

Инструментальные методы биотестирования вод, почв, грунтов и отходов

Ю. С. Григорьев*, Т. Л. Шашкова*,
Е. С. Стравинскене*, М. А. Субботин*,
Н. К. Артына*, А. А. Андреев*,
И. С. Кравчук*, К. В. Агафонов*

Представлены основные разработки Сибирского федерального университета в области биомониторинга загрязнения окружающей среды. Показаны способы увеличения воспроизводимости результатов биотестирования посредством применения специализированного комплекса аппаратуры, поддержания контролируемых стандартных условий и автоматизации процессов. Представлены подходы к решению проблем недостаточной чувствительности тест-объектов к загрязняющим веществам, большой длительности и высокой трудоемкости выполнения биотестов. Описываемые методы позволяют исследовать токсичность различных сред (водных, почв, грунтов, отходов), а также оценивать воздействие загрязнения на организмы разных трофических уровней. Рассмотрены вопросы разработки и применения экспресс-методов выявления токсичности анализируемых сред.

Ключевые слова: биотесты, методики биотестирования, оборудование для биотестирования, чувствительность биотестов, *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Lemna minor*, *Chlorella vulgaris*.

DOI: 10.52002/0130-2906-2023-5-96-106

Введение

В рамках мониторинга качества окружающей среды биотестирование рассматривается как дополнительный, а в последние годы — все чаще как альтернативный подход наряду с классическими методами аналитической химии [9, 26, 34]. Среди преимуществ биологических методов выделяют интегральную оценку токсичности всех компонентов пробы, простоту и меньшую стоимость, а также отсутствие необходимости применения в больших количествах опасных веществ, например растворителей [34]. Важность оценки качества проб методами биотестирования объясняется также тем, что далеко не все вещества, действующие на организмы в окружающей среде, возможно контролировать с помощью рутинных химических методов [26, 34]. В Российской Федерации методы биотестиру-

* Сибирский федеральный университет; e-mail: gr2897@gmail.com (Григорьев Юрий Сергеевич).

ния получили наиболее широкое применение в соответствии с переизданным в 2014 г. приказом Министерства природных ресурсов и экологии РФ № 536 “Об утверждении Критерии отнесения отходов к I—V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду”. Согласно приказу, результаты биотестирования являются приоритетными в случае их отличия от результатов определения класса опасности расчетным методом. Кроме того, оценка токсичности для гидробионтов обязательна для подтверждения V класса опасности отхода. Рекомендуется в качестве тест-организмов использовать не менее двух объектов из разных систематических групп и за окончательный результат токсичности отхода принимать отклик наиболее чувствительного из них. В целом во всем мире наблюдается растущий интерес к внедрению методов биотестирования в самых разных отраслях. Рассматриваются вопросы использования наиболее развитых и многообразных биотестов для оценки водных проб [34] на разных этапах водопользования, начиная от контроля очистки стоков на очистных сооружениях [12, 27] и заканчивая исследованием качества питьевой воды [20]. При этом ведется постоянный скрининг имеющихся методов биотестирования для выявления наиболее подходящих, проявляющих самую высокую чувствительность к тестируемым веществам или пробам [14, 22, 24].

Работы, направленные на исследование зависимости чувствительности тест-организмов от условий (индивидуальная чувствительность разных видов, длительность экспозиции, состав культивационных сред, pH, температура, исходное количество организмов), многочисленны, однако выявленные зависимости далеко не всегда учитываются в разработанных методиках. В частности, некоторые среды для биотестирования готовятся с добавлением хелатирующих компонентов, таких как EDTA [1, 32], несмотря на влияние этого соединения на концентрацию биодоступных ионов металлов [11]. В настоящей статье описано несколько приемов, реализованных для увеличения чувствительности биотестов в рамках разработанных методик.

