄ *7H ₂ O	123	123,25	123,3
KCl	4	5,75	5,8
NaSiO ₃ *9H ₂ O	-	-	10,0
NaNO ₃	-	-	0,274
KH ₂ PO ₄	-	-	0,143
K ₂ HPO ₄	-	-	0,184

Примечания:

* для коловраток и ракообразных, кроме дафний

** для дафний

*** для ракообразных и личинок хирономид.

кости, жесткая, очень жесткая. Однако наиболее распространенной является синтетическая среда средней жесткости (в английском варианте — moderately hard water).

В ЛЭТАП был поставлен эксперимент по адаптации культуры *D. magna* к синтетической среде, согласно требованиям [10] — ISO medium. После адаптации нескольких поколений дафний полулетальная концентрация дихромата калия ЛК50-24 составляла для дафний 1,41 мг/дм³. То есть чувствительность культуры дафний находилась в допустимом диапазоне для ее использования в биотестировании. Следует отметить, что до этого культура дафний, культивируемая на бутилированной негазированной воде, оказалась более чувствительной относительно допустимого диапазона. Это свидетельствует о возможности адаптации *D. magna* к данной синтетической среде, хотя литературные данные свидетельствуют о более успешном применении сред М4 и М7. Отмечают, что выживаемость и репродуктивность *D. magna* является наилучшей в среде М4 и среде Ааченера для дафний (Aachener Daphnien Medium — ADAM), приготовленной на основе синтетических морских солей и аналитически чистых химических соединений [19]. В работе других авторов синтетическая среда согласно [10] успешно использовалась для инкубации цист пресноводных коловраток *Brachionus calyciflorus* [24].

Заключение

Обобщая сказанное, можно заключить, что получение воспроизводимых результатов биотестирования требует использования стандартной культивационной воды как среды обитания гидробионтов в лабораторных условиях, а также среды для приготовления водных вытяжек и раз-

бавления проб. Надежность тест-культур проверяется по чувствительности к модельному токсиканту, который растворяется в культивационной воде. Реакция гидробионтов на модельный токсикант в большой степени зависит от качества среды, в которой они культивируются и, следовательно, проводятся испытания.

Состав синтетических питательных сред для культивирования микроводорослей, которые используются в биотестировании, легко контролировать приготовлением навесок химических реагентов. Однако в биотестах с применением ракообразных такие синтетические среды используются редко.

Как правило, для культивирования тест-культур ракообразных, как и для разбавления анализируемых проб, используется природная и водопроводная вода, требования к которым изложены в разных вариантах национальных и международных стандартов. Именно небольшие различия в составах вод и могут быть причиной неудовлетворительных результатов межлабораторных испытаний и количественных оценок степени опасности анализируемых проб, включая установление класса опасности отходов. Возможный выход из таких сложных ситуаций мы видим в более полном анализе химического состава воды, которая идет на приготовление проб и выращивания тест-организмов, в уточнении требований стандартов качества культивационной воды и их неуклонное выполнение.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-50-00029, проект «Научные основы создания банка депозитария живых систем»

Литература

1. Ratte H.T., Hammers-Wirtz M., Cleuvers M. Ecotoxicity testing / Bioindicators and biomonitoring (B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, ed.), Chapter 7. — Elsevier Science Ltd., 2003. — Pp. 221-256.
2. Hernando M.D., Malato O., Farré M., Fernandez-Alba A.R., Barceló D. Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri* // *Talanta*, 2006. V. 69. I. 2. — Pp. 370-376.
3. OECD. Guideline for the testing of chemicals 202: *Daphnia* sp., acute immobilisation test. Adopted 13 April 2004, Paris (FR). — 12 p.
4. OECD. Guideline for the testing of chemicals 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Adopted 28 July 2011, Paris (FR). — 25 p.
5. OECD. Guideline for the testing of chemicals 211: *Daphnia magna* reproduction test. Adopted 02 Oct 2012, Paris (FR). — 20 p.
6. OECD. Guideline for the testing of chemicals 235: *Chironomus* sp., acute immobilisation test. Adopted 28 July 2011, Paris (FR). — 16 p.
7. Григорьев Ю.С., Шашкова Т.Л., Стравинские Е.С. Биотестирование в системе экологического мониторинга качества вод: решаемые задачи и условия, обеспечивающие получение воспроизводимых результатов / Матер. Всерос. конф. по водной экотоксикологии: Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы (Борок, 28 октября — 1 ноября 2014 г.). Т. 1, 2014. — С. 130-132.
8. US EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 4th Edition. — EPA/600/4/-90/027F, 1994. — 28 p.
9. Федосеева Е.В., Сапункова Н.Ю., Терехова В.А. Практическая экотоксикология: оценка чувствительности биотест-культур: Учебное пособие / Под ред. В.А. Тереховой. — М.: ГЕОС, 2016. — С. 54.

