

УДК 504.4.054:504.4.062.2

© И. С. Захаров, И. В. Аleshин

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет
sergeich188@gmail.com, aleshin-igor@mail.ru

МЕТОДЫ И СРЕДСТВА МИКРОБИОТЕСТИРОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ СРЕД

Приводится обзор современных зарубежных и отечественных микробиотестов для контроля воздействия вредных факторов на гидросферу, в которых применяются организмы малых размеров и малые объемы проб. Обсуждаются проблемы замещения биотестов на рыбах и растениях более экономичными микробиотестами. Демонстрируются области применения микробиотестов для экотоксикологического контроля природных вод. Рассматриваются тесты с объектами разных филогенетических уровней и разными методами контроля их реакции. Их многообразие позволяет охватить контролем разные объекты гидросферы и разные виды вредных факторов: пестициды, тяжелые металлы, нефть, детергенты и др. Обращается внимание на идентификацию вредных загрязнений и выявление характера воздействия вредных факторов по результатам биотестирования и методам биоаналитики: острую токсичность, хроническую, токсичность, фитотоксичность, генотоксичность, эмбриотоксичность и др. Описания микробиотестов поясняются схемами, показывающими принцип решения задачи обнаружения вредных факторов в природных водах. Кратко рассмотрены вопросы биотехнологий и их влияния на результаты тестирования природных вод. В обзоре поддерживается экологизация биотестов и делается вывод, что микробиотесты должны дополнять, а не заменять биотесты. Обзор охватывает литературу от начала 1990-х гг. до 2013 г.

Ключевые слова: микрорешка, природные воды, биотестирование, метод измерения, метод оценки, среда, биотехнологии, приборы, филогенетический уровень.

I. S. Zakharov, I. V. Aleshin

Saint-Petersburg Electrotechnical University «LETI»
sergeich188@gmail.com, aleshin-igor@mail.ru

METHODS AND MEANS FOR MICROSCALE BIOTESTING TOXICITY OF AQUATIC ENVIRONMENTS

Approach in the hydrosphere ecotoxicological control – microscale biotests with small organisms and volumes of probes is analysed in the review. The approach more economical than bioassay with fish and plants, but problems of biotests replacement on micro biotests and differences between tests for natural water and drink water or effluents are discussed in review. Tests with objects of different phylogenetic levels and measuring methods of their endpoints, which are analysed. Their diversity makes it possible to control different objects of biosphere and many harmful factors of natural water pollution: pesticides, heavy metals, oil, detergents and others. Attention is drawn to identification of harmful pollution and detection their harmful properties: acute, chronic toxicity, phyto-, geno-, embryotoxicity. Description of tests are illustrated by schemes, which explains principals for solve task of detection harmful factors in environment. Problems of biotechnology and their influence on assessment of bioassay are briefly discussed. Given that journal is not only biological, in the review are more demonstrated applications of microbiotests for ecotoxicological control of natural waters. The review covers the literature from the beginning of the 1990s until 2013.

Key words: microscale, natural water, bioassay, measurement endpoint, assessment endpoint, environmental, biotechnology, devices, phylogenetic level.

Предпосылки возникновения микробиотестирования. Научно-техническая революция XX в., обусловившая прогресс общества, породила и многие новые опасности. Произошло загрязнение гидросферы пестицидами, отходами и стоками заводов, фабрик, транспорта, морских и речных судов. Набат тревоги прозвучал в книге Р. Л. Карсон «Умолкшая весна» (*Silent Spring*) [1], в которой были описаны последствия загрязнения речных, морских и озерных вод пестицидом ДДТ и его производными.

Стало ясно, что одни физико-химические методы не могут обеспечить контроль качества среды, и особенно — гидросферы. Обнаружилось, что малоразложимые в воде хлорорганические пестициды, попавшие в природные воды в небольших концентрациях, могут накапливаться до опасных пределов в звеньях пищевой цепи экосистемы.

В развитых странах, ощутивших падение качества жизни из-за ухудшения окружающей среды, восстановление разрушенных водных экосистем и экотоксикологический мониторинг акваторий стали целями национальной значимости.

Для контроля состояния среды и гидросферы, через которую происходит миграция загрязнителей, были созданы два основных взаимодополняющих вида биомониторинга: *биоиндикация*, в которой применялись чувствительные к загрязнениям виды живых организмов и сообщества анализируемой природной среды, и *биотестирование*, в котором использовались полученные в лабораторных условиях чувствительные к вредным факторам тест-объекты.

В 1980-е гг. созданные в США и Европе природоохранные Агентства стали финансировать национальные программы разработок методов биотестирования, а международные и региональные центры контроля качества водных сред стали включать биотесты в свои регламенты. Многие страны Европы и штаты США разработали свои программы, стимулирующие исследования в данном направлении. В свою очередь, развитие экотоксикологии акваторий опиралось на результаты биотестирования [2].

Требование экономичности контроля среды обусловило тенденцию перехода в биотестировании от крупных животных (радужной форели) и больших объемов проб для бассейнов или аквариумов — к микробиотестированию, при котором используются организмы малых размеров и малые объемы проб.

Целевые инвестиции, направленные в область микробиотестирования, позволили ему в 1990-е гг. вырасти в направлении биологического контроля среды [3, 4–10].

Учитывая, что обзор ориентирован на пользователей журнала по гидрофизике, авторы будут кратко пояснять термины биотехнологий и обращать основное внимание читателей на области применения микробиотестов для контроля гидросферы.

Система биотестирования и специфика микробиотестирования. Несмотря на относительную простоту, схема на рис. 1 отражает основные элементы системы биотестирования водных сред.

Проба

Приоритетные загрязнители. Развитие экотоксикологии гидросферы было обусловлено, в первую очередь, опасностью инсектицидов широкого применения — хлорорганических и фосфорорганических — производных химического оружия [1], последствиями применения гербицидов военного назначения во время войны во Вьетнаме. Наибольшую опасность представляли пестициды, обладающие мутагенностью и генотоксичностью. Внимание ученых также привлекли биоцидные вещества для борьбы с биообрастанием корпуса кораблей [11]. Важной экологической проблемой в конце XX в. стало загрязнение гидросферы тяжелыми металлами (Hg, Cu, Pb, Zn), попадающими

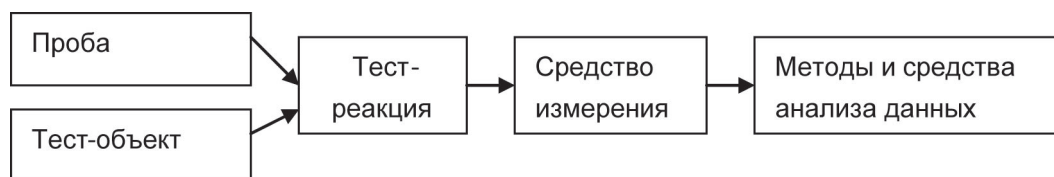


Рис. 1. Структурная схема системы биотестирования.

в природные воды из стоков, выбросов предприятий, накапливающимися в донных отложениях, и аккумулируясь в водной биоте, образуя более токсичные и долгоживущие металлоорганические соединения.

Экотоксикологические свойства: *общая токсичность* — биологическая вредность: острая и хроническая (учитывающая биоаккумуляцию вредных веществ); *фитотоксичность* — подавление жизнедеятельности растений; *цитотоксичность* — вредность на клеточном уровне; *нейротоксичность* — на уровне нейронов и нервной системы; *мутагенность* — способность вызывать мутации; *канцерогенность* — способность вызывать раковые опухоли; *тератогенность* — действия на эмбрионы.

Тесты на острую общую токсичность должны быть краткосрочными (до 96 ч), на хроническую токсичность — долгосрочными (более 96 часов, до десятков суток) [11].

Для разделения процесса мутаций от повреждения носителя наследственной информации, помимо мутагенности, было введено понятие *генотоксичности* — действия вещества или излучения на клеточный генетический материал, влияющие на его целостность. В результате исследований экотоксикологов изменились представления о канцерогенах, которые считаются лишь инициаторами рака, но для его развития нужны промоторы канцерогенеза, стимулирующих рост опухолей [12, 13]. Генотоксичные канцерогены образуют связь с ДНК, а не генотоксичные — не образуют. В соответствии с этими представлениями, в Европейском Союзе (ЕС) и странах Европы для генотоксичных веществ не устанавливаются предельные концентрации, а для негенотоксичных нормы вырабатываются после биологических опытов [14].

Биодоступность — возможность контакта организмов гидросферы с загрязнителями, находящимися в природных матрицах (илах, осадках, глинах, клетках и тканях живых и умерших организмов) [15]. Этот характерный для экотоксикологии параметр загрязнений тоже должен был контролироваться биотестами. Природозащитные службы США, учитывая большие объемы дноуглубительных работ в разных странах мира, поставили разработчикам биотестов задачу контроля безопасности захоронения донного грунта в море. Для этого потребовалось использовать минимум три вида тест-организмов: фильтраторов, питающихся осадками и закапывающихся в них [16].

Потенциал фитотоксичности. В 1960-х гг. увеличилась обеспокоенность общества и властей США и Европе состоянием растительности пресноводных озер, зарастающих в результате эвтрофикации, что послужило толчком для развития биопроб оценки потенциала загрязнителя воды [17, 18], т. е. спектра водорослей, подвергающихся фитотоксичному действию. В настоящее время тесты на фитотоксичность используются международными организациями экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), организациями по международным стандартам (ISO) и ЕС [19].

Загрязнение нефтью. Утечка нефти из танкера «Торри каньон» в 1967 г. стимулировала развитие биотестов для оценок токсичности вод, загрязненных нефтью и пенными адсорбентами для ее сбора [20]. Летучие компоненты нефти, в основном, испаряются за несколько дней или меньше. Водорастворимые фракции сохраняются в воде, и именно вода подлежит тестированию на токсичность.

Объем. Переход от прежних макробиотестов к микробиотестам связан с минимально необходимым жизненным объемом для нормального выживания организма. Например, рачков дафний культивируют при плотности особей не более 25/литр [21].

Разработчикам тестов с рачками-амфиподами удалось уменьшить объем проб с 10 до 1 л для 20 особей [16], чтобы сохранить условия их выживания.

В микробиотестах с использованием водорослей удалось уменьшить объемы проб с нескольких литров до 100 мл, применив в качестве тест-объекта микроводоросли [17].

Тест-объект

Специализация. Различия диапазонов толерантности (адаптации) повышают выживаемость биоты в целом, поэтому ни один организм или субклеточная структура не может быть одинаково чувствительными ко всем токсикантам [22]. Как правило, мелкие лабораторные животные менее чувствительны к токсикантам, чем большие [23].