Тест-организмы имеют индивидуальные особенности чувствительности к веществам, поэтому необходимость применения батарей биотестов является общепризнанной [10, 14, 18, 26, 33, 34]. Отмечается, что для полной оценки качества проб используемые организмы должны представлять не только разные систематические группы, но и разные трофические уровни [24, 34]. В связи с этим разработанные методы включают биотесты для оценки сред (водных, почв, грунтов, отходов) на предмет наличия острого и хронического токсического воздействия на ракообразных, высшие растения, микроводоросли.

Многие из стандартных методик не обеспечены специализированным оборудованием, позволяющим получать результаты с высокой повторяемостью и воспроизводимостью [1, 2, 28, 32]. Биотесты активно используются в настоящее время, также имеется возможность расширения области их применения, поэтому немаловажными задачами являются снижение трудоемкости выполнения и повышение оперативности таких методов. Приведены основные результаты решения указанных проблем.

Подходы к разработке оборудования и методов для увеличения прецизионности результатов биотестирования

Разработанная приборно-методическая база позволяет проводить биотестирование на ракообразных (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, *Artemia salina*), высших растениях (*Lemna minor*), микроводорослях (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda*, *Dunaliella tertiolecta*). Оценка токсического воздействия может производиться через измерение выживаемости и трофической активности раков, замедленной флуоресценции хлорофилла ряски и микроводорослей, прироста культур микроводорослей. При этом одной из главных задач было создание условий для высокой повторяемости и воспроизводимости результатов биотестирования.

Основным подходом для увеличения прецизионности результатов токсикологических оценок стало обеспечение заданных стабильных условий освещенности, температуры, газообмена, а также автоматизации процессов. Для этих целей были созданы серия климатостатов, устройства для выращивания культур тест-организмов и биотестирования, средства измерения всех оцениваемых тест-функций (откликов тест-организмов на токсические воздействия) (рис. 1).

Климатостаты (Р2, В2, В3 и В4) представляют собой камеры с несколькими полками для размещения тестируемых проб и культур организмов (дафний, цериодрафний, микроводорослей, ряски и др.). Встроенный блок управления регулирует периодическое включение холодильного агрегата и нагревателя. Попарное размещение над каждой полкой светодиодных светильников обеспечивает равномерное световое облучение тест-культур. Вентиляторы, установленные в камере, выравнивают температуру во всем ее объеме. Устройства для биотестирования (УБ-01) или экспонирования тест-организмов (УЭР-03) устанавливаются в камеру климатостата и подключаются к его внутренней сети. Умеренное вращение кассеты с пробами обеспечивает им одинаковую аэрацию, а также дополнительное выравнивание светового облучения и температуры.

Биотестирование на микроводорослях можно выполнять и без использования климатостатов в многокюветных культиваторах серии КВМ. Рав-



Рис. 1. Приборная база для проведения биотестирования: а) климатостат В-4; б) устройство для экспонирования организмов УБ-01; в) измеритель оптической плотности ИПС-03; г) культиватор КВМ-06.

номерные и стабильные условия светового облучения, температуры и газообмена для всех тестируемых проб в данных устройствах достигаются с помощью следующих технических решений. В наклонно установленном корпусе культиватора размещены лампа накаливания (либо нагреватель и светодиодные источники света), кассета с равномерно распределенными по окружности прозрачными емкостями и электродвигатель для вращения кассеты вокруг центральной оси. В корпусе установлен термодатчик, управляющий работой встроенного вентилятора охлаждения и обеспечивающий поддержание заданной температуры внутри устройства. Наклонно стоящая кассета равномерно вращается, обеспечивая одинаковые условия для всех установленных в ней проб.

Одним из основных источников погрешностей при выполнении биотестирования может являться визуальная оценка результатов, например выявление морфологических изменений организмов или подсчет клеток с помощью специальных камер и микроскопа. Большие трудозатраты и невысокую точность таких методов исследователи отмечали уже давно [7], указывая на предпочтительное использование иных показателей количества клеток, в том числе оптической плотности. Для решения данной проблемы, а также в целях оперативного определения прироста культур микроводорослей авторами был разработан измеритель оптической плотности супензий (ИПС-03). Конструкция прибора позволяет производить измерения во флаконах, используемых для проведения биотестирования, без их смеси, а также минимизирует влияние рассеивания света супензией водоросли на результаты измерения оптической плотности.

