

Формулы Фармации. 2022. Т. 4, № 1. С. 61-69

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Обзорная статья

УДК 615-099; 593.171.4; 59.084

DOI: <https://doi.org/10.17816/phf108995>

Методы биотестирования для обнаружения лекарственных средств в водной среде

© 2022. А. А. Кряжевских^{1,2}, В. И. Бардина³,
Н. А. Склера¹

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук», Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности (НИЦЭБ) Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку:

Анастасия Альбертовна Кряжевских, anastasiya.parfionova@spcru.ru

АННОТАЦИЯ. В статье приведены экспериментальные данные по использованию метода биотестирования для токсикологической оценки водопроводной воды с содержанием раствора антибиотика амоксициллина и раствора гормона 17 β -эстрадиола. Различные тест-организмы отличаются по своей чувствительности к токсикантам. Поэтому для повышения точности оценки токсичности растворов была применена серия биотестов с использованием разных тест-организмов из различных систематических групп: дафний (*Daphnia magna* Straus), инфузорий (*Paramecium caudatum*), водорослей (*Chlorella vulgaris* Beijer). Установлено, что из выбранных тест-культур наиболее чувствительной к раствору с антибиотиком и гормоном оказались инфузории. Влияние амоксициллина в диапазоне доз от 0,000078 мг/л до 0,00000078 мг/л способствовало развитию токсического эффекта у тест-культур в следующей последовательности в порядке убывания: инфузории>дафнии>хлорелла. При изучении токсичности воды с содержанием гормона 17 β -эстрадиола в диапазоне доз от 0,00001 мг/л до 0,00000001 мг/л чувствительность тест-объектов сложилась в следующей хронологии: инфузории>хлорелла. Дафнии (*Daphnia magna* Straus) были вовсе не восприимчивы к данному классу лекарственных средств. В связи с чем предложенные методы биотестирования для обнаружения лекарственных средств в водной среде являются перспективным направлением в оценке токсичности фармполлютантов в сточных водах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биотестирование; тест-культура; *Paramecium caudatum*; *Daphnia magna* Straus; *Chlorella vulgaris* Beijer; эстрадиол бензоат; амоксициллин; водная среда; лекарственное загрязнение; токсичность

СОКРАЩЕНИЯ:

ПДК — предельно допустимая концентрация.

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтические препараты как новые загрязняющие вещества привлекли пристальное внимание ученых во всем мире за последние два десятилетия. Они широко используются как в медицине, так и в ветеринарии и были выявлены в исследованиях различных водных сред, таких как сточные воды, поверхностные и подземные воды, а в последнее время также и в питьевой воде [1]. Такое активное использование лекарственных средств способствует их постоянному и несанкционированному попаданию в окружающую среду. Особенно много фармацевтических соединений обнаруживается в сточных водах, что в последнее время вызывает всеобщее беспокойство из-за их способности влиять на качество водоемов, экосистем и здоровье человека [2, 3]. Наибольшую опасность оказывают фармацевтические отходы, в составе которых есть антибиотики, препараты с гормональными, психотропными и наркотическими действиями и другие физиологически активные вещества [4–6].

В группу антибиотиков входят β -лактамы, макролиды, фторхинолоны, тетрациклины и сульфаниламиды, а также многие другие классы, в состав которых входит амоксициллин. Амоксициллин является одним из наиболее часто используемых лекарств, которое способно убивать или подавлять рост бактерий для борьбы с бактериальными инфекциями. В последнее время, в связи с глобальным ростом численности населения и повышением спроса на животный белок, потребление антибиотиков растет и достигло огромных объемов. Так, например, Китай, который является крупнейшим производителем, экспортером и потребителем антибиотиков во всем мире, потребляет огромное количество антибиотиков. В 2013 году общее потребление 36 отдельных антибиотиков в Китае составило 92 700 тонн, а количество антибиотиков, выделенных людьми и животными, по оценкам, составило 54 000 тонн, причем 53 800 тонн попало в окружающую среду [7]. В России на фоне пандемии COVID-19 использование антибиотиков человеком существенно выросло [8].

Как известно, антибиотики не могут быть полностью метаболлизированы человеком и животными, а также полностью удалены на очистных сооружениях [9, 10], в результате чего они попадают в окружающую среду, в частности в водную среду, как в неизменном состоянии, так и в качестве их метаболитов.

Антибиотики в сточных водах водоканалов находятся в относительно высоких концентрациях, от нескольких сотен нг/л до нескольких десятков мкг/л. Так, например, концентрации амоксицилина в притоках и стоках находятся в диапазоне 200–6,516 нг/л, что указывает на то, что он является серьезным загрязнителем окружающей среды. Среди водных видов, подверженных воздействию, выявленных к настоящему времени относятся: нецелевые бактерии (*Anabaena* и *Vibrio fischeri*), водоросли (*Isochrysis galbana* и *Pseudokirchneriella subcapitata*), ракообразные (*Daphnia magna*), рыбы (*Oryzias melastigma* и *Danio rerio*) [11]. Таким образом, токсичность антибиотиков варьируется в зависимости от тестовых организмов и типов антибиотиков. Однако виды с низким трофическим уровнем, например, цианобактерии и водоросли,

демонстрируют более высокую чувствительность к антибиотикам, чем организмы с более высоким трофическим уровнем, например, ракообразные и рыбы.