Правила международных стандартов требуют проводить биотестирование на нескольких тест-объектах, и, соответственно, микробиотесты всегда имеют специализацию по областям применения.

Уровни биологической организации тест-объектов современных микробиотестов отражают специфику формирования физиологических систем, определяющих механизмы воздействия вредных факторов. Экотоксикологическая значимость отражает роль тест-объекта для развития экосистемы и чувствительность реакции на воздействия вредного фактора. Пример: многощетинковые черви — полихеты составляют 35–50 % от общего числа макроскопических видов бентоса. Личиночные стадии развития являются критическими в развитии (онтогенезе) любого животного. Личинки полихет плавают в толще воды и более чувствительны, чем взрослые особи к загрязнению вод нефтью и детергентами [20].

Биотехнологии. Тест-объекты должны быть безвредны для человека, не обладать мутагенной способностью. Биотехнологии получения тест-объектов включают этапы отбора, культивирования (искусственного получения организмов при наиболее благоприятных условиях), очистки (от других организмов) и хранения [24]. Например, отбор видов люминесцентных бактерий проводился возле побережья Южной и Северной Америки, Африки, Индокитая и Австралии [25]. Проблема культивирования тест-объектов заключается в том, что не все необходимые для этого условия известны биологам. Например, только недавно было установлено, что для развития некоторых водорослей нужен микроэлемент селен [18].

Для включения биотеста в экотоксикологический стандарт нужен хорошо изученный учеными тест-объект, по которому собрана большая база данных о его чувствительности к загрязнителям гидросферы. Эти условия ограничивают применение новых тест-объектов, даже обладающих высокой чувствительностью к токсикантам.

Важной задачей разработчиков микробиотестов является хранение тест-объектов. Проведены научно-исследовательские работы, позволившие получать тест-объекты без культивирования в лаборатории. Субклеточные и бактериальные тест-объекты могут быть сохранены методами лиофилизации (аналог сублимации), иммобилизации (осаждение на подложки) [24]. Технология *Toxkits* [19, 26] позволяет хранить в «спящем» виде, без потери жизнеспособности виды инфузорий, колловраток, ракообразных и иммобилизованные микроводоросли. *Toxkits* удобны в регулярно проводимых скрининговых микробиотестах [27—35], когда тест-организмы необходимо иметь «под рукой» для быстрого контроля острой токсичности. История разработки Токскитов для контроля токсичности кормов в Российской Федерации приведена в [36].

При переходе на тест-объекты малых размеров серьезной проблемой становится очистка их от других организмов. Некоторые тест-объекты, — такие как гидры, губки, диссоциирующие на отдельные клетки, очищают антибиотиками от бактерий, как и микроводоросли, а затем подвергают центрифугированию и ресуспендированию, что изменяет условия их существования по сравнению с природными [18, 37].

Несмотря на удобство пользователей и хорошую воспроизводимость результатов опытов с пробами природных вод и модельных токсикантов, методы с применением *Toxkits* долгое время не включали в международные и национальные стандарты [26] ввиду недостаточной базы данных о чувствительности тест-объектов.

Опыты с организмами и их структурами. При лабораторных исследованиях эксперименты с биологическими объектами делятся на два типа: *in vivo* — опыты с живыми организмами, которые считаются более достоверными, и *in vitro* — опыты вне живых организмов, это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» — вне живого организма, удешевляющая исследование. В микробиотестах это различие видов опытов должно учитываться разработчиками [37], потому что создателям тестов *in vitro* всегда необходимо доказать затем возможность переноса их результатов на тесты *in vivo*.

Тест-реакции и средства измерения

Эти элементы биотестовой системы в зарубежной литературе объединяются понятием «*endpoint*», что означает «сделать выбор», включающий тест-реакцию (*assessment endpoint*) и метод измерения (*measurement endpoint*). При использовании тест-объектов малых размеров необходимы приборные средства измерения тест-реакции.

Специфичность. В микробиотестах для контроля гидросферы используют неспецифические и специфические тест-реакции: первые используются для скрининга общей токсичности, а вторые — для идентификации вида — загрязнителя природных вод.

Уровни и примеры тест-реакций (endpoints)

Уровень тест-реакции	Пример тест-реакции
Генетический	Нарушения структуры ДНК
Иммунный	Реакция антиген-антитело
Биохимический	Реакция фермент-субстрат
Морфологический	Эмбриональные нарушения
Физиологический	Дыхание, выделение, рост, размножение-гибель
Этологический	Поведение отдельных особей
Популяционный	Рост-размножение, таксисы, кинезы

В табл. 1 приводятся уровни и примеры тест-реакций, применяемых в современных микробиотестах. Биохимический уровень тест-реакции позволяет получить информацию о виде токсиканта или его принадлежности к определенной группе, выявить мутагенность и генотоксичность, обеспечивая специфичность тест-реакции в тестах *in vitro*.

На специфичных реакциях базируется *биоаналитика* [2]. Она выполняет те же функции, что и физико-химический анализ, но зачастую превосходя его в чувствительности, селективности и экономичности. Организменный уровень тест-реакций отражает интегральную токсичность летальных концентраций токсикантов в тестах *in vivo*. Этологические (поведенческие) тест-реакции *in vivo* отражают интегральное воздействие токсикантов на системы, управляющие движением. Этологические реакции могут проявляться не только у отдельных особей. У популяций реакции проявляются в форме их направленного перемещения по градиенту токсиканта — таксисов или изменения под действием токсиканта скорости движения — кинезов. Тест-реакции морфологического уровня выявляют воздействие тератогенов и цитотоксинов на клетки и эмбрионы.

Средства измерения. В области микробиотестирования преимущественно используются бесконтактные оптические измерительные средства для получения измеряемых информативных характеристик тест-реакции, поэтому многие тест-реакции организованы так, чтобы в качестве «endpoint» получить цветную реакцию или реакцию, вызывающую свечение. Для их контроля применяются спектрофотометры и флуориметры, [38–42], последние имеют широкий диапазон измеряемых значений флуоресценции (до пяти-шести порядков), что позволяет применять их для обнаружения тест-объектов от субклеточного до популяционного уровня.

Наряду с универсальными средствами измерения тест-реакций создаются и эффективно применяются специализированные средства.

Методы и средства анализа данных

Методы классической токсикологии, основанные на сериях разбавлений токсиканта для получения зависимости доза-эффект и по нему концентрации 50 % гибели организмов LC_{50} , были дополнены при биотестировании новым подходом экотоксикологии, базирующимся на выявлении концентраций NOEC [11], не вызывающих, и LOEC, вызывающих минимальный вредный эффект, а также расчетами коэффициентов токсичности. В работах, касающихся биотестов для природных вод, приводятся новые формулы расчета пороговых концентраций и мультитестовых индексов [43–46].

В качестве количественных критериев сравнения чувствительности тестов использовались: корреляционный анализ [47] между результатами контроля токсичности на тест-объектах разных размеров или тестами *in vivo* и *in vitro*; регрессионный анализ [19, 47] для выявления статистической близости чувствительности организмов, полученной с помощью макро- и микробиотестов; дисперсионный анализ при проведении межлабораторных экспериментов [26].

В стандарты для микробиотестов входят методики пробоотбора, культивации, получения тест-реакции и обработки данных.

Микробиотесты для контроля состояния гидросферы

Методы биоаналитики

Специфичность антигенов и антител

Защитная гуморальная система млекопитающих обладает свойством выработки на проникновение чужеродного агента — *антигена*, специфических к нему белков-*антител*, которые связываются с антигенами, образуя комплекс. На этой тест-реакции основаны иммунологические методы анализа, позволяющие идентифицировать любое вещество, которое можно ввести в организм как антиген и получить клон антител к нему. Чувствительность обнаружения составляет нг/л [48].

Специфичность субстратов и ферментов

Биохимические катализаторы — ферменты вступают в реакцию со *специфичным* для них веществом-*субстратом*, образуя продукт в виде другого вещества (или нескольких), подлежащих идентификации.

Средства идентификации антигенов и белков

Иммуноферментный анализ (ИФА) [49] основан на реакциях антиген-антитело и фермент-субстрат. Разновидности иммунного анализа: радиоиммунный анализ РИА (RIA), иммуноферментный сорбентный анализ ИФСА (ELIZA), флуоресцентный иммунный анализ ФИА (FIA), поляризационно-флуоресцентный анализ ПФА (FIA). Наиболее широко используются методы ИФА и ИФСА [48].

Для идентификации белков получил широкое распространение метод иммуно-блоттинга (Western-blotting) [50], сочетающий гель-электрофорез с ИФА. Денатурированные белки в растворе, придающем им одинаковый заряд, под воздействием напряжения передвигаются со скоростью, пропорциональной их массе, затем переносятся из геля на пленку и инкубируются вместе с антителами, которые присоединяются к антителам, меченым ферментами, а затем добавление хемилюминесцентного субстрата вызывает люминесценцию комплексов белок-антитела. Применение средств идентификации в микробиотестах будет показано далее.

Для увеличения количества белка применяется метод *экспрессии гена*, т. е. преобразование наследственной информации о белке в продукт, вырабатываемый внутри клеток бактерий, дрожжей и др. организмов. Идентифицированный белок может быть получен в большом количестве для анализа.

Идентификация воздействия вредных факторов на гидросферу

Идентификация пестицидов

Трагические последствия применения инсектицида ДДТ и его производных для природы [1] побудили США и страны Европы установить для пестицидов в воде концентрации в диапазоне 0.1...0.5 мкг/л [48].

Иммунные методы нашли применение при обнаружении следовых концентраций и срока жизни в природных водах перметрина, инсектицида аркаринового ряда, попадавшего в верховья рек канадской провинции Северного Онтарио. Было обнаружено, что его следовые концентрации остаются на перьях водоплавающих птиц, водных млекопитающих [51]. В тестах *in vivo* инсектицид вводили в кровь подопытных животных, чтобы получить антитела к нему, а затем у них забирали пробу крови и выделяли антитела к инсектициду. На основе этого подхода были созданы методы контроля атразиновых и хлор-пиридиновых пестицидов в водной среде и проведены масштабные исследования для обнаружения следов пестицидов и их перемещения в среде природных вод Среднего Запада США [52]: реках, эстуариях (устьях), поверхностных водах, паводковых водах. Иммунные методы позволили обнаруживать следы пестицидов не только в питьевой воде, но и в разных видах донных осадков [48]. Были разработаны микробиотесты и *in vitro*, в которых используются проба воды и уже выделенные антитела [53].

Идентификация белков

Сегодня множество фирм продают антитела к различным белкам, контрольные структурные белки, поэтому проблема идентификации антигенов-белков упрощается.