Оперативность: достижение высокой чувствительности биотестов при оптимизации затраченного времени

Время, затрачиваемое на оценку токсичности проб методом биотестирования, является важным параметром по нескольким причинам. С одной стороны, при рутинном анализе большого числа проб сокращение длительности биотестирования определяет возможности лаборатории по реализации таких работ. Кроме того, значимым направлением является разработка экспресс-анализов с использованием живых организмов разного уровня организации. Однако, с другой стороны, ранняя регистрация отклика организмов на воздействие может привести к неадекватной оценке токсичности пробы.

Считается, что чем дольше тест-организм находится в контакте с анализируемой пробой, тем сильнее проявится токсическое действие содержащихся в нем загрязняющих веществ. Это не всегда правомерно, особенно в отношении культур организмов с высокой скоростью роста. В случае использования их в биотестировании необходимо учитывать прежде всего не длительность анализа, а количество поколений, на которых было испытано воздействие токсиканта. Так, в разработанном авторами биотесте оптическая плотность культуры термофильного штамма *C. vulgaris* в течение суток в контроле увеличивается в 30 раз, тогда как другие стандартные методики рекомендуют увеличение количества клеток водорослей после 72 ч выращивания в 3 или 10 раз [1, 2]. Таким образом, существует вероятность быстрого восстановления культуры *C. vulgaris* после исчерпания

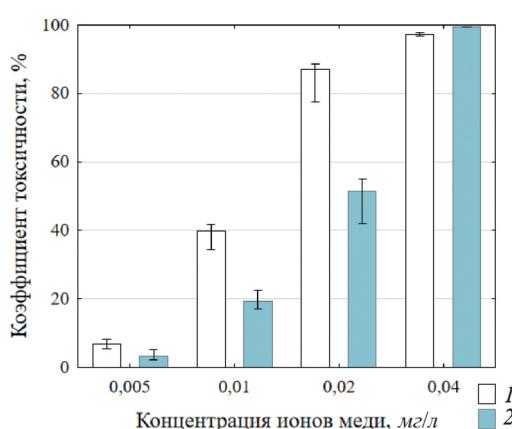


Рис. 2. Коэффициенты токсичности ионов меди для культуры *C. vulgaris* через 24 (1) и 48 ч (2) культивирования (указаны медианные значения и 25-й и 75-й квартили). Статистическая значимость различий определена с помощью критерия Фридмана ($p = 0,05$).

тролем (коэффициент токсичности) выше через 24 ч, а к концу вторых суток эксперимента в некоторых вариантах значительно снижен (например, 87 и 51% соответственно для варианта с 0,02 мг/л Cu^{2+}). При этом максимальная концентрация ионов меди (0,08 мг/л) вызывала практически 100%-ное подавление роста как через 24 ч, так и через 48 ч. Результаты позволяют предположить, что основное токсическое воздействие на тест-объект произошло в начале биотестирования, после чего в вариантах, где осталось какое-то количество живых клеток, культура водоросли начала восстанавливаться. Таким образом, увеличение времени биотестирования в некоторых случаях может приводить к недооценке токсичности пробы. Следует отметить, что рекомендуемое в данной методике время биотестирования (22 ч) охватывает период наибольшей чувствительности культуры *C. vulgaris*.