10. ISO 6341:2012. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. – 22 p.

11. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета ПНД ФТ 14.1:2:3:4.12-06 Т 16.1:2:3:3.9-06. – М., 2014. – 39 с.

12. Чалова И.В., Крылов А.В. Оценка качества природных и сточных вод методами биотестирования с использованием ветвистоусых ракообразных (Cladocera, Crustacea): научно-методическое издание. – Рыбинск: Изд-во ОАО «Рыбинский Дом печати», 2007. – 73 с.

13. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР.1.39.2007.03222. – М.: АКВАРОС, 2007. – 52 с.

14. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. ФР.1.39.2007.03221. – М.: АКВАРОС, 2007. – 56 с.

15. APHA. Standard methods for examination of water and waste water. – Washington: AWWA, 1992. – 36 p.

16. Вавилова В. М., Терехова В.А. Условия отбора и подготовки проб для некоторых методов биотестирования вод, почв и отходов / Учебно-метод. пособие. – М.: Макс Пресс МГУ, 2009. – С. 40.

17. Терехова В.А., Воронина Л.П., Гершкович Д.М., Ипатова В. И., Исакова Е. Ф., Котелевцев С.В., Попутникова Т.О., Рахлеева А. А., Самойлова Т. А., Филенко О.Ф. Биотест-системы для задач экологического кон-

троля: Методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур. – М.: Доброе слово, 2014. – С. 48.

18. EC. Biological test method: Growth inhibition test using a Freshwater Alga. – Ottawa: Environmental Protection Series, Environment Canada, 2007. Report EPS 1/RM/25. – 78 p.

19. Klüttgen B., Dülmer U., Engels M. and Ratte H.T. Adam, an artificial freshwater for the culture of zooplankton // Water Resources, 1994. V. 28. № 3. – P. 743-746.

20. Jin M., Zhang X., Wang L., Huang Ch., Zhang Y., Zhao M. Developmental toxicity of bifenthrin in embryonal stages of zebrafish // Aquatic Toxicology, 2009. № 95. – Pp. 347-354.

21. Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф., Гершкович Д.М., Ипатова В.И., Дмитриева А.Г. Биотестирование качества среды с использованием гидробионтов. Раздел большого практикума по гидробиологии: Учебно-методическое пособие. – М.: МГУ, 2015. – 44 с.

22. Кирпенко Н.И., Усенко О.М. Влияние высших водных растений на микроводоросли (обзор) // Гидробиологический журнал, 2012. Т. 48. № 6. – С. 66-88.

23. Elendt B.P., Bias W.R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna* // Water Resources, 1990. № 24. – Pp. 1157-1167.

24. Sanchez-Fortun S., Barahona M.V. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms // Chemosphere, 2005. № 59. – Pp. 553-559.

Сведения об авторах:

Федосеева Елена Васильевна, к.б.н., ассистент, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова (РНИМУ им. Н.И. Пирогова); тел.: 8 (925) 625-43-51, e-mail: elenfedoseeva@gmail.com.

Гладкова Марина Михайловна, сотрудник лаборатории Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (МГУ им. М.В. Ломоносова); тел.: 8 (925) 027-52-25, e-mail: marika230489@gmail.com.

Учанов Павел Владимирович, м.н.с. Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН); тел.: 8 (916) 695-50-87, e-mail: pavel-uchanov@mail.ru.

Терехова Вера Александровна, д.б.н., доцент, руководитель лаборатории (ЛЭТАП МГУ), Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (МГУ им. М.В. Ломоносова); профессор (РНИМУ) Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (РНИМУ им. Н.И. Пирогова); тел.: 8 (495) 930-03-95, e-mail: letap.msu@gmail.com.