Так, у губок, бентосных организмов — обитателей твердых субстратов, фильтраторов (1 кг губки *Geodia sardonium* фильтрует 24 тыс. л воды в день) — был обнаружен молекулярный насос, выполняющий функцию *ксенобиотической мультирезистентности*, т. е. выводящий из них

токсичные ксенобиотики, эти белки получили название MXR белков. Их исследования могут помочь не только защите окружающей среды, но и выводу токсичных веществ после химиотерапии рака [54].

Идентификация загрязнений как субстратов для ферментов

Специфичность. Только при абсолютной специфичности может быть определен вид субстрата, в других случаях можно говорить о группе субстратов, близких по типу связи, изомера, что тоже позволяет сузить круг загрязнителей.

Активность фермента, определяемая как скорость переработки субстрата, отражает наличие в среде субстратов-загрязнителей, что позволяет сделать вывод о загрязнении водной среды не только во время тестирования, но и в прошлом, по схеме:

Повышенная активность фермента → поиск мест скопления субстрата.

Микробиотесты *in vivo*, построенные на основе использования ферментов бактерий, обитающих в воде из реки Майн (Германия), позволили выявить у них активность на специфичные к ним хромогенные или флюорогенные субстраты [38]. При ферментативной реакции ее продукты у бактерий меняют цвет или светятся, что дало возможность контролировать самоочищение реки Майн в разные годы и сезоны.

У морской губки *Tethya luncurium* и пресноводной *Ephydatia muelleri* выделены ферменты переработки полифосфатов. У *E. muelleri* самая высокая активность переработки полифосфатов обнаружена при воздействии проб воды загрязненной реки Шварцбах, и меньшая — для проб более чистых рек Вера и Фулда [54].

Помимо ферментов внутри организма бактерий, в микробиотестах были применены *экзоферменты*, локализованные на внешней стороне мембраны бактерий, расщепляющие поступающие внутрь клетки вещества. Активность экзоферментов также определялась с помощью флюорогенных субстратов, что отражало загрязнение бентоса. Был разработан микробиотест *Bacterial Exoenzyme Test*, отражающий реакцию бактериальных сообществ исследуемой территории на загрязнение бентоса [55].

Контроль активности экзоферментов был использован для мониторинга природных вод до и после техногенного воздействия, для определения допустимых пределов их нагрузки вредными веществами на акватории океана, определения размеров бентосных загрязненных зон, контроля восстановления бентоса. В результате проведения исследований бентоса в районе залива Чалер близ Нью Брансуика был построен трехмерный график активности экзоферментов бактерий, позволивший выявить особую активность ферментов переработки целлюлозы на участке, где давно образовалась свалка из отходов целлюлозно-бумажного комбината (ЦБК) [55].

Обнаружение загрязнителя по индукции фермента

Клетки могут синтезировать специфические ферменты в ответ на появление в среде специфичных *индукторов* (часто — субстратов). Для контроля стоков ЦБК были применены микробиотесты *in vitro*, контролирующие индукцию фермента, окисляющего диоксины. [56]. Степень индукции, вызванная неизвестным составом пробы, была использована для оценки концентрации индукторов-токсикантов в пробе по схеме:

Индукция фермента — *активность фермента* → *наличие диоксина в воде.*

Этот фермент в клетках печени рыб относится к «оксидазам со смешанной функцией» (ОСФ или MFO), которые локализованы в эндоплазматической сети клетки. Его индукция оценивалась по активности фермента, измеряемой методом ИФА.

Была использована *in vitro* технология «клеточных линий», когда у животных (рыб) брали клетки из ткани (первичную культуру) и размножали их делением в питательной среде, контролируя активность ОСФ. Был выявлен эффект индуцирования активности фермента на воздействие диоксинов в стоках ЦБК, что доказывало их образование в природной воде, но последующие опыты показали, что следует учитывать возможные ошибки метода при действии других индукторов на образование ОСФ [56].

Токсичные вещества, являющиеся ингибиторами ферментов

Хлор и фосфорорганические пестициды. При воздействии вещества-ингибитора активность фермента понижается, что уменьшает и количество продукта. Как правило, ингибиторами биохимических реакций являются токсичные вещества. Ингибирование происходит за счет

средства ингибитора к ферменту. Значения коэффициента ингибирования ферментной активности специфично для разных веществ. На этом принципе были разработаны микробиотесты для обнаружения пестицидов по схеме:

Фермент + субстрат + загрязнитель → коэффициент ингибирования → вид ингибитора.

В стандарт Германии DIN38415 вошел микробиотест *in vitro*, основанный на расчете коэффициента ингибирования и сравнения с полученными значениями этого коэффициента для известных ингибиторов. Было показано, что чувствительность подавления активности фермента ацетилхолинэстеразы для фосфорного инсектицида меньше 1 мкг/л [39].

Гербициды, вызывающие окислительный стресс. Наиболее известным из пестицидов, вызывающих повреждение клетки в процессе окисления токсичными формами кислорода, является гербицид неселективного действия паракват (PQ) [57]. Он широко применяется за рубежом в сельском хозяйстве и относится к боевым фитотоксикантам (БФТ) армии США. Паракват может попадать в воду поэтому был включен в программу ООН по окружающей среде. Микробиотесты [58] *in vitro* на «клеточных линиях» рыб, разработанные для выявления окислительного стресса, показали, что рыбы в 10 раз менее чувствительны к нему, чем млекопитающие. Метод «клеточных линий» вошел в новейшую «Энциклопедию водной экотоксикологии» [59].

Нарушители дыхательной цепи. Митохондрии — органеллы, которые участвуют в процессе обеспечения клеток энергией при аэробном дыхании. Токсичные вещества могут выступать как ингибиторами дыхательной цепи, так и разобщителями, нарушая сопряженную систему ферментных процессов, необходимую для получения энергии, запасаемой в аденозинтрифосфате (АТФ), универсальном источнике энергии, синтезируемой митохондриями.

Микробиотесты *in vitro* RET-P450, Etr-P450, FEW [47] предназначены для обнаружения и идентификации токсикантов, нарушающих работу дыхательной цепи митохондрий. Для повышения чувствительности к токсикантам митохондрии (получаемые из мышцы сердца быка) подвергают разрушению, получая из них субмитохондриальные частицы СМЧ (SMP) с «вывернутыми» наружу активными центрами ферментных «батарей» (иллюстрации в [60]). СМЧ столь малы, что не создают интерференции при спектрофотометрии, но благодаря большой поверхности действуют как реагенты в растворе.

Тесты применялись для контроля качества природных вод США: рек и притоков в штатах Иллинойс и Миннесота, а также качества воды р. Рапель в Чили [61].

Средний коэффициент корреляции [47] между данными, полученными для 104 органических загрязнений и металлов с помощью СМЧ-тестов и в лабораторных экспериментах с многоклеточными животными, (представителями спектра организмов, обитающих в реках и озерах зон умеренного климата) составил $r = 0.76$. Одна из проблем продвижения тестов *in vitro* заключается в недостаточности базы научных данных, которую еще предстоит наработать ученым разных стран.

Тяжелые металлы. Как правило, ингибиторами биохимических реакций являются токсичные вещества, к которым относятся и тяжелые металлы, но у каждого фермента разная чувствительность к ингибиторам.

Для контроля тяжелых металлов создавались тесты с разными ферментами, но лишь фермент β-галактозидаза оказался нечувствителен к органическим токсикантам, и в среднем более чувствителен к тяжелым металлам [38].

Тест основан на катализе ферментом хромогенного субстрата, создающего продукт реакции, у которого измеряется адсорбция на длине волны 420 нм.

На основе фермента, встроенного в мутантные штаммы бактерий *E. coli*, были созданы микробиотест MetPAD™, ориентированный на визуальное тестирование, и MetPLATE™ [6, 38, 40] на приборное измерение адсорбции продукта реакции, Время тестирования — 1 ч (без учета подготовительных процедур). Позже был разработан более чувствительный микробиотест FluoroMetPLATE™ [38] на базе флюорогенных субстратов, которые при катализе выбранным ферментом создавали светящиеся вещества.

Результаты обнаружения токсичности тяжелых металлов с помощью MetPlate оказались сравнимы по чувствительности с тестом на радужной форели. Метод широко применяется для контроля природных вод, например, водоемов Финляндии [62].

Накопление тяжелых металлов

Белки *металлотионеины* (МТ) [58] из клеток печени обладают свойством связывать ионы тяжелых металлов, выполняя деинтоксикационную функцию. В тесте использовано свойство экспрессии белка МТ в ответ на загрязнение воды ртутью и кадмием, по схеме:

Экспрессия белка МТ → наличие индукторов-загрязнителей — тяжелые металлы.

В качестве тест-объекта использовались «клеточные линии» печени рыб. Микробиотесты, основанные на экспрессии металлотионеинов, отражают увеличение накопления тяжелых металлов в природных водах, что очень важно в связи с известной историей болезни Минамата, приведшей к гибели 900 чел. из 2000 пострадавших. Она возникла в результате многолетних сбросов ртути (1932–1968 гг.) заводом в залив Минамата (Япония), причем отравление произошло, в основном, через потребление морепродуктов. Восстановление залива продолжалось 13 лет (проект начался в 1977 г. и был завершён в 1990 г.). Чтобы удалить загрязненные ртутью донные отложения, потребовалось провести рекультивацию и дноуглубительные работы объемом 1.5 млн кубометров [63].

Фитотоксичность

На рост водорослей влияют в обычных условиях состав среды, воды и ее элементного состава, сезонность развития, спектр излучения солнца, симбиоз с бактериями. Эти условия усложняют разработку тестов и показывают, что биологический контроль нельзя проводить лишь на одном виде водоросли.

Признание необходимости защиты этого трофического уровня от химических загрязнений способствовало развитию серии биотестов на фитотоксичность, проводимых в колбах с конца 1970-х гг. В тестах рассчитывалась величина подавления роста IC_{50} . Биотесты были научно обоснованными, но трудоемкими и малорентабельными [18].

Нефтяные загрязнения

Первые альтернативные планшетные тесты были разработаны учеными Норвегии, предложившими краткосрочный 48-часовой микробиотест для контроля нефтяных загрязнений и выявления с помощью микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* токсический эффект и пороговые концентрации загрязнителя. Преимущества теста перед прежними макро-биотестами — простота, эффективность, минимизация затрат, экспресс-скрининг потенциальных загрязнителей — вдохновили других ученых и разработчиков, но при разработке долгосрочных тестов на 8 и 14 дней с водорослями разных видов встретились серьезные проблемы: изменение кислотности среды, фито- или бактериальная деградация и фоторазложение токсиканта, что привело к необходимости ограничения времени такого теста 4-мя днями [18].