Создание простых в исполнении оперативных биотестов на микроводорослях, позволяющих получить результат в короткий срок, затруднено из-за требований соблюдения стерильных условий. При этом существуют свидетельства об отсутствии различий чувствительности аксенических и неаксенических культур микроводорослей к ионам меди [21]. С учетом этих данных представляется возможным выращивание нестерильных интенсивных культур, в которых благодаря частым пересевам количество сопутствующих организмов будет поддерживаться на стабильно низком уровне. Кроме того, проблема сохранения альгологической чистоты культур микроводорослей в течение выращивания и биотестирования в нестерильных условиях была решена с помощью термофильного штамма водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer (токситест-90). Данный штамм имеет высокую скорость роста в условиях активного газообмена с внешней средой при температуре 36°C. Эти условия не позволяют другим водорослям успешно

ния сублетальных концентраций токсикантов в среде при увеличении длительности биотестирования. Подобный эффект описан в работе [6], где культуры водорослей в течение последних суток 72-часового эксперимента восстанавливали свою численность до контрольного уровня или выше него после извлечения токсикантов из среды.

Возможность изменения токсического эффекта загрязняющих веществ в течение процедуры биотестирования показана на примере воздействия ионов тяжелых металлов на прирост культуры водоросли хлорелла. На рис. 2 видно, что процент подавления роста культуры ионами меди по сравнению с кон-

развиваться в таких культурах. При этом сам процесс биотестирования удалось сократить до 22 ч.

Длительность биотестирования, не превышающая 24 ч, может значительно увеличить возможности экологических лабораторий. Однако в отдельных случаях, например при необходимости проведения срочных анализов в аварийных ситуациях, даже этот срок может оказаться слишком большим. В этих условиях наиболее подходящими являются экспресс-методы биотестирования, как правило, оценивающие изменение метаболических процессов организмов без регистрации их гибели. Учитывая такие потребности, авторы предложили метод экспресс-оценки состояния растительных организмов, основанный на измерении относительного показателя интенсивности замедленной флуоресценции (ОПЗФ) хлорофилла. Величина ОПЗФ суспензии водоросли определяется как соотношение индукционных максимумов замедленной флуоресценции, регистрируемых в течение нескольких секунд при импульсном возбуждении светом в режимах высокой и низкой интенсивности. При этом ОПЗФ практически не зависит от мутности и цветности тестируемых проб. Для реализации метода был создан флуориметр “Фотон 10”, который в автоматическом режиме может одновременно анализировать на токсичность до 24 образцов, выводя полученную информацию на управляющий компьютер. При этом надежный отклик тест-организма (например, микроводорослей) на токсическое воздействие можно зарегистрировать уже через 1,5 ч, включая предварительную экспозицию проб в культиваторе КВМ-05. Технические возможности флуориметра “Фотон 10” позволяют также измерять и быструю флуоресценцию хлорофилла, благодаря чему стала возможной оперативная оценка токсичности пробы на дафниях через их трофическую активность.

Оценка острой токсичности водных проб традиционно производится по смертности тест-организма *D. magna*, при этом используется визуальный подсчет погибших раков, подвергавшихся воздействию в течение 48—96 ч. В последнее время разные авторы указывают на возможность получения результата в более короткие сроки при регистрации тест-реакции дафний на сублетальном уровне [15, 19], в частности изменение их трофической активности. Используя для регистрации количества поглощаемого дафниями корма флуориметр “Фотон 10”, удалось зафиксировать более чувствительный, чем по оценке смертности, отклик на токсическое воздействие через 17 ч экспонирования. Так, получены следующие эффективные концентрации тяжелых металлов (EC_{50} , мг/л) для *D. magna* при оценке разных тест-функций:

Тест-функция	Co^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}
Выживаемость	$2,26 \pm 0,29$	$0,026 \pm 0,003$	$0,28 \pm 0,03$	$0,029 \pm 0,005$
Трофическая активность	$0,63 \pm 0,35$	$0,023 \pm 0,003$	$0,42 \pm 0,14$	$0,004 \pm 0,002$

Измерения убыли корма производили по показателю нулевого уровня быстрой флуоресценции водоросли в тестируемой среде. При этом 10 дафний двухсуточного возраста, экспонируемые в 50 мл среды, поглощали от 70 до 90% внесенного корма (при исходном содержании клеток водоросли около 1 млн./мл). Для увеличения оперативности и чувствительности ана-

лиза также был использован прием повышения температуры среды с 20 до 25°C во время экспонирования проб с раками. При этой температуре диффузии существенно увеличивают интенсивность поглощения пищи и сохраняют жизнеспособность.

