

Факторы получения репрезентативных результатов биотестирования водных сред (обзор)

© 2021. А. С. Олькова¹, д. б. н., доцент,

Т. Я. Ашихмина^{1, 2}, д. т. н., профессор, г. н. с., зав. лабораторией,

¹Вятский государственный университет,

610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

e-mail: morgan-abend@mail.ru

Согласно принципам биотестирования предполагается, что различия в ответных реакциях подопытных организмов будут обусловлены только действием спектра химических веществ, присутствующих в пробе и отсутствующих в контрольной среде. Однако в реальных условиях формирование результата биотестирования остаётся многофакторным сложным процессом. Первая группа факторов зависит от свойств тестируемой среды: качественного и количественного химического состава, его стабильности, присутствия и взаимодействия биогенных и потенциально токсичных веществ. Во-вторых, рассмотрены зависимости результатов биотестов от выбранного тест-организма и его ответных реакций. Третья группа факторов формируется самим исследователем и включает: условия содержания и состояние тест-организмов на момент выполнения опыта, выполнение требований к технике и условиям эксперимента и другие субъективные аспекты. Мировые тенденции в сфере биодиагностики состояния окружающей среды направлены на унификацию и стандартизацию методов и технологий проведения биотестов с учётом множества факторов, способных модифицировать итоговый результат биоанализа. Представленный материал может использоваться при интерпретации результатов биотестирования природных и техногенных сред.

Ключевые слова: биотестирование водных сред, тест-организмы, факторы токсичности, стандартизация условий проведения биотестирования.

Factors of obtaining representative results of bioassay of aquatic environments (review)

© 2021. A. S. Olkova¹ ORCID: 0000-0002-5798-8211^{*}

T. Ya. Ashikhmina^{1, 2} ORCID: 0000-0002-6611-8349^{*}

¹Vyatka State University,

36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

²Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of RAS,

28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

e-mail: morgan-abend@mail.ru

The principles of bioassay state that differences in the responses of experimental organisms are due only to the action of the spectrum of chemicals present in the sample and absent in the control environment. However, under real conditions, the formation of a bioassay result is a multifactorial complex process. The first group of factors depends on the properties of the tested medium: qualitative and quantitative chemical composition, its stability, the presence and interaction of biogenic and potentially toxic substances. Secondly, the dependences of the biotest results on the selected test organism and its responses are considered. The third group of factors is formed by the researcher himself and includes: the maintenance conditions of the test culture, the state of the test culture at the time of the experiment, compliance with the requirements for the laboratory base, compliance with the experimental technique and other subjective aspects. World trends in the field of biodiagnosics of the state of the environment are aimed at unification and standardization of methods and technologies for conducting bioassay, taking into account many factors that can modify the final result of bioanalysis. The presented material can be used to interpret the results of bioassay of natural and man-made environments.

Keywords: bioassay of aquatic environments, test organisms, toxicity factors, standardization of conditions for bioassay.

Методы биотестирования заслуженно заняли своё место в инструментарии экологических работ, поскольку способствуют обнаружению низких доз загрязняющих веществ (ЗВ) [1, 2], выявлению эффектов новых токсикантов и их смесей [3], проведению экологического мониторинга в соответствии с международными и национальными директивами по охране окружающей среды [4, 5]. Совершенствование методологии биотестирования направлено на максимальный учёт факторов, влияющих на реакции тест-организмов, а, значит, и на заключение о токсичности [6]. Данные факторы подразделяются на:

- параметры исследуемой водной среды, такие как стабильность её качественного и количественного химического состава, концентрации как биогенных, так и потенциально токсичных соединений, возможное взаимодействие веществ;

- факторы, связанные с выбранным тест-организмом и методом биотестирования, включая тест-функцию и её характер (биохимический, физиологический, морфологический, поведенческий);

- условия, формируемые исследователем – исполнителем процедур биотестирования: параметры содержания культур, их характеристики на момент проведения серии опытов, выполнение требований к лабораторным условиям, соблюдение техники эксперимента и многое другое.

Цель данной работы – анализ и систематизация факторов, влияющих на результат определения степени токсичности водных сред с помощью тест-организмов.

Свойства тестируемой среды и её компонентов

Физические и физико-химические свойства молекул токсикантов, влияющие на их токсичность. В водных средах все химические вещества могут потенциально влиять на жизнедеятельность живых организмов. Естественные компоненты природной воды составляют её химическую «матрицу», многие части которой являются необходимыми биогенными элементами, либо эссенциальными элементами, обладающими значительной биологической ролью для представителей биоты. Превышение концентрации веществ и элементов относительно природного фона или поступление в среду обитания химических соединений, не свойственных данной экосистеме составляет суть проблемы загрязнения

окружающей среды. В таблице 1 обобщены основные свойства химических веществ, обуславливающих их взаимодействие с целостным организмом и молекулами-биомолекулами токсикантов [7–10].