Тяжелые металлы и хлориды

Микробиотест *AlgalToxkit* [19, 34], использующий получение тест-объекта из иммобилизованных микроводорослей, был предназначен для замены биотеста в колбах. Разработчики перешли к выращиванию микроводорослей в прозрачных (для освещения водорослей) протяженных кюветах с откидными крышками для газообмена, но не допускающих испарения. Микробиотест прошел проверку на чувствительность к тяжелым металлам и хлоридам. Регрессионный анализ зависимости между EC_{50} , полученного двумя тестами, показал линейную зависимость с коэффициентами детерминации и корреляции 0.99. Тем не менее, возникли сложности его включения в стандарты, ввиду малой изученности метода хранения тест-объекта.

Контроль загрязнения по нескольким параметрам

Широкое применение получили тесты водных сред на ряске малой *Lemna minor* [64–66]. Ингибирование прироста отражает общее токсическое действие, а морфология и цвет листьев позволяет классифицировать токсикант [66].

Качество питьевой и пресной воды

Ученые Южно-Африканской республики (ЮАР) предложили 72-часовой тест на фитотоксичность, в 24-луночном микропланшете, применив микроводоросль *Selenastrum capricornutum* с последующей фотометрией в 96-луночном планшете для измерения биомассы. Методика была рекомендована для проведения оценки токсичности питьевой и природных вод в ЮАР [18]. Помимо фотометрии, стали использоваться методы проточной цитометрии [67].

Высокотоксичные выбросы. Важное свойство микроводорослей — выдерживать высокие концентрации токсикантов — позволило разработчикам [18] создать четырехчасовой микробиотест с применением *S. capricornutum* для контроля острого токсического воздействия. Подавление роста измерялось по АТФ, ее количество в среднем постоянное в здоровых клетках, но уменьшается при интоксикации.

Загрязнения морских вод. Во Франции был разработан пятиминутный тест для выявления токсического действия поверхностных морских вод, содержащих инсектициды, гербициды и металлы, на одноклеточные водоросли *Tetraselmis suecica*, *Skeletonema costatum*, *Prorocentrum lima*. Токсичность оценивалась по подавлению люминесценции водорослей. С помощью планшетных тестов с водорослями созданы системы контроля радиоактивного облучения и генотоксичности [18].

Загрязнение побережья. Власти Калифорнии были озабочены сохранением своего экологического и экономического ресурса — водорослей *Macrocystis pyrifera* из семейства ламинарий и формируемых ими прибрежных морских сообществ, учитывая, что в воды Калифорнии сливалось ежедневно 11 млрд галлонов стоков. Были разработаны и внедрены тесты, в которых использовались ранние стадии развития гигантских водорослей [68]. Развитие *Macrocystis pyrifera* происходит в несколько этапов: из отделившейся от растения-спорофита споры развиваются *гаметофиты*, образующие половые клетки, которые после оплодотворения развиваются снова в спорофит. Были разработаны 3 теста: 48-часовой для контроля стадии образования из спор гаметофитов, 8-дневный до стадии гамет и долгосрочный 16–20-дневный до стадии спорофитов. У клеток измерялся процент прорастания.

Методы были адаптированы к требованиям микробиотестов: уменьшены объемы для спор от 200 до 15 мл, так как поверхность малых объемов достаточна для контакта клеток с токсикантами. Сравнивали биотест и микробиотест по чувствительности к меди и азиду натрия. При краткосрочных тестах она оказалась практически той же, что и в больших объемах. При долгосрочных тестах возникали расхождения результатов тестирования, поэтому пришлось уменьшить время тестирования.

Потенциал фитотоксичности. На основе тестов с водорослями разработана концепция «батареи микробиотестов», но у такой концепции есть недостатки: при создании батареи тестов с водорослями в экспериментальных условиях (например, свет, температура), которые никогда не будут оптимальными для всех видов водорослей. Подробно возможности контроля и источники ошибок экспериментов при проведении батарей тестов с водорослями рассматриваются в [17, 69].

Мутагенность, генотоксичность, канцерогенность

Мутагенный потенциал и генотоксичность

Тест Эймса [70]. Тест, предложенный в 1974 г. Б. Эймсом, позволил определять мутагенный потенциал химических соединений. Принцип его заключается в том, что используются мутанты, у которых изменено хорошо регистрируемое свойство.

У Б. Эймса это было усвоение незаменимых аминокислот (гистидина) у бактерии. По окончании теста подсчитывается, у какого количества бактерий в результате обратной мутации появляется способность к синтезу гистидина. Тест Эймса позволил за 48 ч. выявлять суммарную мутагенность загрязнителей среды.

Тест Эймса применялся для уточнения режимов химической и биологической очистки и разбавления, обеспечивающих снижение мутагенной активности сточных вод до уровня контрольной. Тест был включен в комплексную программу биомониторинга за эколого-токсикологическим состоянием производств Байкальского ЦБК и считается эффективным интегральным биоиндикатором загрязнения воды канцерогенами и мутагенами, образующихся в процессе дезинфекции воды поверхностных водоемов [71].

Mutatox® Genotoxicity Test. В конце 1990-х гг. был разработан тест на основе люминесценции бактерий, который по своему принципу близок к тесту Эймса, но основан на другой тест-реакции: генотоксичные агенты в среде, изменяющие ДНК, могут восстанавливать свечение бактерий [72]. Он предназначен для выявления эффекта от агентов-загрязнителей водных сред (из поверхностных вод, подземных вод, сточных вод, органических и минеральных отложений,

экстрактов), повреждающих ДНК. В тесте применена бактерия *Photobacterium leiognathi*, относящаяся к «темным штаммам», т. е. бактериям, у которых есть гены, отвечающие за люминесценцию, но свечение в чистой среде отсутствует. При мутациях у бактерий возникает свечение.

SOS-тест. У бактерии *Escherichia coli* в ответ на повреждения ДНК происходит процесс, подобный сигналам тревоги: увеличение мутаций (*SOS*-мутагенез) и образование примерно 26 белков (*SOS*-ответ) [73]. Были обнаружены мутанты *E. coli*, неспособные к *SOS*-ответу при повреждениях ультрафиолетом или генотоксичными веществами, что привело к созданию микробиотеста на генотоксичность по принципу, сходному с методом Эймса, но из-за способности реагировать на различные типы генотоксических поражений один штамм позволяет обнаружить различные виды генотоксических веществ. Немецкий институт по стандартизации (DIN) стандартизировал тест для мониторинга экологической генотоксичности (DIN 38415, часть 3). Тест также был стандартизован на международном уровне (ISO CD13829) [74].

Микроядерный тест (МЯ-тест) (подробнее в [75]) был введен во французский стандарт контроля качества воды AFNOR T90-325 [76].

Микроядра — фрагменты ядра в цитоплазме, являющиеся патологическими структурами, вызываемые неправильным ходом клеточного деления. Тест включает стадию выдерживания личинок тритона *Pleurodeles waltl* и головастиков жабы *Xenopus laevis* в тестируемой среде в течение 12 дней и затем проведение МЯ-теста.

Показано, что тест позволяет учитывать эффекты синергизма и антагонизма смесей вредных веществ. МЯ-тест на амфибиях использовался для оценки генотоксичности загрязненных внутренних вод. Тестирование стоков более чем 40 промышленных объектов, в основном во Франции, показало, что более половины из этих источников производили генотоксичные, согласно МЯ-тесту на амфибиях, сбросы.

Вода из реки Дурду (приток реки Тарн, Франция), отобранная ниже по течению от центрального стока дубильных заводов в городе Гроле, была протестирована до модернизации фабрики и после. В первом тесте образцы речной воды Дурду были признаны генотоксичными по МЯ-тесту на личинках тритона уже при добавке 125 и 250 мл/л в контрольную среду с четкой зависимостью доза-эффект. В тестах, проведенных спустя четыре года после модернизации процесса дубления и очистки сбросовых сточных вод, генотоксических эффектов не наблюдалось при дозах, используемых в предыдущих тестах. Результаты для чистых веществ и сложных сред, описанных выше, демонстрируют полезность МЯ-теста на амфибиях для оценки экотоксикологических опасностей [77]. Недостатками теста являются большая длительность и сложность подсчета микроядер.

Размотка ДНК. Суммарная мутагенность водных сред исследуется с помощью нескольких видов микробиотестов, основанных на современных представлениях о структуре ДНК. Рентгеноструктурный анализ показал, что ее спираль имеет плектонемическую форму, которую принимают две параллельные цепи, накрученные вокруг цилиндра в одном направлении.

При воздействии щелочи [78] двухцепочечная молекула ДНК превращается в одноцепочечную форму (раскручивается), но связи между цепями у неповрежденной ДНК сохраняются. У поврежденной ДНК они разорваны. Цепи ДНК обрабатывают щелочью и разрывают ультразвуком, а затем после остановки процесса определяют доли двухцепочечных и одноцепочечных фрагментов с помощью добавки флуоресцентного красителя. По этим долям рассчитывался в логарифмической шкале показатель мутаций, на основе которого были построены карты генотоксичности акваторий Северного моря по тестам с эмбрионами на разных стадиях их роста.

Проблема контроля генотоксичности в том, что ее не удается идентифицировать на фоне острой токсичности. Кроме того, генотоксичность может проявляться с задержкой, определяемой длительностью канцерогенеза [78].

ДНК-кометы. Для исследования генотоксичности загрязнений, исследуемых на эритроцитах рыб, применяется метод «ДНК-комет» [79, 80], усиленный воздействием щелочи. Цепи ДНК разрывают на фрагменты по участкам повреждений электрофорезом, и на электрофореграмме остаются следы, похожие по форме на комету. Этот метод использовался для исследования генотоксичности водоемов Армении.

Генно-инженерные биосенсоры генотоксичности in vitro. В [81] описывается разработка методами генной инженерии микробного сенсора на генотоксичность на основе *E. coli*. Для этого гены

свечения морской бактерии *Vibrio fischeri* встроили в ДНК *E. coli*. После «ощущения» бактерией повреждения ДНК активируется *SOS*-система, и начинается координированная экспрессия генов и синтез белков, среди них будет тот функциональный ген, который выполняет функцию «репортера», и его экспрессия приведет к синтезу светящегося белка и генерации света. (Таким способом может быть построен биосенсор для разных видов токсикантов).