Аналогичный подход был использован для повышения оперативности биотеста на основе оценки смертности науплий *Artemia salina*. Известно, что повышение температуры среды не только ускоряет развитие науплий, но и способствует увеличению чувствительности тест-организма к загрязняющим веществам [5, 31]. Проведенные исследования показали, что среднеэффективная концентрация бихромата калия, выявленная после экспонирования артемий в течение 72 ч при 20°C, аналогична такому же показателю при 26°C через 48 ч экспонирования.

При биотестировании на высших растениях чаще всего в качестве показателей токсического воздействия используются морфологические характеристики. Так, у *L. minor* оценивается окраска листецов, появление хлорозов или некрозов, опадение корней, рассоединение розеток на отдельные листцы, появление новых листецов. Для проявления этих изменений при воздействии токсикантов требуется длительное время экспозиции — от 3 до 14 суток [3, 4]. Можно использовать и другие, достаточно трудоемкие подходы: оценку изменения структуры крахмальных зерен, накопления специфических ферментов (пероксидаз) или реактивных форм кислорода [35]. При этом большим преимуществом биотестирования на ряске является возможность исследования мутных проб, таких как почвенные суспензии. В этом случае токсичность можно определить по степени отрастания корней [29], которые находятся в непосредственном контакте с почвой, что обеспечивает наиболее полное установление содержания загрязняющих веществ в ней. Данная тест-функция позволяет в короткие сроки и с высокой чувствительностью получить количественную оценку действия загрязняющих веществ на ряску.

Традиционно токсичность почвы устанавливается путем биотестирования водной вытяжки из нее. Однако эти методы не позволяют извлечь все токсические вещества, поскольку большая часть их связана самой почвой. Увеличить извлекаемость загрязняющих веществ и повысить биодоступность токсикантов возможно через обеспечение прямого контакта тест-организма с почвенной суспензией. Одним из факторов, усиливающих обмен тест-организма со средой, может выступать перемешивание водной среды, содержащей растворенные исследуемые вещества, в устройствах для экспонирования организмов.

Способы достижения более высокой чувствительности тест-организмов

В условиях лабораторных экспериментов вопрос зависимости чувствительности тест-организмов от состава питательной или культивационной среды часто рассматривается как ключевой в биотестировании. В свете решаемых задач немалое значение имеют простота и удобство приготовления питательных сред, поскольку такой подход позволит сократить этапы проведения биотестирования и, соответственно, снизить вероятность появления ошибок.

Значительно упростить процедуру приготовления питательной среды для водоросли *C. vulgaris* удалось благодаря тому, что выращивание культуры производится на концентрированной среде Тамия (50%), а само биотестирование — на той же среде, разбавленной до 2%. Для реализации такого подхода разработана схема, по которой свежевыращенная культура разбавляется до необходимой концентрации клеток 50%-ной средой Тамия, а затем вносится в тестируемую пробу в соотношении 1 : 24. Таким образом достигается засев необходимого количества клеток и внесение питательных компонентов в достаточном объеме. Проведенные эксперименты показали, что такое разбавление используемой среды практически не влияет на скорость роста культуры водоросли хлорелла при проведении биотестирования, но при этом многократно увеличивает ее чувствительность к токсикантам. В частности, выявлено, что ионы Cu^{2+} в концентрации $0,023 \pm 0,003 \text{ мг/л}$, вызывающие двукратное подавление прироста хлореллы в 2%-ной среде Тамия, не оказывали никакого влияния на рост тест-культуры в 10%- и 50%-ной средах Тамия. Такой же подход успешно реализуется и на ряске. Выращивание культуры в лаборатории проводится на 100%-ной среде Штейнберга [17], использование разбавленной питательной среды в опытах с токсикантами (в частности, с ионами тяжелых металлов) позволяет не ограничивать рост ряски при экспозиции в течение 3—4 суток, а существенно снизить возможность маскирования токсикантов и увеличить чувствительность тест-объекта.