Безусловно, рассмотренные свойства молекул токсикантов влияют на их токсичность в совокупности с другими факторами: дозой и временем контакта с организмами. Кроме того, абиотические условия проведения эксперимента влияют на биодоступность токсикантов, и, следовательно, на результат биотестирования.

Физико-химические свойства тестируемой водной среды и биодоступность токсикантов. Методологическим преимуществом биотестирования для диагностики наличия загрязнения является то, что такие важные параметры, как освещённость, температура, суточные и сезонные колебания физических и физико-химических параметров водной среды, устраняются благодаря постановке эксперимента в контролируемых условиях. Однако, многие особенности тестируемой водной среды являются её неотъемлемой частью и модифицируют действие потенциально токсичных веществ (табл. 2).

Перечисленные свойства водной среды влияют на проявление токсичности ЗВ через процессы формообразования, сорбции и десорбции, окислительно-восстановительных реакций, процессов осаждения и соосаждения элементов. Различное сочетание таких физико-химических параметров, как уровень рН и жёсткость также существенно модифицируют токсичность веществ [11].

Так, известно, что истинно растворённые формы металлов и микроэлементов – аква-ионы, ионные пары, низкомолекулярные органические соединения, включающие в состав элемент, – обладают максимальной биодоступностью, а соответственно и токсичностью для живых организмов [12]. И напротив, высокомолекулярные органоминеральные вещества, прочные хелатные комплексы, а также формы металлов с низкой растворимостью не являются биодоступными, следовательно, не приводят к опасным токсическим эффектам у подопытных организмов [13].

Комплексообразование за счёт лигандов органического вещества – это один из основных механизмов снижения биодоступности и причина низкой токсичности «связанных» элементов. Известно, что 1 мг/л органического вещества взаимодействует с 4,4 мкг/л условного металла [14]. Интересен факт, что орга-

Таблица 1 / Table 1

Физические и физико-химические свойства молекул токсикантов и их токсичность
Physical and physicochemical properties of toxicant molecules and their toxicity

Свойства молекул Т* Properties of Т* molecules	Механизм взаимодействия молекул Т и БМ* The mechanism of interaction of T and BM* molecules	Примеры The examples
Размер молекулы и молекулярная масса Molecule size and molecular weight	От размера молекулы Т зависит способ его проникновения в клетки организма: от простой диффузии для наименьших молекул и частиц (ионы неорганических веществ) до активного белкового транспорта высокомолекулярных соединений (ВМС)	Низкомолекулярные соединения (газы CO, CO ₂ , NH ₃) легче проникают в организм и распределяются в нем. Однако, липофильные ВМС способны проявлять высокую токсичность за счёт проникновения через фосфолипидную оболочку клеток и образование прочных связей Т-БМ
Изомерия. Пространственная организация изомеров вещества / Isomerism. Spatial organization of isomers of a substance	Ряд веществ может нарушать пространственную координацию БМ. Другие соединения образуют комплексы Т-БМ с последующими эффектами, зависящими от концентрации Т, прочности комплекса Т-БМ, важности БМ для жизнедеятельности организма	Изомеры неорганических веществ (фосфорные кислоты) и низкомолекулярных органических веществ (дихлорэтан) действуют неспецифически, проявляя одинаковую токсичность. Напротив, изомеры ВМС (синтетический инсулин) значительно различаются по токсичности, действуя специфически на БМ
Растворимость в воде и жирах Solubility in water and fats	В клетках и большинстве органов чередуются водные и липидные барьеры. Это универсальный механизм защиты организма от проникновения и распространения Т. Поэтому наиболее опасными являются вещества, способные растворяться как в воде, так и в липидах	Хорошо растворимые в воде хлорид и нитрат бария более токсичны по сравнению с малорастворимым сульфатом бария. Растворимость органических соединений в жирах увеличивается в ответ на возрастание молекулярной массы, что приводит к увеличению токсичности (ряд от метанола к октанолу)
Стабильность и химическая активность веществ Stability and reactivity of substances	Стабильность вещества в окружающей среде способствует его пространственному распространению с загрязнением большой площади. Химически активные вещества производят локальные нарушения, действуя как сильные окислители или восстановители	Пестициды первых поколений отличались высокой стабильностью, что привело к их распространению по всей Земле и явлениям биоаккумуляции. Современные пестициды сочетают в себе химическую активность и нестойкость, приводя к локальному загрязнению продуктами их трансформации
Химическая связь Т-БМ Chemical bond Т-БМ	Способности молекул к ионизации, поляризации, особенности внешних орбиталей электронов приводят к разнообразию химических связей Т-БМ	Ионные и ковалентные связи Т-БМ наиболее прочны и опасны (фосфорорганические соединения + ацетилхолинэстераза). Токсичность других комплексов Т-БМ зависит от дозы вещества и скорости его биотрансформации

Примечание: Т – токсикант, БМ – биологическая молекула.
Note: T is a toxicant, BM is a biological molecule.