Микробиотесты на генотоксичность излучений. Изучалась генотоксичность радиоактивных излучений на «клеточных линиях» рыб [58]. Их подвергали воздействию рентгеновских лучей и контролировали аберрации (перестройки структуры) хромосом. Было показано, что клетки, подвергнутые малым дозам радиации, становятся менее чувствительными к большим дозам, обретая адаптацию к ним. Это явление может быть использовано для выявления действия в прошлом малых доз радиации на рыб природных вод. Опыты, проведенные на золотых рыбках *Carassius auratus*, показали, что при избыточном воздействии фоторадиации в клетках рыб запускается механизм димеров (светорегуляторов), вид защиты от цитотоксичности ультрафиолета, как и в клетках фибробластов соединительной ткани человека [58].

Канцерогенность

Ввиду действия раковых заболеваний на разных обитателей гидросферы, существует насущная необходимость в разработке краткосрочных биологических тестов *in vitro* исследований для разделения негенотоксичных и генотоксичных канцерогенов.

Генотоксичность в [58] определялась возможностью канцерогена создавать соединение с ДНК (аддукт), в результате чего вырабатываются раковые клетки. Обнаружено, что бензо(а)пирен образует аддукт с ДНК клеток рыб американского сомика *Ameiurus nebulosus* и солнечника *Lepomis macrochirus*. У радужной форели *Oncorhynchus mykiss* такой аддукт был обнаружен в весьма слабой степени. Зато эпоксиды образовывали аддукт с ДНК в клетках радужной форели и солнечника. Это показывает различную чувствительность рыб природных вод к канцерогенам. На рыбах изучалось возможное канцерогенное действие ферментов-окислителей (пероксином), которые вызвали рак у крыс, но при опытах на клетках печени золотой рыбки *Carassius auratus* и японской оризии *Oryzias latipes* (Индо-Китай) не произошло образование опухоли, что показало различие механизмов образования рака у рыб и грызунов. Более подробно о проблеме канцерогенного риска в водной экотоксикологии [10].

Тератогенность

Микробиотест на гидрах. Создан в начале 1980-х гг. [82]. Взрослых гидр *Hydra attenuata* диссоциируют на составляющие клетки, центрифугируют, из их массы создают «таблетки», которые помещают в реакционную среду с добавлением тестируемого вещества, выдерживают их в течение 90 ч, что позволяет после агрегации наблюдать широкий спектр характерных нарушений у эмбрионов: ненормальность рожденной молодежи, внутриутробные смерти, аномалии развития молодежи.

После тестирования возникает проблема с определением порога для тератогенов, так как концентрация отсутствия тератогенного эффекта затем делится на коэффициент безопасности MOS (margin of safety), обычно MOS = 100. При этом в результате проведения биологических опытов для гидры сильным тератогеном оказалась салициловая кислота [37], и почти не оказал действия военный пестицид «Агент Оранж». Понятно, что иногда трудно экстраполировать результаты опытов с гидрой на животных и человека, тем не менее, это важный тест в области водной экотоксикологии [83].

Микробиотест на эмбрионах рыб. Использование яиц рыбы из семейства карпозубых *Fundulus heteroclitus* (FH), распространенной в водоемах США, выявило тератогенное действие веществ при тест-реакции образования зародышей [84].

Пестициды. Хлорорганический инсектицид ДДТ при концентрации 1 мг/л вызывал у части зародышей лордоз (выпуклость вперед) и потерю способности плавать, но эти эффекты пропадали после перевода зародышей в чистую воду. Инсектицид Карбарил на основе карбаматов при концентрации 1–10 мг/л создавал ненормальные изгибы кровеносных сосудов, при переводе организмов в чистую воду развитие продолжалось, но с сохраняющимися аномалиями.

Фракция нефти. Эквивалентная концентрации 0.27–0.7 ppm нафталина вызывала уменьшение длины зародыша и скелетные изменения.

Соединения ртути. Вызывали ненормальности скелета личинок, сердечной системы, задержку роста, причем низкая соленость и температура увеличивали количество ненормальных зародышей. Низкая температура пролонгировала действие соединений ртути на зародыши. Такой же эффект наблюдался при одновременном действии нефти. Введение же Cd и Zn уменьшало воздействие тератогена.

Важно, что организмы из загрязненных районов (Пайлс Крик, бухты Ньюарк) более устойчивы к тератогенам, чем из чистых вод (Лонг-Айленд). У организмов из районов, загрязненных ртутью, вырабатывается толерантность к высокотоксичной метилртути. Эмбрионы рыб из бухты Ньюарк тоже обладали резистентностью к диоксинам и другим загрязнителям эстуария.

Цитотоксичность

Для исследования нарушения клеток был применен ультраструктурный анализ, основанный на изучении изменения структурных элементов клеток рыб [58, 85].

При изучении влияния на клетки радужной форели мочевины, сульфата меди, нитрата кальция в клетках было обнаружено множество морфологических изменений. Сегментирование ядер клетки наблюдалось после воздействия мочевины, в то время как цитоплазматические изменения — после сульфата меди. Нитрит кальция вызывал оба вида изменений: и ядра и цитоплазмы. Воздействие ртутных ксенобиотиков на рыб природных вод вызывало столь многие нарушения в развитии их клеток, что было сделано заключение: эти токсиканты неспецифически подавляют иммунные функции клеток, вызывая подобные нарушения, и необходимо контролировать такой вид токсичности в водных экосистемах.

Имеются основания предполагать цитотоксичность эстрогенов (женских гормонов), попадающих в природные воды [58]. Были проведены опыты с гормонами и фитоэстрогенами (растительными соединениями, вызывающий эстрогенный и антиэстрогенный эффект), которые показали, что синтез белка *вителлогенина* стимулируется эстрогенами, и образует желток эмбриона. Микробиотест на основе клеток печени радужной форели *Oncorhynchus mykiss* был предложен для выявления действия веществ эстрогенного действия. Определение вителлогенина вошло в стандарты качества воды.

Токсический стресс

Образование и увеличение выработки белков теплового шока (БТШ) может быть индуцировано повышенной температурой, химическими повреждениями клеток. БТШ использовали как сигнал тревоги в биосенсорных системах [81].

БТШ разделяют по молекулярному весу и функциям. БТШ-70 кДа (молекулярный вес 70 килодальтон) выполняют функции сохранения формы белков, поэтому называются шаперонами (*shape* — форма). БТШ 10–15 кДа могут повышать устойчивость клеток к некрозу (отмиранию). БТШ изучали у разных организмов гидросферы.

У пресноводной губки *Ephydatia fluviatilis* [54] был выделен методами иммуно-блоттинга белок БТШ-70, выработка которого повышается после стресса различных видов. В качестве токсичного фактора использовался экстракт неионных веществ из сильно загрязненной река Шварцбах (вблизи г. Гессе, Германия). В качестве первичного стрессора применяли изменения температуры. Предварительный температурный шок резко усиливал действие токсического стресса и выработку БТШ-70.

У рыб природных вод долгое время БТШ не удавалось обнаружить [58]. Когда в качестве биологического тест-объекта у рыбки из рек Мексики *Poecilopsis lucida* были взяты клетки из опухоли печени (*Hepatocellular carcinoma*) и созданы «клеточные линии», было выделено 6 видов БТШ как реакция, индуцированная ионами Cd, и 4 БТШ как реакция на ионы Cu. В опытах с клетками почки камбалы были выделены всего 3 БТШ. В обеих клеточных системах 2 БТШ-70 и БТШ-27 идентифицировали воздействие Cd или Cu, однако следует учитывать, что результаты опытов *in vitro* могут иметь расхождение с опытами *in vivo*.

Было показано, что у зооксантелл (*Symbiodinium microadriaticum*) — водорослей-симбионтов кораллов — увеличение производства БТШ, идентифицированных методом иммуно-блоттинга, отражает действие токсического стресса [86].

Биоцидные вещества

Трибутилин (ТБТ). Фокусирование экотоксикологических исследований разных научных групп на приоритетных загрязнителях гидросферы позволило получить комплексную картину действия токсикантов на разных уровнях и на разные организмы. Примером такого опасного вещества является ТБТ, который использовался в 1950–1960-е гг. для борьбы с биообрастанием корпусов кораблей (антифоулинговый биоцид).

В тестах на СМЧ (см. выше) было показано [47], что ТБТ больше токсичен для рыб, чем для водорослей. В тестах на клетках рыб [58] обнаружилось, что ТБТ изменяет кислотность внутренней среды клетки, на эмбрионах рыб [85] было показано, что ТБТ вызывает апоптоз (регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка фрагментируется на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной), что подтвердила типичная картина распада ДНК, полученная методом иммуно-блоттинга.

Пестициды. Чувствительность ракообразных к пестицидам иногда объясняется тем, что существует филогенетическое родство между ракообразными и целевыми насекомыми для пестицидов. Виды мизид, ракообразных размерами 10–20 мм, живущих в эстуариях (устьях рек), представителей бентоса, показали высокую чувствительность к токсикантам, особенно *Mysidopsis bahia* к пестицидам [87]. Самым токсичным оказался хлорорганический инсектицид эндрин, меньше — фосфорорганический гербицид DEF, затем — фосфорорганический инсектицид фентион, и наименее токсичным — карбамат. Чувствительность к первым трем токсикантам составляла 0.03–0.3 мкг/л.

Ингибиторы роста насекомых. (IGRs). Это обширная группа гормонов насекомых (особенно — ювенильный гормон [JH]) и их аналоги, которые действуют как агенты биологической борьбы с насекомыми-вредителями путем изменения развития их личинок в процессе метаморфоза, но после применения IGRs было обнаружено уменьшение популяции крабов [87]. Для тестирования был взят противомоскитный ингибитор роста метопрен, в качестве тест-организмов — личинки креветки *Palaemonetes pugio* и краба *Rhithropanopeus harrisi*. При концентрациях метапрена 1000 мкг/л метаморфоз не происходил у обоих видов, 100 мкг/л влияли на метаморфоз крабов, но не влияли на креветок. IGRs по-разному действовал на рост двух видов животных на разных стадиях развития. Биотесты стали чувствительными инструментами биомониторинга пестицидов для экосистем устьев рек и прибрежных вод.

Токсичность нефти и детергентов

Помимо фитотоксичности нефти для водорослей и тератогенности для эмбрионов рыб, она оказывает вредное воздействие на личинки организмов, таких как многощетинковые черви — полихеты.

На личинках полихет [8, 20] тестировалась токсичность металлов, нефти и детергентов, которые использовались для сбора нефти. Чувствительность к нефти и мазуту у разных видов ювенильных и взрослых особей полихет разных видов составила для LC_{50} 2–20 мг/л. Наиболее чувствительными к нефти оказались мелкая полихета *Ophryotrocha diadema*, а к мазуту — *Ophryotrocha puerilis*. Численность популяции через 28 дней была обратно пропорциональна концентрации [20].