Влияние питательных элементов на чувствительность микроводорослей к токсикантам, преимущественно к ионам тяжелых металлов, исследовано достаточно обширно [16, 23, 25]. Известно, что повышенное содержание ионов жесткости Ca^{2+} и Mg^{2+} в питательной среде может привести к их конкуренции с катионами тяжелых металлов у поверхности клеточной стенки, замедляя таким образом усвоение токсикантов водорослью из среды [8]. Также в отношении металлов микроводоросли имеют несколько способов внутриклеточной детоксикации, зависящих от состава питательной среды. Так, было описано одновременное увеличение поглощения металлов и толерантности к ним микроводорослей в обогащенных фосфором и азотом средах [23]. Данный эффект можно объяснить прежде всего увеличенной продукцией фитохелатинов и полифосфатов в таких условиях, способных связывать ионы металлов [23, 30].

Еще одним решением, позволяющим увеличить чувствительность микроводорослей к токсикантам, стал отказ от внесения в питательную среду хелатирующих компонентов. В стандартных средах данные вещества применяются для предотвращения выпадения железа в осадок [1, 28, 32]. Однако в связи с тем, что такие компоненты, как EDTA (трилон-Б), способны, взаимодействуя с тяжелыми металлами в среде, переводить их в менее доступную для организмов форму [11], их присутствие сопряжено с риском маскировки токсичности пробы. Следует отметить, что в методике биотестирования, предложенной Организацией экономического сотрудничества и развития [28], описана питательная среда с пониженным содержанием EDTA по сравнению с питательной средой, используемой в Агентстве по охране окружающей среды США [32]. В используемых питательных средах железо вносится в форме цитрата, который за счет низкой диссоциации растворенной соли поддерживает концентрацию иона этого металла в среде на минимальном уровне.

Реакция тест-культур на токсическое воздействие зависит также от плотности организмов в тестируемой пробе [13]. Соотношение объема среды и количества тест-объектов в ней определяет дозу воздействия на каждый отдельный организм. Как показали проведенные ранее исследования, увеличение количества клеток водоросли или раков в среде приводило к снижению токсического воздействия тяжелых металлов и, соответственно, увеличению их среднеэффективных концентраций. Так, при увеличении количества дафний с 2 до 18 в пробе одинакового объема значение среднеэффективной концентрации (EC_{50}) ионов Cu^{2+} увеличивалось с 0,02 до 0,09 mg/l соответственно. Подобные результаты были получены и при кратном увеличении объема среды, приходившейся на одну розетку ряски.

Заключение

Применение описанных результатов исследований в целях разработки соответствующих протоколов биотестирования позволило решить ряд проблем, снижающих качество оценки токсичности сред биологическими методами. В частности, при создании методик учтены возможности увеличения чувствительности тест-организмов к токсикантам. Кроме того, удалось, сохраняя высокую чувствительность тест-объектов, сократить время анализа проб на водорослях до 22 ч (при оценке роста культуры) и до 1,5 ч (по воздействию на замедленную флуоресценцию хлорофилла), на дафниях до 17 ч (по снижению трофической активности) и на артемиях до 48 ч, а также в более короткие сроки выявлять токсический эффект загрязняющих веществ на ряsku. При этом создание комплекса специализированного оборудования позволило обеспечить высокую повторяемость и воспроизводимость получаемых результатов и упростить выполнение всех этапов биотестирования.