Таблица 2 / Table 2

Влияние свойств тестируемой водной среды на биодоступность и проявление токсических эффектов загрязняющих веществ (ЗВ) / Influence of the properties of the tested aquatic environment on bioavailability and the manifestation of toxic effects of pollutants

Параметр Parameter	Влияние на биодоступность и токсичность ЗВ / Influence on the bioavailability and toxicity of substances	Исключения Exceptions
Взвешенное вещество Suspended matter	Снижение токсичности за счёт адсорбции и абсорбции растворённых ЗВ	Гидробионты с фильтрующим типом питания поглощают ЗВ вместе со взвесями
Вещества комплексообразователи Complexing agents	Снижение токсичности коррелирует со степенью химического сродства ЗВ и комплексообразователя, а также стабильностью новых комплексов	Имеются данные о повышении токсичности некоторых хелатных комплексов металлов, например, фульватных комплексов ртути
Жёсткость воды Hardness of water	Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} снижают токсичность, уменьшая проницаемость биомембран. Также токсичность уменьшается, если ЗВ образует плохо растворимые соединения с ионами жёсткости, например, карбонатные комплексы	Многие органические ЗВ не взаимодействуют с ионами в жёсткой воде и/или проникают в организм путём активного транспорта
Уровень pH среды pH of the medium	Количество лабильных токсичных форм большинства неорганических веществ растёт при снижении pH	Реакция среды может выступать как фактор токсичности. Критические и оптимальные уровни pH видоспецифичны
Растворённый кислород Dissolved oxygen	При недостатке O_2 токсичность ЗВ возрастает из-за дыхательного стресса гидробионтов, кроме того, восстановленные формы многих элементов становятся токсичнее	Оптимальный уровень кислорода в воде способствует ослаблению токсических эффектов ЗВ. Критические уровни содержания растворённого кислорода в воде видоспецифичны
Полизагрязнение Polypollution	Токсичность ЗВ может как повышаться, так и снижаться за счёт явлений коергизма и псевдокоергизма	Вещества, не взаимодействующие в водной среде и во внутренних биосредах организма, не влияют на эффекты друг друга

ническое вещество в пресных водах обладает большим протекторным действием, чем его аналогичное содержание в морской воде [15].

Низкий уровень pH водной среды или почвенного раствора на фоне высокого содержания гуминовых веществ, особенно фульвокислот, приводит к увеличению содержания ионных форм металлов, что крайне опасно для гидробионтов [16, 17]. В биотестах на *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg показано, что увеличение лабильности токсичных элементов приводит к повышению острой и хронической токсичности вод и экстрактов из донных отложений, например, по показателю генотоксичности для *Chironomus riparius* Meigen [18].

Встречаются и противоположные сведения. Показано, что токсичность растворимых солей хрома и никеля для индийского карпа значительно выше при высоком значении pH (9,0 ед.), чем при низком (6,0 ед.), кроме того,

токсическое действие данных тяжёлых металлов снижается в жёсткой воде [19].

В большинстве протоколов биотестирования предусмотрено измерение значений pH, температуры среды, концентрации растворённого кислорода [20–24]. Значение этих факторов затем учитывается при интерпретации результатов.

Контаминация веществ и их совместное действие. Тестируемая среда – это многокомпонентная система, в которой невозможно исключить контаминацию множества природных веществ и соединений антропогенного происхождения [3, 25]. Совокупность эффектов веществ при их совместном действии, без подразделения по механизмам действия, называют коергизмом [7]. Истинный коергизм включает в себя простую суммацию эффектов (аддитивный синергизм), усиление действия веществ друг другом (потенцирующий синергизм) и антагонизм. В водной среде вещества

ещё до аппликации или проникновения в живой организм могут адсорбироваться на поверхности каких-либо частиц, осаждаться, взаимодействовать между собой, изменять химическую форму в зависимости от параметров природного раствора (температура, рН, концентрация минеральных солей и т. д.). Модификация токсичности веществ вследствие таких процессов называется псевдокоергизмом. Такие процессы часто повышают устойчивость экосистем к загрязнению.