Выяснилось, что детергент на основе полиэтиленгликоля и жирных кислот влияет на каждую стадию жизни полихет: личинки, ювенильной особи и взрослой особи. Продолжительность стадии пелагической личинки увеличилась с 2-х до 12-ти дней. При проведении эксперимента при максимальной концентрации детергента, количество личинок уменьшилось в 2 раза, количество выросших из них червей — в 6 раз.

Загрязнение донных отложений и биодоступность токсикантов

Microtox Solid-Phase Test (SPT) [72] основан на реакции свечения люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri*. Для увеличения вероятности контакта с токсикантом в водной суспензии испытуемого образца осадок центрифугируют, чтобы удалить поровую воду, гомогенизируют. Пробу тестируемого вещества забирают с твердой фазы и помещают в пробирку, измельчают при перемешивании, затем вводят в пробирку люминесцентные бактерии и инкубируют их. Через 20 мин с помощью фильтрующей колонки разделяют твердую и жидкую фазу. Надосадочную жидкость (супернатант),

содержащий люминесцентные бактерии, помещают в термостатируемый блок люминометра и через 5 мин измеряют максимум потока излучения.

ATP-TOX System [88] основана на росте мутантных бактерий *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, обладающих способностью перерабатывать субстрат люциферин при добавке АТФ, которая стимулирует активность фермента люциферазы в присутствии ионов Mg^{2+} , вызывая люминесценцию. Воздействие вредных веществ оказывает влияние как на рост организмов, так и на подавление активности фермента, что уменьшает люминесценцию, поэтому токсичность оценивается как сумма процентов ингибирования роста и подавления активности фермента. Метод нашел широкое применение при контроле донных отложений и вод рек Ниагара, Сент-Джона, Ямаска, Фрейзер, озера Эри.

Тест на полихетах [8, 20]. Консультативная группа по качеству морской среды Канады и Канадская межгосударственная группа по водной токсикологии (IGATG) рекомендовала разработать методы контроля токсичности осадочных морских отложений. В качестве тест-объекта были выбраны черви полихеты (25 видов), а в качестве тест-реакции — самые наглядные и дешевые: сухой вес, скорость роста, плодовитость, аномалии личинок. Этот метод потребовал учета влияния на выбранные тест-реакции не только содержания металлов в осадках, но также температуры и солености воды, гравиметрии осадков, и позволил выявить токсичность осадочных слоев в регионе Пьюджет-Саунд.

Тест на амфиподах [16] (рачках-бокоплавах, 9 видов) стал использоваться для контроля токсичности донных отложений. Для тестирования грунта при оценке его токсичности перед захоронением в воде были выбраны виды амфипод, отвечающие условиям тестирования: фильтраторы, питающихся осадками и закапывающиеся в них. В тестах контроля жизненного цикла регистрировались аномалии развития, прекращение репродукции, увеличение времени стадий цикла.

Тест на инфузориях [89]. Вид инфузории *Colpoda inflata* (размер 40–60 мкм) образует при ухудшении качества среды покоящиеся цисты (см. ранее). Вышедшие из цист инфузории после их роста в течение 48 или 96 ч заливали в лунки планшета и подвергали воздействию водных вытяжек из почвы, в которой присутствовали токсиканты. Затем инфузорий выращивали в течение 24 ч и, отобрав 20 мкл, подсчитывали их число под микроскопом, отмечая погибших или потерявших подвижность. С помощью теста исследовалась биодоступность токсичных металлов (кадмия, меди, и цинка) при различных уровнях органического вещества по кривым доза-эффект, полученным в органической и неорганической среде. Оказалось, что связывание металлов в органической среде снижало их токсичность.

Тест на кораллах [86]. Исследовалась биодоступность металлов при загрязнении кораллов *Phylum coelenterata*. Следы металлов определяли методами спектрофотометрии и вольтамперометрии. Был сделан вывод, что если кораллы будут использоваться в качестве биомониторинга загрязнения тяжелыми металлами, требуются дальнейшие исследования внутривидовой чувствительности к различным металлам и механизмам их действия.

Общая токсичность

Острая токсичность. Microtox Acute Toxicity Test® [41] создан на основе системы Microtox (Beckman Instruments). Его разработка была обусловлена потребностью промышленности заменить дорогостоящую и длительную процедуру контроля токсичности с применением 96-часового теста на рыбах более быстрым тестом на острую интегральную токсичность воды. Прибор основан на люминесценции непатогенных морских люминесцентных бактерий, измеряемой количественно фотометрическим методом. Бактерии использовались в лиофилизованном виде и приготавливались перед опытом методом регидратации (10^8 на флакон). Важными факторами воспроизводимости реакции было термостатирование кюветного блока люминометра и обдувание флаконов.

В качестве оценки токсичности был использован метод расчета концентрации ингибирования эффекта до определенного процента (50 % и меньше), т. е. малые значения соответствуют высокой токсичности, а большие — низкой. Обычное время контроля токсичности — 15 мин. Иногда токсичность характеризовалась временем и концентрацией ингибирования. Результаты экспериментов и анализ источников погрешностей приведены в [72]. Проведенные опыты по изучению корреляции

между результатами тестов с рыбами и бактериями показали высокую корреляцию с токсичностью, определяемой с помощью *Microtox* ($r = 0,80-0,85$). *Microtox* используется в области контроля вод: для скрининга токсичности качества воды, озерных и речных вод, промышленных и сельскохозяйственных стоков, донных отложений, буровых растворов и водоотливных жидкостей и др.

LUMISTox 300 Bench Top Luminometer ручного типа стал выпускаться для контроля острой токсичности, также использующий люминесцентные бактерии [90].

В РФ разработаны микробиотесты для контроля острой токсичности водных сред на основе люминесцентных бактерий «Эколюм», полученных методами генной инженерии из бактерий пресных вод. Выпускаются системы Биотокс™ и Биотокс-10М [91].

Как и другие виды токсичности, острую токсичность требуется проверять на нескольких организмах. Здесь удобно в качестве тест-организма использовать простейших — одноклеточных животных, к которым относятся инфузории, важные звенья пищевой цепи в водных экосистемах. Несмотря на большое количество опытов с инфузориями, для исследования их чувствительности к неорганическим и органическим токсикантам, ёмко систематизированных в статье [92], стандартных тестов на острую токсичность за рубежом не было. В начале 2000-х гг. был разработан тест *Spyrotox*, в котором в качестве тест-реакции использовалась червеобразная инфузория спиростома *Spyrostomum ambiguum*, у которой тест-реакции летальности и изменения подвижности (локомоций) контролировались визуально. Опыты на спиростоме приведены в [93] и учебнике по биотестированию [94].

Хемотаксические тесты на инфузориях. Весьма перспективными были разработки теста на инфузориях на основе тест-реакции хемотаксиса — перемещения популяции по пространственному градиенту токсиканта. В общих чертах принцип методики теста основан на капиллярном методе: инфузории *Tetrahymena sp.* (пресные или морские), выдержанные в токсиканте, входят в капилляр с пищей, а затем их считают под микроскопом, обездвигив фиксирующим реагентом. При исследовании учитывались возраст культур, плотность взвеси клеток во время тестирования, режим кормления, инфузорий, осмотическое давление среды и период голодания перед тестированием, усиливающий движение к корму [95].

В СССР в конце 1980-х гг. был разработан хемотаксический микробиотест [96], для аппаратного контроля которого был спроектирован специализированный прибор [97], позволяющий измерять концентрацию инфузорий *Paramecium caudatum* в диапазоне от единиц до 2000 кл/мл. Принцип работы прибора основан на учете закономерностей движения инфузорий. Время тестирования — 30 мин. Объем проб — не более 100 мл. Была разработана модификация прибора для малотоннажных плавсредств [98]. На базе микробиотеста в РФ созданы хемотаксические методики контроля токсичности воды [6].

Тест на коловратках. В качестве тестов на острую токсичность с 1970-х гг. применялись коловратки — беспозвоночные животные размерами 50–1500 мкм. Тест для оценки острой токсичности пресной воды и морской воды, использующий пресный вид коловратки *B. calyciflorus* и морской *B. plicatilis*, был стандартизирован ASTM. На коловратках было проведено тестирование 50-ти приоритетных для европейской программы токсикантов. Коловратки можно получать из цист [99].

Хроническая токсичность. Дафниевые тесты на пресноводных беспозвоночных официально одобрены международными организациями. Разнообразные тесты на многих морских ракообразных в настоящее время используются в рамках международных конвенций. Наиболее незаменимы они в тестах на хроническую токсичность (более 96 ч — до 30 сут), при этом дафний можно получать в виде токситов [26].

Microtox Chronic Toxicity Test разработан для контроля полухронической токсичности, возникающей при длительном воздействии на бактерии токсического стресса. Тестируемый образец вводится в виде жидкой фазы (природные воды, стоки, экстракты). Затем в него добавляются люминесцентные бактерии, которые инкубируются в течение 22 ч, после чего измеряется поток излучения в сравнении с контролем. Результаты теста сравнимы с получаемыми с помощью хронического теста на цериодафниях.

Обсуждение

Развитие направления микробиотестирования отразило особенности современной науки за рубежом. Для привлечения инвестиций ученые должны создать «*brain wear*» — интеллектуальную, а, еще точнее, философскую оболочку проекта. В этой оболочке объединены потребности общества, качественно новые зависимости, поддержка современных технологий и философское обобщение в виде новой терминологии, которая становится «брендом» направления. Стратегические инвесторы хотят вкладывать средства в важные и создающие новую картину мира научные исследования.

Потребности общества побудили развитые страны, ощутив опасность для среды жизни, мобилизовать творческие силы и создать, объединив усилия биологов, химиков, инженеров, систему биотестов для контроля свойств наиболее вредных веществ. Следующим шагом стало создание тестов, обеспечивших экономичность тестирования, при этом опровергнувших прежние представления классической токсикологии о том, что чем меньше организм, тем он менее чувствителен к токсикантам [23]. Учеными разных стран мира достигнуты важные результаты в применении новых биотехнологий: к приоритетным загрязнителям гидросферы получены антитела, индуцированные загрязнителями гены; ферменты, перерабатывающие токсиканты; ингибиторы ферментов; промоторы, сигнальные системы на основе генов инженерии, созданы мутантные штаммы бактерий, способные перерабатывать токсиканты; комплексно исследовано действие биоцидных веществ. Создан инструментарий исследования экотоксичных эффектов: люминогенные субстраты, светящиеся шарики для корма; светящиеся белки, гены для их экспрессии, гены-репортеры, найдены штаммы бактерий, у которых есть гены свечения, но нет люминесценции. Методы ИФА и иммуноблоттинга позволяют выявить сверхмалые количества антигена и идентифицировать белки. Разработаны новые методы хранения тест-объектов, позволяющих получать их без культивации пользователем. Эти работы создавали новую картину мира полученных из гидросферы организмов и их структур, которые стал использовать человек для сохранения среды.