Литература

- 1. ГОСТ Р 54496-2011 (ИСО 8692:2004).** Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей. — М., Стандартинформ, 2012, 57 с.
- 2. ФР. 1.39.2007.03223.** Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. — М., АКВАРОС, 2007, 48 с.
- 3. Цаценко Л. В.** Обнаружение ионов тяжелых металлов в воде методом аналитического биотестирования с помощью ряски малой (*Lemna minor* L.). — Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2014, № 48, с. 407—409.
- 4. Цаценко Л. В., Пасхалиди В. Г.** Рясковые как модельный объект в биотестировании водной и почвенной среды. — Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур, 2018, № 4 (176), с. 146—151.
- 5. Amponsah N., Oyinlola A., Patel T., et al.** Synergistic effects of temperature and pollution on *Artemia salina*. — J. Biolog. Sci., 2017, vol. 3, pp. 1—5.
- 6. Angel B. M., Simpson S. L., Chariton A. A., Stauber J. L., and Jolley D. F.** Time-averaged copper concentrations from continuous exposures predicts pulsed exposure toxicity to the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*: Importance of uptake and elimination. — Aquat. Toxicol., 2015, vol. 164, pp. 1—9; doi: 10.1016/j.aquatox.2015.04.008.

- 7. Burlew J. S.** Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant. — Carnegie Institution of Washington, 1953, 357 p.
- 8. Charles A. L., Markich S. J., Stauber J. L., and De Filippis L. F.** The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). — *Aquat. Toxicol.*, 2002, vol. 60, No. 12, pp. 61—73.
- 9. de Baat M. L., Bas D. A., van Beusekom S. A. M., et al.** Nationwide screening of surface water toxicity to algae. — *Sci. Total Environ.*, 2018, vol. 645, pp. 780—787; doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.214.
- 10. Escher B. I., Ait-Aissa S., Behnisch P. A., et al.** Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. — *Sci. Total Environ.*, 2018, vol. 628—629, pp. 748—765; doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.340.
- 11. Fawaz E. G., Salam D. A., and Kamareddine L.** Evaluation of copper toxicity using site specific algae and water chemistry: Field validation of laboratory bioassays. — *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 2018, vol. 155, pp. 59—65; doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.054.
- 12. Finlayson K. A., Leusch F. D. L., and van de Merwe J. P.** Review of ecologically relevant in vitro bioassays to supplement current in vivo tests for whole effluent toxicity testing. Part 1: Apical endpoints. — *Sci. Total Environ.*, 2022, vol. 851, 157817; doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157817.
- 13. Franklin N. M., Stauber L., Apte S., and Lim R. P.** Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. — *Environ. Toxicol. and Chem.*, 2002, vol. 21, pp. 742—751.
- 14. Ghosh P., Thakur I. S., and Kaushik A.** Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. — *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 2017, vol. 141, pp. 259—270; doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.023.
- 15. Grintzalis K., Daia W., Panagiotidisa K., Belavgenia A., and Viant M. R.** Miniaturising acute toxicity and feeding rate measurements in *Daphnia magna*. — *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 2017, vol. 139, pp. 352—357; doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.02.002.
- 16. Hong H. S., Wang M. H., Huang X. G., and Wang D. Z.** Effects of macronutrient additions on nickel uptake and distribution in the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. — *Environ. Pollut.*, 2009, vol. 157, pp. 1933—1938
- 17. ISO/DIS 20079.** Water quality—determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*). Duckweed Growth Inhibition Test. ISO TC 147/SC 5/WG 5, 2004.
- 18. Jia A., Escher B. I., Leusch F. D. L., et al.** In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. — *Water Res.*, 2015, vol. 80, pp. 1—11; doi: 10.1016/j.watres.2015.05.020.
- 19. Lari E., Steinkey D., and Pyle G. G.** A novel apparatus for evaluating contaminant effects on feeding activity and heart rate in *Daphnia* spp. — *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 2017, vol. 135 pp. 381—386; doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.018.
- 20. Leusch F. D. L., Khan S. J., Laingam S., et al.** Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. — *Water Res.*, 2014, vol. 49, pp. 300—315; doi: 10.1016/j.watres.2013.11.030.
- 21. Levy J. L., Stauber J. L., Wakelin S. A., and Jolley D. F.** The effect of bacteria on the sensitivity of microalgae to copper in laboratory bioassays. — *Chemosphere*, 2009, vol. 74, pp. 1266—1274; doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.08.019.
- 22. Louisse J., Dingemans M. M. L., Baken K. A., et al.** Exploration of ToxCast/Tox21 bioassays as candidate bioanalytical tools for measuring groups of chemicals in water. — *Chemosphere*, 2018, vol. 209, pp. 373—380; doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.056.
- 23. Ma J., Chen F., Zhou B., et al.** Effects of nitrogen and phosphorus availability on cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. — *Sci. Total Environ.*, 2022, vol. 838, 156615; doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156615.
- 24. Magalhaes D. P., Marques M. R. C., Baptista D. F., and Buss D. F.** Selecting a sensitive battery of bioassays to detect toxic effects of metals in effluents. — *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 2014, vol. 110, pp. 73—81; doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.08.019.
- 25. Miao A. J. and Wang W. X.** Cadmium toxicity to two marine phytoplankton under different nutrient conditions. — *Aquat. Toxicol.*, 2006, vol. 78, pp. 114—126.