Механизмы истинного коергизма основаны на изменении токсикодинамики веществ при совместном поступлении в организм. Например, в длительных экспериментах на моллюсках *Mytilus galloprovincialis* продемонстрировано смягчение ответных реакций, происходящих в лизосомах организмов, за счёт антагонизма пестицида хлорпирифоса и никеля [26].

Соотношения токсичных веществ, их комбинации, а иногда и длительность эксперимента также влияют на итоговые биологические эффекты смесей [27, 28]. В тестах на *Oreochromis niloticus* (нильская тилapia) показано, что смесь цинка и меди приводит к синергизму их действия, но при соотношении 1:1 наблюдается антагонизм этих металлов и снижение смертности рыб [29].

Анализ факторов, действующих на тест-организмы со стороны тестируемой среды и её компонентов, приводит к выводу, что чаще всего нельзя выделить одно свойство, которое бы объясняло токсичность. Именно поэтому в методологии биотестирования часто используют термин «интегральная токсичность», которая формируется совокупностью действующих факторов.

Факторы чувствительности организмов к химическим веществам

Формирование ответных реакций на токсическое воздействие у разных биологических видов. В молекуле ДНК, носители генетической информации, закодированы физиологические, морфологические, биохимические и все другие видовые особенности, которые проявляются в ходе жизни и развития организма, определяя в том числе и взаимодействия «токсикант-биологическая мишень». Вторым принципом формирования разных по этиологии и силе проявления реакций организмов на загрязнение среды обитания является снижение чувствительности организмов по мере усложнения их эволюционно

обусловленной организации. Эту позицию объясняет то, что повышение организованности биологического вида включает в себя и совершенствование токсикологических барьеров [8, 30, 31]. Встречаются исключения из этого базового принципа. Так, в исследовании детоксикации фосфорорганических и N-метилкарбаматных пестицидов показано, что печень крысы (*in vitro*) обладает большим детоксикационным потенциалом, чем образцы клеток печени человека [8].

В биотестировании ориентируются на различия в чувствительности к токсикантам у разных видов и выделение самых отзывчивых к воздействию организмов является главным принципом разработки информативных биотестов. Также систематически далёкие друг от друга виды принято использовать в экологических исследованиях для определения наиболее уязвимой группы организмов при сложившемся загрязнении. Так формируется «батарея биотестов», которая включает минимум три биотеста с использованием разных организмов. Часто используют сочетания низших ракообразных, одноклеточных водорослей и высших водных растений [32, 33].

Механизмы внутривидовой чувствительности организмов. Генетический полиморфизм, то есть существование в одной популяции двух и более резко различающихся аллелей одного и того же гена, – это механизм и первопричина многих межиндивидуальных различий организмов одного вида [34]. Например, известно, что ген цитохрома человека P450 (CYP2D6) обладает высокой полиморфностью, что приводит к широким этническим и межиндивидуальным различиям в метаболизме токсикантов [35].

Примером из области биотестирования могут служить белые лабораторные мыши, как правило гибриды подвидов *Mus musculus domesticus* и *Mus musculus musculus*. Их популяции являются одними из наиболее часто используемых тест-систем для выявления и изучения различных эффектов, в том числе различий токсичности веществ на внутривидовом уровне. С помощью генетически гетерогенной популяции мышей показано, что современные пищевые добавки могут обладать потенциальной опасностью, обнаружение которой осложняется внутривидовой чувствительностью к определённому веществу только части популяции [36].

Частный случай генетически обусловленной индивидуальной чувствительности к веществам – это различия, связанные с по-

лом. Они могут формироваться за счёт гормональных особенностей, разного соотношения жировых и водных фракций у самцов и самок, специфических ферментативных отличий, свойственных биологическому виду. Так, кожа спины самок крыс примерно в два раза более проницаема для мочевины, бензойной кислоты и кортизона, чем кожа самцов [7].

Следующая категория причин индивидуальной чувствительности организмов не связана с генетическими особенностями. К ним относят возраст, массу тела, влияние беременности (для млекопитающих) или болезни, годовые и суточные ритмы, регион обитания (для обитающих в естественных условиях организмов), питание. Есть данные, что снижение метаболической активности печени и почечной экскреции у очень молодых или очень старых особей может усилить химическую токсичность веществ [37]. Также вариабельность результатов биотестов может быть вызвана даже незначительной разницей в возрасте тест-организмов. Например, при проведении опытов с использованием мелких членистоногих коллембол [24] разница в возрасте особей в 1 сутки уже влияет на итоговый результат биотестирования, тогда как разница температуры проведения опыта в пределах 1 °C не имеет ощутимого эффекта [38].