Направление потребовало философского обобщения, которое сделал Кристиан Блэйз, назвав его «микробиотестированием». Такой термин был близок к более общему экономическому тренду «микроминиатюризации» и к концепции риска ALARA (*as low as reasonably achievable* — так мало, как реально достижимо), которая применялась в экотоксикологии [100] и в МАГАТЭ. Направление обозначало вектор развития — уменьшение размеров организмов и объемов проб, что было написано на оборотной стороне обложки первой фундаментальной коллективной монографии, а микробиотестирование стало брендом новых технологий в области экотоксикологии. Прижился именно этот термин, под брендом которого вышли еще несколько коллективных исследований [6, 27], термин прижился в Европе, что показывает публикация финских ученых [62], хотя под редакцией К. Блэйза были выпущены книги, где применялся термин «*small-scale*» [42], но он не прижился, в то время как микробиотесты заслужено вошли в новую энциклопедию водной экотоксикологии [101]. Показательно, что идеологами «*brain wear*» крупных проектов в экотоксикологии стали ученые французской научной школы, в которой традиционно большое внимание уделяется философии: Блэйз, Ферард. Для западного ученого выработка новой философии (обобщающей достижения разных наук и технологий) — важнейший фактор развития направления.

Характерно, что в это же время вышла книга под редакцией Клода Амиарда-Трике, Жана-Клода Амиарда и Филиппа Рэйнбоу «Экологические биомаркеры» — специалистов, исследующихся обитателями водного мира, которая поставила новые проблемы. Авторами вступления в [102] справедливо отмечено, что в экотоксикологии недостаточно «эко».

Высокая воспроизводимость опытов иногда обеспечивалась за счет разрыва экологических связей. Например, водоросли очищали от бактерий антибиотиками, как и ткани губки [54], гидры [82]. Очень важна корректная трактовка результатов тестирования. Низкие пороги обнаружения токсикантов (1 нг/л пестицида = 1 г/1 млн т воды) могут приводить к ложным тревогам, если не учитывать, что пороги — часть системы эффективного регулирования и ремонта повреждений клеток и организмов [102].

Тест-реакции представляют собой не только сигналы опасности, но и часть системы резистентности живого к вредным факторам. Как видно из опытов, после малых доз УФ или ртутных соединений организмы получают резистентность к большим дозам, SOS-мутагенез — тоже защитная реакция. Не учитываются реальные природные факторы (бактерии, газы, изменение кислотности),

микроводоросли для опытов получают из культуры, погруженной в анабиоз. При разработке экологических норм для природных вод не учитывается самоочищение воды и селективные свойства почвы.

Еще одна проблема заключается в увеличении количества мутантов, которые требуются для охраны среды. Есть два подхода к биотестам: обеспечить контроль тест-реакции созданием тест-объектов с новыми свойствами или сохранить имеющиеся организмы, но разработать новые средства измерения. Как всегда, в тестировании эти подходы дополняют друг друга, но важно, чтобы не было монополии одного подхода.

Суммируя положения обсуждения, можно сказать, что введение в биотесты новых тест-объектов, по которым не собраны банки данных, отражающих их чувствительность к разным вредным факторам, создание тестов с методами хранения культуры в состоянии анабиоза, снижает спрос на такие биотесты со стороны организаций, утверждающих природоохранные стандарты. В свою очередь, экономичность, удобство для пользователя и уменьшение времени тестов позволяет им находить свою «экологическую нишу» в скрининге качества антропогенных вод, токсичности отходов, применении при чрезвычайных ситуациях, что позволяет набирать необходимые банки данных. Это показывает рациональность не замены, а дополнения биотестов микробиотестами.

Возможное будущее новое направление микробиотестов для гидросферы — их экологизация, когда будет считаться приоритетным учитывать в тестах как можно больше прежде неучтенных факторов реальной природы, что обусловлено принципом познания: от идеализации объекта природы — к учету факторов, определяющих адекватность его описания для решения новой экологической задачи.

References

1. Carson R. L. The Silent Spring. *Fawcett, Greenwich, Conn.*, 1962. 304 p.
2. Blaise C., Wells P. G. and Lee K. Microscale testing in aquatic toxicology: introduction, historical perspective, and context, in P.G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 1—9.
3. Wells P. G., Lee K. and Blaise C. Microscale testing in aquatic toxicology: Advances, Techniques, and Practice. *CRC Press, Boca Raton, Florida, USA*, 1998. 679 p.
4. Moiseenko T. I. Aquatic Ecotoxicology: Theoretical Principal and Practical Application. *Water resources*. 2008, 35, 5, 554—565 (in Russian).
5. Persoone G., Janssen C. and De Coen W. New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York*, 2000. 550 p.
6. Selivanovskaya S. Yu., Stepanova N. Yu., Latypova V. Z. et al. Bioassay of industrial waste pollutants. *Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment*. N. Y., 2004. P. 15—61.
7. Fedorov M. P., Chusov A. N., Shilin M. B., Gorbunov N. E., Maslikov V. I., Shishkin A. I. Applied aquanom ecology. *SPb., SpbGPU*, 2012. 254 p. (in Russian).
8. Shilin M. B., Khaimina O. V. Applied marine ecology. *SPb., Izdatelstvo RGMU*, 2014. 86 p. (in Russian).
9. Shilin M.B., Golubev D. A., Lednova Yu. A. Technosphere safety applications in dragging. *SPb., Izdatelstvo SPb GPU*, 2010. 385 p. (in Russian).
10. Blaise C., Féraud J.-F. Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, 2013. 1221 p.
11. Ibanez J. G., Hernandez-Esparza M., Doria-Serrano C. et al. Environmental Chemistry. *Springer, Science+Buisnes Media LLC, New York*, 2007. 334 p.
12. Harris C. C. Chemical and Physical Carcinogenesis: advances and perspectives for 1990s. *Cancer Res*. 51, 5023, 1991.
13. Weinstein I. B. The origin of human cancer: molecular mechanism of carcinogenesis and their implication for cancer preventin and treatment. *Cancer Res*. 1988, 48, 4135.
14. Heijden van de C. A. Carcinogen Risk Assessment. *Encyclopedia of Occupational Health and Safety*. URL: <http://www.ilo.org/iloenc/part-iv/toxicology/regulatory-toxicology/item/85-carcinogen-risk-assessment> (date of access: 30.06.2014).
15. Gourlay-France Catherine, Tusseau-Vuillemin Marie-Helene. Bioavailability of contaminants. In *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Jean-François Féraud, Christian Blaise (Eds), *Springer, Netherlands*, 2013. P. 181—190.
16. Chapman P. M. Death by mud: amphipod sediment toxicity tests, in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 451—463.
17. Nalewajko C., Olaveson M. M. Ecophysiological Considerations in Microalgal Toxicity Tests in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 289—307.
18. Blaise C., Féraud J.-F. and Vasseur P. Microplate toxicity tests with microalgae: a review, in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 269—288.
19. Persoone G. Development and first validation of a «stock-culture free» algal microbiotest: the Algaltoxit, in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 311—320.

20. Reish D. M. The Use of Larvae and Small Species of Polychaetes in Marine Toxicological Testing in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 383—393.
21. FRDEP 14.1:2.4.12_06 (FRDEP 16.1:2:3:3.9_06). Methods for determining the toxicity of water extracts from soils; sewage sludge; solid wastes; and potable, sewage, and natural waters on the basis of data on the death rate of *Daphnia magna* Straus.
22. Tokin B. P. Medicinal Plant Poison. Story about phytoncides, 2nd ed. *Leningrad*, 1970. 280 p. (in Russian).
23. Kutsenko S. A. Basic Principles of Toxicology. Scientific and Methodological Edition. *Publishing House «Foliant», St.-Petersburg*, 2004. 325 p.
24. Elinov N. P. Fundamentals of biotechnology. *SPb., Nauka*, 1995. 600 p. (in Russian).
25. Gitelzon I., Rodicheva E., Medvadeva S. Light from World Ocean. *Science in Siberia*. 1999, 32(2218), 20 aug. (in Russian).
26. Persoone G. Development and validation of Toxkit Microbiotests with Invertebrates, in Particular Crustaceans, in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 437—450.
27. Angelaki A., Sakellariou M., Pateras D. and Kungolos A. Assessing the quality of natural waters in Magnesia prefecture in Greece using Toxkits, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 281—288.
28. Aoyama I., Okamura H. and Rong L. Toxicity testing in Japan and the use of Toxkit microbiotests, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 123—133.
29. Dmityuk U. and Dojlido J. Application of Toxkit microbiotests for toxicity evaluation of river waters and waste waters in the region of Warsaw in Poland, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 323—325.
30. Isidori M., Parrella A., Piazza C. M. L. and Strada R. Toxicity screening of surface waters in southern Italy with Toxkit microbiotests, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 289—293.
31. Johnson I. Criteria-based procedure for selecting test methods for effluent testing and its application to Toxkit microbiotests, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 73—94.
32. Lucivjanská V., Lucivjanská M. and Cízek V. Sensitivity comparison of the ISO *Daphnia* and algal test procedures with Toxkit microbiotests, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 243—246.
33. Ruck J. G., Martin M. and Mabon M. Evaluation of Toxkits as methods for monitoring water quality in New Zealand, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 103—119.
34. Törökné A. K. The potential of the Thamnotoxkit microbiotest for routine detection of cyanobacterial toxins, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000. P. 533—539.
35. Vanderbroele M. C., Heijerick D. G., Vangheluwe M. L. and Janssen C. R. Comparison of the conventional algal assay and the Algaltoxkit F™ microbiotest for toxicity evaluation of sediment pore waters, in G. Persoone, C. Janssen and W. M. De Coen (eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2000. P. 261—268.
36. Vinokhodov D. O. Toxicological research of food with using infusoria. *SPb.*, 1995. 80 p. (in Russian).
37. Jonson E. M. Unity and Practical Consideration for In vivo Development Toxicity Testing: Hydra and FETAX Assays in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 361—370.
38. Bitton G., Morel J. L. Microbial Enzyme Assay for the detection of Heavy Metal Toxicity in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 143—152.
39. Obst U., Wessler A., Wiegand-Rosinus M. Enzyme Inhibition for Examination of Toxic Effects in Aquatic Pollution in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 77—96.
40. Bitton G., Ward M., Dagan R. Determination of the heavy metal binding capacity (HMBC) of environmental samples in Blaise C., Féraud J-F. (eds) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 2 — Hazard Assessment Schemes*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 215—232.
41. Qureshi A. A., Bulich A. A., Isenberg D. I. Microtox® Toxicity Test System in Aquatic Pollution in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 201—218.
42. Johnson B. T. Microtox acute toxicity test (eds) Blaise C., Féraud J-F, *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 1 — Toxicity Test Methods*; Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 69—105.
43. Blaise C., Féraud J-F. Effluent Assessment With The Peep (Potential Ecotoxic Effects Probe) Index in Blaise C., Féraud J-F. (eds) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 2 — Hazard Assessment Schemes*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 69—88.
44. Ronco A. et al. The application of Hazard Assessment Schemes using the Watertox toxicity testing battery in Blaise C., Féraud J-F. (eds) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 2 — Hazard Assessment Schemes*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 89—114.