- 26. Neale P. A., Altenburger R., Ait-Aissa S., et al.** Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. — Water Res., 2017, vol. 123, pp. 734—750; doi: 10.1016/j.watres.2017.07.016.
- 27. Neale P. A., Munz N. A., Ait-Aissa S., et al.** Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. — Sci. Total Environ., 2017, vol. 576, pp. 785—795; doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.141.
- 28. OECD.** Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. — OECD Publishing, Paris, 2011; doi: 10.1787/9789264069923-en.
- 29. Park A. et al.** A novel bioassay using root re-growth in *Lemna*. — Aquat. Toxicol., 2013, vol. 140—141, pp. 415—424.
- 30. Rijstenbil J. W., Dehairs F., Ehrlich R., and Wijnholds J. A.** Effect of the nitrogen status on copper accumulation and pools of metal-binding peptides in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana*. — Aquat. Toxicol., 1998, vol. 42, pp. 187—209.
- 31. Saygi Y.** Effects of temperature on survival and growth of *Artemia* from Tuz Lake. — The Israeli J. Aquaculture — Bamidgeh, 2002, vol. 54, No. 3, pp. 125—133; doi: 10.46989/001c.20319.
- 32. USEPA.** Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. /4th ed. — Washington, Office of Water, United States Environmental Protection Agency, 2002, EPA-821-R-02-013.
- 33. Valitalo P., Massei R., Heiskanen I., et al.** Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment. — Water Res., 2017, vol. 126, pp. 153—163; doi: 10.1016/j.watres.2017.09.014.
- 34. Wieczerek M., Namiesnik J., and Kudlak B.** Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. — Environ. Int., 2016, vol. 94, pp. 341—361; doi: 10.1016/j.envint.2016.05.017.
- 35. Ziegler P., Sree K. S., and Appenroth K. J.** Duckweeds for water remediation and toxicity testing. — Toxicol. and Environ. Chem., 2016, vol. 98, No 10, pp. 1127—1154; doi: 10.1080/02772248.2015.1094701.

Поступила в редакцию 28 II 2023 г., принятая к публикации 27 III 2023 г.

INSTRUMENTAL BIOASSAYS FOR ASSESSING WATER, SOIL, AND WASTE TOXICITY

Yu. S. Grigor'ev, T. L. Shashkova, E. S. Stravinskene,
M. A. Subbotin, N. K. Artyna, A. A. Andreev,
I. S. Kravchuk, and K. V. Agafonov

The paper discusses the main achievements of the Siberian Federal University in the field of environmental pollution biomonitoring. Methods for increasing the reproducibility of bioassay results by using a specialized instrumental set, maintaining controlled standard conditions, and automating processes are shown. Approaches to solving the problems of insufficient sensitivity of test objects to pollutants and the long duration and high labor intensity of bioassays are presented. The described methods make it possible to study toxicity of various environments (water, soil, waste), as well as to evaluate the impact of pollutants on organisms of different trophic levels. The issues of developing and implementing rapid methods for detecting toxicity of the analyzed environments are addressed.