При проведении биотестирования большой разброс индивидуальной чувствительности к токсикантам является фактором, снижающим точность и воспроизводимость результатов. Поэтому на роль тест-организмов разработчики биотестов часто выбирают организмы относительно низкого эволюционного уровня, у которых гетерогенность свойств разных особей минимальна [2, 39, 40].

Условия проведения биотестирования также являются факторами получения объективных результатов биотестирования, формируемых самим исследователем. Для достижения упорядоченности и унификации процедур биотестирования требуется разработка правил, положений, алгоритмов для всеобщего применения, объединяемых в понятие «стандартизация» [40–43]. В области биотестирования стандартизацию можно условно разделить на два направления: стандартизация культур тест-организмов, включая условия их культивирования и/или содержания, и стандартизация условий испытаний.

Стандартизация тест-культур связана с трудностями, исходящими из сути работ с живыми организмами, которые своей генетической изменчивостью, наличием биоритмов

и других факторов, неминуемо создают вариативность своих ответных реакций на токсичные вещества. Например, при сравнении культур одного биологического вида в двух разных лабораториях, можно обнаружить, по меньшей мере, морфологические отличия особей данных искусственных популяций [44, 45].

В современной методологии биотестирования используются два основных приёма стандартизации тест-культур. Во-первых, определение вида используемого организма и дальнейшее поддержание чистоты монокультуры. Это условие имеет большое значение, поскольку разные виды одной систематической группы часто проявляют различную чувствительность к токсикантам. Например, цианобактерии *Nostoc muscorum* Ag., *N. paludosum* Kütz, и *N. linckia* (Roth) Born. et Flah различаются по устойчивости к фосфорсодержащим токсикантам (метилфосфоновой кислоте и гербициду Глифосат) [46].

Во-вторых, поддержание чувствительности культуры организмов к модельному (эталонному) токсиканту на необходимом уровне. К модельному токсиканту предъявляются требования, обоснованные задачами его использования: вещество должно быть стойким в водной среде, количественно определяемым в растворе, минимально опасным для оператора анализа [1, 2, 39]. В России чаще всего применяют соли тяжёлых металлов (сульфат меди, дихромат калия, сульфат цинка). За рубежом спектр эталонных токсикантов гораздо шире. Например, в работе [42] указано, что в руководящем документе США (1994 г.) предлагается использовать следующие соединения в качестве эталонных токсикантов: хлорид натрия (NaCl), хлорид калия (KCl), хлорид кадмия (CdCl₂), сульфат меди (CuSO₄), додецилсульфат натрия и дихромат калия (K₂Cr₂O₇). Также в научных работах можно встретить использование в качестве токсикантов лаурилсульфата натрия, фенола, хлороформа, эндосульфана, хлорида аммония, фторида натрия, этилового спирта и других веществ [47–51].

Проблему обеспечения лабораторий биотестирования стандартизированными тест-культурами учёные МГУ им. М.В. Ломоносова предлагают решать через формирование единого национального банка тест-культур, который гарантировал бы соответствие тест-культуры заданным критериям [42]. Однако, стандартизированная культура быстро теряет свои качества и пригодность к биоанализам в силу различий в химическом составе

культивационных вод, использования даже незначительных вариаций в приёмах культивирования организмов и вследствие действия на них других абиотических и биотических факторов. Нами предлагается проводить контроль пригодности тест-культур к биоанализам на базе каждой испытательной лаборатории по расширенному перечню здоровья тест-организмов [44, 45].

Стандартизация условий культивирования тест-организмов. Создание экологического оптимума абиогенных и биогенных факторов позволяет поддерживать высокую чувствительность культуры, а также нивелировать сезонные колебания состояния тест-организмов. Для биотестирования в основном используются гидробионты, для которых наиболее важными параметрами являются химический состав культивационной воды, а также его стабильность, температурный и световой режим, биогенные параметры, такие как плотность популяции, вид и периодичность кормления, отсутствие организмов-антагонистов [39, 47, 52].

В качестве культивационной среды в настоящее время используют как природные воды, обеспечивающие организмы макро- и микроэлементами, так и искусственные среды, разработанные не только для растений, но и для рыб, ракообразных, хирономид и других организмов [23, 42]. Например, получила распространение среда М4, предложенная для *D. magna*, включающая в свой состав макро- и микроэлементы, а также витамины [53].

При сравнении результатов биоанализов, выполненных с использованием одного и того же тест-организма, необходимо придерживаться одинаковых протоколов испытаний, а также условий содержания культур. Например, только для культуры *D. magna* международными организациями по охране окружающей среды рекомендовано несколько разных методик [21–23, 54]. Алгоритмы этих документов могут отличаться в части плотности посадки организмов в среду, светового периода, вида корма, продолжительности теста и других важных параметров, что, в свою очередь, приводит к разным ответным реакциям у представителей одного и того же биологического вида [52].