45. Bombardier M. The SED-TOX Index for Toxicity Assessment of contaminated solid matrices in Blaise C., Férard J-F. (eds) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 2 — Hazard Assessment Schemes*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 257—280.
46. Chapman P. M., McDonald B. G. Using the Sediment Quality Triad (SQT) in ecological risk assessment in Blaise C., Férard J-F. (eds) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 2 — Hazard Assessment Schemes*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 305—331.
47. Read H. W., Harkin J. M., Gustavson K. E. Environmental Application with Submitochondrial Particles in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 31—52.
48. Dankwardt A., Pullen S., Bertold H. Immunoassays: Applications for the Aquatic Environment in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 31—52.
49. Alipov A. N., Muravnik L. M., Ronzhina N. L., Safjannikov N. M. Medicine laboratory devices and complexes; N. M. Safjannikov (ed.). SPb., Renome, 2010. 504 p.
50. Western-blotting. URL: <http://www.bialexa.ru/?Page=western-blotting> (date of access: 10.06.2014).
51. Sundaram K. M. S. Fate and short-term persistence of permethrin insecticide injected in a Northern Ontario (Canada) headwater stream. *Pesticide Science*. 1991. 31, 281—294.
52. Thurman E. M. et al. Occurrence of alachlor and its sulphonated metabolite in river and reservoirs of midwestern United States: the importance of sulfonation in the transport of chloroacetanilide herbicides. *Environmental Science & Technology*. 1996, 30, 569—574.
53. Ermolaeva T. N., Kalmykova E. N. Piezoelectric immuno sensors. Analytical applications. *Progress in Chemistry*. 2006, 75 (5), 445—459 (in Russian).
54. Müller W., Müller I. Sponge Cells and Tissue as Biological Monitor of Aquatic Pollution in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 97—112.
55. Lee K., Tay K. L. Measurement of Exoenzyme Activity in Sediments for Environment Impact Assessment in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 219—236.
56. Hodson P., Sherry J., Parrott J. Bioassay to Measure MFO Inducers in Effluent in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 53—76.
57. Paraquat and Diquat: Joint Pub. UN Env. Progr., Int. Labor Org. and WHO. *M., Medicine*, 1989. 159 p. (in Russian).
58. Denizeau F. The use of fish cells in the toxicological evaluation of environmental contaminants in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 113—128.
59. Zhang X., Giesy J. P., Hecker M. Cell lines in Aquatic Toxicology in Blaise C., Férard J-F. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2013. P. 259—268.
60. Gromova E. V. Identification and analyse of cow's heart mitochondria's proteins with proteome technologies. *Autoreferat of dissertation for the degree of Ph.D.*, 03.01.04 — biochemistry, M., 2013 (in Russian).
61. Argese et al. Submitochondrial particle response to linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradation derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.* 1994, 13, 737—742.
62. Biological method of research ponds of Finland. Eds. Ruoppa M, Hainonen P. *Suomen ympäristökeskus, Edita Prima Oy, Helsinki*, 2006. 117 p. (in Russian).
63. Hosokawa Y. Remediation work for mercury contaminated bay — experiences of Minamata bay project. *Japan. Water Sci. Technol.* 1993, 28, 339—348.
64. Moody M., Miller J. Lemna minor growth inhibition test in Blaise C., Férard J-F., (eds) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 1 — Toxicity Test Methods*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 271—298.
65. GOST 32426-2013. Method of test for chemical products, which represents danger for environment. Test on duckweed growth inhibition (in Russian).
66. Tsatsenko L. V., Maluga N. G. The sensitivity of the various tests on water pollution by heavy metals and pesticides with using duckweed *Lemna minor*. *Ecology*. 1998, 5, 407—409 (in Russian).
67. Stauber J., Franklin N., Adams M. Microalgal toxicity test using cytometry in Blaise C., Férard J-F. (eds), *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 1 — Toxicity Test Methods*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 203—241.
68. Anderson B. S., Hunt J. W., Piekarski W. Recent Advances in Toxicity Test Methods Using Kelp Gametophytes in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 255—268.
69. Windimian E. Multitest Index of Effluent Toxicity by PLS regression in Blaise C., Férard J-F. (eds.) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 2 — Hazard Assessment Schemes*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 89—114.
70. Geraskin S. A. et al. Biological control of environment. Genetic monitoring: Textbook for biological specialties. Eds. S. A. Geraskin, E. I. Sarapultzeva. *M., Academia*, 2010. 208 p. (in Russian).
71. Glaser V. M. et al. Assessment of mutagenicity by Aim's test for effluents and wastewater stream of Baical pulp and paper mill. *Biol. Sci.* 1990, 1, 101—109 (in Russian).
72. Johnson B. T. Microtox® Toxicity Test System — New Developments and Applications in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 201—218.
73. The knowledge base on human biology: SOS-system in *E. coli*. URL: <http://humbio.ru/humbio/reparation/00016415.htm> (date of access: 15.06.2014) (in Russian).

74. Hansen P.-D., Herbert A. Small-Scale *in vitro* Genotoxicity Tests for Bacteria and Invertebrates in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 237—252.
75. Using the micronucleus test to assess the effectiveness of the treatment of allergies in children: guidelines/comp. T. S. Kolmakova et al. *Rostov on Don, RostGU*, 2013. 31 p. (in Russian).
76. Ferrier V. et al. Genotoxicity Tests in Amphibians — A Review in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 507—519.
77. Mouche F., Gauthier L. Genotoxicity of Contaminants: Amphibian Micronucleus Assays in Blaise C., Féraud J-F. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2013. P. 547—558.
78. Herbert A., Hansen P.-D. Genotoxicity in Fish Embryos in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 491—505.
79. Oganessyan G. G. et al. Evaluation of DNA damage in fish erythrocytes from different ponds of Armenia by «DNA Comet» Assay. *Biol. Jour. Armenia*. 2012, 4 (64), 64—70 (in Russian).
80. Devaux A., Bonyr S. Genotoxicity of Contaminants: Comet Assay in Blaise C., Féraud J-F. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2013. P. 559—568.
81. Belkin Sh. Stress-Responsive Luminous Bacteria for Toxicity and Genotoxicity Monitoring in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 171—183.
82. Kudla A. J. Hydra reaggregation: a rapid assay to predict teratogenic hazards induced by environmental toxicity. *Journal of The Washington Academy of Sciences*. 1984, 74, 102—107.
83. Ginou C., Holdway D. Gydra in Ecotoxicology in Blaise C., Féraud J-F. (eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2013. P. 615—622.
84. Weis Ju. S., Weis P. Aquatic Testing with Early Stages of Killfish in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 479—490.
85. Dayeh V. et al. Rainbow trout gill cell line microplate cytotoxicity test in Blaise C., Féraud J-F. (eds.) *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 1 — Toxicity Test Methods*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 473—503.
86. Branton M. Microscale Bioassays for Corals in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 371—382.
87. Charles I., McKenney Jr. Physiological Dysfunction in Estuarine Mysids and Larval Decapods with Chronic Pesticide Exposure in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 465—478.
88. Xu H. H. ATP-TOX System — A Review in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 153—160.
89. Pratt J. R., Mochan D. G., Bowers N. J. Ciliate Microbiotest Applications: Metal Contaminants in Water and Soil in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 349—357.
90. Lumistox. URL: http://www.etv-denmark.com/files/water/hach_lange_test_report.pdf (date of access: 20.04.2014).
91. Biotox. The device for ecology control. URL: <http://www.biotox.ru/> (date of access: 20.06.2014) (in Russian).
92. Gilron G. L., Lynn D. Ciliated Protozoa as Test Organism in Toxicity Assessment in Water and Soil in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 323—336.
93. Nalecz-Jawecki G. Spirotox test — Spirostomum ambiguum acute toxicity test in Blaise C., Féraud J-F. (eds.), *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations: V. 1 — Toxicity Test Methods*. Springer Dordrecht, The Netherlands, 2005. P. 299—322.
94. Melehova O. P., Sarapultseva E. I., Evseeva T. I. et al. Biological control of environment: bioindication and biotests: textbook for students of high school. Eds. O. P. Melehova, E. I. Sarapultseva. M., Pub. Center «Academia», 2010. 288 p. (in Russian).
95. Berk G. B., Roberts O. R. Development of a Protozoan Chemoattraction Inhibition Assay for Evaluating Toxicity of Aquatic Pollutants in Water and Soil in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 337—348.
96. Pozharov A. V. et al. Bioassay method for the chemotactic response of paramecium. *Bioassay of effluents; Coll. of Sci. Papers of Acad. of Sci. of USSR*. Chernogolovka, 1988. P. 99—103 (in Russian).
97. Zakharov I. S., Paputskaya N. I., Pozharov A. V. et al. Measuring and computing complex for bioassay. *Medical Technology*. 1995, 1, 42—47 (in Russian).
98. Ahutin V. M., Pozharov A. V., Zakharov I. S. et al. On-board biotest system for water area control. *Human and Sea. SPb.*, 1994. P. 83—88 (in Russian).
99. Terry W. Snell and Colin R. Janssen. Microscale Toxicity Testing with Rotifers in P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1998. P. 409—422.
100. Luch A. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Volume 1: Molecular Toxicology. *Springer, Basel, Switzerland*, 2009. 88 p.
101. Blaise C. Microbiotests in Ecotoxicology in Blaise C., Féraud J-F. (eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2013. P. 721—729.
102. Amiard-Triquet C., Amiard J-C. Introduction in Amiard-Triquet C., Amiard J-C., Rainbow Ph. S. (eds.) *Ecological Biomarkers. Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, London, New-York, 2013. P. 1—14.

Статья поступила в редакцию 23.07.2014 г.