Заключение

Итак, на итоговый результат биоанализа влияет множество факторов. Однако получение объективных результатов биотестов воз-

можно. Для этого необходимо обладать информацией о тестируемой среде, затем проводить научно обоснованный выбор тест-организмов с высокой чувствительностью к приоритетным токсикантам, использовать методы исследований, обеспечивающих наиболее строгую стандартизацию тест-культур и условий проведения биотестов. Для исключения ложных «нулевых» результатов биотестирования необходимо внедрять системные биотесты, оценивающие спектр тест-функций одного базового тест-организма. Итоговая интерпретация результатов биотестирования должна проводиться с учётом факторов, потенциально оказавших влияние на ответные реакции подопытных особей: свойства тестируемой среды, особенности тест-организмов, характеристики метода исследования и условий проведения экспериментов.

References

1. Ismail M.M., Hassan M., Essam T.M. Biological testing and toxicity bioassays in biodegradation: toward better process control // Toxicity and Biodegradation Testing. Book Series: Methods in Pharmacology and Toxicology / Eds. E.D. Bidoia, R.N. Montagnoli. Humana Press INC, Totowa, USA. 2018. P. 185–205. doi: 10.1007/978-1-4939-7425-2_9
2. Bosch-Orea C., Farre M., Barcelo D. Biosensors and bioassays for environmental monitoring // Past, present and future challenges of biosensors and bioanalytical tools in analytical chemistry: a tribute to professor marco mascini. Book Series: Wilson and Wilsons Comprehensive Analytical Chemistry / Eds. I. Palchetti, P.D. Hansen. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2017. V. 77. P. 337–383. doi: 10.1016/bs.coac.2017.06.004
3. Altenburger R., Scholze M., Busch W., Escher B., Jakobs G., Krauss M., Krueger J., Neil P., Ait-Aissa S., Almeida A.C., Seiler T.B., Brion F., Hilscherova K., Hollert H., Novak J., Schlichting R., Serra H., Shao Y., Tyndall A., Tolefsen K.E., Umbuzeiro G., Williams T.D., Kortenkamp A. Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays // Environment International. 2018. V. 114. P. 95–106. doi: 10.1016/j.envint.2018.02.013
4. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy – EU Water Framework Directive (as amended on October 20, 2014). 2000. [Internet resource] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32000L0060> (Accessed: 14.09.2020).
5. Water code of the Russian Federation (as amended on December 27, 2018). 2006. [Internet resource] <http://docs.cntd.ru/document/901982862> (Accessed: 02.05.2019).

6. Olkova A.S. Modern trends in the development of the methodology of bioassay aquatic environments // Theoretical and Applied Ecology. 2018. V. 3. P. 19–26. doi: 10.25750/1995-4301-2018-3-019-026
7. Kutsenko S.A. Fundamentals of toxicology. Sankt-Peterburg: Foliant, 2004. 715 p. (in Russian).
8. Animal models in toxicology / Ed. S.C. Gad. Boca Raton, FL: CRC Press, 2016. 1152 p.
9. Biochemical physics: frontal research/ Ed. S.D. Varfolomeev, B.B. Berezin. Waltham: Nova Biomedical, 2006. 133 p.
10. *In vitro* environmental toxicology – concepts, application and assessment // Advances in biochemical engineering-biotechnology / Eds. G. Reifferscheid, S. Buchinger. Cham: Springer, 2017. V. 157. 324 p.
11. Horne M.T., Dunson W.A. Effects of low pH, metals, and water hardness on larval amphibians // Archives of environmental contamination and toxicology. 1995. V. 29. No. 4. P. 500–505. doi: 10.1007/BF00208380
12. Nikanorov A.M., Zhulidov A.V. Biomonitoring of metals in freshwater ecosystems. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1991. 311 p. (in Russian).
13. Fokina A.I., Olkova A.S., Lyalina E.I., Darovskikh L.V. Investigation of the patterns of copper bioaccumulation by representatives of autotrophic and heterotrophic organisms // Proceedings of Petrozavodsk State University. 2015. No. 6. P. 50–55 (in Russian).
14. Moiseenko T.I., Dauvalter V.A., Rodyushkin I.V. Mechanisms of circulation of natural and anthropogenic metals in the surface waters of the Subarctic // Water Resources. 1998. V. 25. No. 2. P. 231–243 (in Russian).
15. Zitoun R., Clearwater S.J., Hassler Ch., Thompson K.J., Albert A., Sanderabe S.G. Copper toxicity to blue mussel embryos (*Mytilus galloprovincialis*): The effect of natural dissolved organic matter on copper toxicity in estuarine waters // Science of the Total Environment. 2019. V. 653. P. 300–314. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.263
16. Varshal G.M., Koshcheeva I.Y., Khushvakhtova S.D., Velyukhanova T.K., Tatsii Y.G., Danilova V.N., Tyutyunik O.A., Chkhetiya D.N., Galuzinskaya A.K. Complex formation of mercury with humus acids: An important stage of the biospheric mercury cycle // Geokhimiya. 1999. V. 37. No. 3. P. 269–275 (in Russian).
17. Orlov D.S. Humic acids of soils and the general theory of humification. Moskva: Publishing House of Moscow State University, 1990. 324 p. (in Russian).
18. Miseiko G.N., Tushkova G.I., Tskhai I.V. *Daphnia magna* (Crustacea Cladocera) as a test object in optimal conditions of laboratory cultivation // News of the Altai State University. 2004. No. 3. P. 83–86 (in Russian).
19. Kartikyan S., Mani P. Investigation of the influence of heavy metals on muscle tissue proteins of Indian carp *Cirrhinus mrigala* depending on pH and water hardness // Biophysics. 2014. V. 59. No. 2. P. 392–398 (in Russian).
20. Federal Register 1.39.2007.03222. Biological control methods. Method for determining the toxicity of water and water extracts from soils, sewage sludge, waste by mortality and changes in fertility of daphnia [Internet resource] <https://meganorm.ru/Index2/1/4293842/4293842234.htm> (Accessed: 27.03.2020) (in Russian).
21. ISO 10706-2000. Water quality – determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Applicable from 01.04.2000. International Organization for Standardization: Geneva, 2000. 17 p.
22. ISO 6341-1996. Water quality – determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – acute toxicity test: withdrawn. International Organization for Standardization. Geneva, 1996. 7 p.
23. Test No. 202. *Daphnia* sp. acute immobilisation test. Adopted 23.11.2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2. OECD. 12 p. doi: 10.1787/9789264069947-e
24. ISO 11267. Soil quality-inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Inter. Stand. Org. Ed. Geneve. 1998. P. 1–16.
25. Hecker M., Giesy J.P. Effect-directed analysis of ah-receptor mediated toxicants, mutagens, and endocrine disruptors in sediments and biota // Effect-directed analysis of complex environmental contamination. Book series: Handbook of Environmental Chemistry Series. 2011. V. 15. P. 285–314. doi: 10.1007/978-3-642-18384-3_12
26. Dondero F., Banni M., Negri A. Boatti L., Dagnino A., Viarengo A. Interactions of a pesticide/heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment // BMC GENOMICS. 2011. V. 12. Article No. 195. doi: 10.1186/1471-2164-12-195
27. Hetmanska B., Tomasik P., Tuszyński T. The metal-metal interactions in biological-systems. 2. Saccharomyces-cerevisiae // Water Air and Soil Pollution. 1994. V. 74. No. 3–4. P. 281–288. doi: 10.1007/BF00479795
28. Lin Z., Ping Z., Kong D., Yin K., Cai Z. The ratios of individual chemicals in a mixture determine the degree of joint effect: The climax hypothesis // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2005. V. 49. No. 1. P. 1–8. doi: 10.1007/s00244-003-0206-2
29. Obiakor M.O., Ezeonyejiaku Ch.D. Copper-zinc coergisms and metal toxicity at predefined ratio concentrations: Predictions based on synergistic ratio model // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2015. V. 117. P. 149–154. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.03.035
30. Albert A. Selective toxicity. Physico-chemical bases of therapy. V. 2. Moskva: Medicine, 1989. 432 p. (in Russian).
31. Nikinmaa M. An introduction to aquatic toxicology. London: Academic press, 2014. 252 p.
32. Zovko M., Vidaković-Cifrek Ž., Cvetković Ž., Bošnjir J., Šikić S. Assessment of acrylamide toxicity using a battery of standardised bioassays // Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 2015. V. 66. No. 4. P. 315–321. doi: 10.1515/aiht-2015-66-2715
33. Van der Grinten E., Pikkemaat M.G., Van den Brandhof E.J., Stroomberg G.J., Kraak M.H.S.

Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics // *Chemosphere*. 2010. V. 80. No. 1. P. 1–6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.011

34. Mammalian toxicology / Ed. M.B. Abou-Donia. New York: Wiley, 2015. 720 p.

35. Bernard S., Neville K.A., Nguyen A.T., Flockhart D.A. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the US population: Clinical implications // *Oncologist*. 2006. V. 11. No. 2. P. 126–135. doi: 10.1634/theoncologist.11-2-126

36. Church R.J., Gatti D.M., Urban T.J., Long N., Yang X., Shi Q., Eaddy J.S., Mosedale M., Ballard S., Churchill G.A., Navarro V., Watkins P.B., Threadgill D.W., Harrill A.H. Sensitivity to hepatotoxicity due to epigallocatechin gallate is affected by genetic background in diversity outbred mice // *Food and Chemical Toxicology*. 2015. V. 76. P. 19–26. doi: 10.1016/j.fct.2014.11.008

37. Dybing E., Soderlund E.J. Situations with enhanced chemical risks due to toxicokinetic and toxicodynamic factors // *Regulatory toxicology and pharmacology*. 1999. V. 30. No. 2. Pt. 2. P. 27–30. doi: 10.1006/rtp.1999.1322

38. Crouau Y., Cazes L. What causes variability in the *Folsomia candida* reproduction test? // *Applied Soil Ecology*. 2003. V. 22. No. 2. P. 175–180. doi: 10.1016/S0929-1393(02)00128-2

39. Terekhova V.A. Biotesting technologies in assessing the ecotoxicity of waste // *Ecology of production*. 2009. No. 1. P. 48–52 (in Russian).

40. Kokkali V., Van Delft W. Overview of commercially available bioassays for assessing chemical toxicity in aqueous samples // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014. V. 61. P. 133–135. doi: 10.1016/j.trac.2014.08.001

41. Federal Law of the Russian Federation “On Technical Regulation” dated December 27, 2002 N 184-FZ; ed. from 28.11.2018 // *Rossiyskaya gazeta*. 2002. No. 245 (in Russian).

42. Terekhova V.A., Wadhia K., Fedoseeva E.V., Uchanov P.V. Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions // *Knowledge and management of aquatic ecosystems*. 2018. No. 419. Article No. 32. doi: 10.1051/kmae/2018015

43. Slabbert J.L., Venter E.A. Biological assays for aquatic toxicity testing // *Water Science and Technology*. 1999. V. 39. No. 10–11. P. 367–373. doi: 10.1016/S0273-1223(99)00300-5

44. Olkova A.S. Health monitoring of *Daphnia magna* Straus test culture // *Water and ecology: problems and solutions*. 2019. V. 24. No. 3 (79). P. 59–69. doi: 10.23968/2305-3488.2019.24.3.59-69

45. Olkova A. Control of suitability of the culture *Daphnia magna* Straus for bioassays of aquatic environments, taking into account demographic indicators of model populations // *Water*. 2021. V. 13. No. 1. Article No. 47. doi: 10.3390/w13010047

46. Koval E.V. The influence of cyanobacteria on the vital activity of barley in conditions of contamination with methylphosphonic acid: dissertation ... of a candidate of biological sciences. Tyumen, 2019. 24 p. (in Russian).

47. Snell T.W., Moffat B.D., Janssen C., Persoone G. Acute toxicity tests using rotifers: IV. Effects of cyst age, temperature, and salinity on the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1991. V. 21. No. 3. P. 308–317. doi: 10.1016/0147-6513(91)90070-6

48. Khangaro B.S., Das S. Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC (50) values of other test models // *Journal of Hazardous Materials*. 2009. V. 172. No. 2–3. P. 641–649. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.038

49. Michałowicz J., Duda W. Phenols – sources and toxicity // *Polish Journal of Environmental Studies*. 2007. V. 16. No. 3. P. 347–362.

50. Park J-S., Brown M.T., Han T. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata* // *Aquatic Toxicology*. 2012. V. 106. P. 182–188. doi: 10.1016/j.aquat.2011.10.004

51. Ricco G., Tomei M.C., Ramadori R., Laera G. Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox® // *Water Research*. 2004. V. 38. No. 8. P. 2103–2110. doi: 10.1016/j.watres.2004.01.020

52. Olkova A.S., Kantor G.Y., Kut'yavina T.I., Ashikhmina T.Y. The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2018. V. 37. No. 2. P. 376–384. doi: 10.1002/etc.3956

53. Elendt B.-P., Bias W.-R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna* // *Water Research*. 1990. V. 24. No. 9. P. 1157–1167. doi: 10.1016/0043-1354(90)90180-E

54. Persoone G., Baudo R., Cotman M., Blaise C., Thompson K.Cl., Moreira-Santos M., Vollat B., Törökne A., Han T. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs // *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. 2009. No. 393. P. 1–29. doi: 10.1051/kmae/2009012