В группу стероидов входят искусственные эстрогены (17 α -этинилэстрадиол), натуральные эстрогены (эстрон, 17 β -эстрадиол, эстриол) и фитоэстрогены (изофлавоноиды, лигнаны) [12]. Гормональные препараты, а именно 17 β -эстрадиол используют для эстрогенной терапии в климактерическом периоде и при хирургической менопаузе, в том числе после овариэктомии, лучевой кастрации и т.п. Выделяются данные гормоны в виде конъюгатов или в свободной форме, в связи с чем конъюгированные стероидные эстрогены могут легко биотрансформироваться в свободные формы. Основной путь выведения конъюгатов – через глюкурониды или сульфаты с мочой. В конечном итоге они секретируются в окружающую среду [6].

В результате постоянное попадание загрязненных эстрогенами сточных вод в водоемы даже в низких концентрациях (от нг/л до мкг/л) [7] может привести к неблагоприятным последствиям для водной жизни. По результатам многочисленных исследований установлено, что наиболее часто в водных объектах встречаются эстрогены, часть которых может производиться непосредственно гидробиотой. Так, например, в исследованиях Sanderson показано, что концентрация в воде эстрогенов в диапазоне 1–10 нг/л приводит до 100% феминизации и гермафродитизму у рыб мужского пола, что существенно снижает популяцию [13].

Данные фармполлютанты по трофическим цепям, а также при употреблении загрязненной воды могут, попадая в организм человека, оказывать негативное воздействие на его здоровье [10]. Однако механизмы влияния на человека подобных соединений, поступающих из окружающей среды, малоизучены.

Учитывая обнаружение лекарственных средств и их метаболитов в различных водных системах и известные нежелательные последствия для здоровья и экологии, в 2021 году Роспотребнадзор сообщил, что в России вводятся обязательные нормативы по содержанию в питьевой воде гормонов и ряда антибиотиков. Для антибиотика амоксициллин предельно допустимая концентрация (ПДК) в воде составила 0,000078 мг/л, а для гормональных препаратов (17-альфа-этинилэстрадиол) – 0,000000035 мг/л [14].

Для их удаления из водной среды было предложено множество методов, таких как электрохимическое окисление, адсорбция, фотокатализ, мембранная filtration и химическое окисление с расширенными возможностями и многие другие методы. Тем не менее, эти методы имеют ряд недостатков, таких как высокая стоимость, сложность эксплуатации и воздействие на окружающую среду [15].

Однако установить методики для индивидуальных органических соединений, поступающих на сооружения биологической очистки городских станций аэрации, достаточно затруднено, и в таких ситуациях необходимо проведение дополнительных экспериментальных исследований с целью установления их токсичности и предупреждения торможения процессов биологической очистки.

Одним из принятых экспериментальных методов контроля токсичности является метод биотестирования. Данный метод основан на оценке степени опасности исследуемого объекта по реакции живых организмов: гибель тест-объектов (выживаемость), снижение или стимуляция интенсивности размножения, уменьшение подвижности, подавление биохимических процессов, изменение характера поведения, изменение пигментации. Информация, полученная при использовании методов биотестирования, отражает комплексное токсическое воздействие всех содержащихся в изучаемой среде токсикантов [16, 17]. Известно, что организмы обладают разной чувствительностью к токсикантам [18]. В связи с этим достоверность результатов биотестирования изучаемого объекта зависит от примененных тест-организмов и тест-функций [19, 20].

Изучалась возможность использования метода биотестирования с применением в качестве тест-организмов черенков и проростков высших растений для косвенной оценки устойчивости антибиотиков окситетрациклина, тилозина и цефтриаксона в водной среде [21]. Для экотоксикологической оценки содержания в воде тетрациклина и цефалексина использовались в качестве тест-организмов рачки дафнии и растения *Lehidium sativum* [22].

Таким образом, весьма актуальным является разработка новых методов оценки содержания антибиотиков и гормонов в водопроводной воде.

Целью нашего исследования было проведение оценки токсичности водопроводной воды (г. Санкт-Петербург) при наличии в ней антибиотика и гормона методами биотестирования для создания наиболее чувствительного набора биотестов, с помощью которых можно адекватно и в короткие сроки оценить качество питьевой воды (модельные растворы с концентрацией антибиотика и гормона близкой к ПДК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался амоксициллин-антибиотик группы полусинтетических пенициллинов широкого спектра действия, который представляет собой 4-гидроксильный аналог ампициллина, а также 17 β -эстрадиол, который является строгенным стероидным гормоном. С этими препаратами были приготовлены водные растворы на основе водопроводной воды.

В качестве тест-культур были использованы следующие гидробионты: дафнии, инфузории и зеленые протококковые водоросли хлорелла.

Рачки дафнии считаются одними из наиболее чувствительных тест-организмов к токсическому воздействию загрязняющих веществ. Они имеют относительно короткий жизненный цикл, процедура биотестирования с их использованием не требует специального дорогостоящего оборудования и может производиться в обычном лабораторном помещении. Критерием острой токсичности на дафниях являлась гибель более 50% особей в тестируемых пробах за 48 часов по сравнению с контролем (А, %) [23].

Установлено, что по своей чувствительности к воздействию токсичных веществ инфузории близки к чувствительности тканей человека и животных, поэтому их широко используют при биотестировании.

Метод определения токсичности водной среды основан на способности инфузорий реагировать на присутствие в водной среде веществ, представляющих опасность для их жизнедеятельности, и направленно перемещаться по градиенту концентраций (в направлении изменения концентраций) этих веществ (хемотаксическая реакция), избегая их вредного воздействия [24]. Критерием токсичности на инфузориях служит индекс токсичности (Т) – безразмерная величина, принимающая значения от 0 до 1 в соответствии со степенью токсичности анализируемой пробы. По величине индекса анализируемые пробы классифицируются по степени их токсичности на 3 группы: допустимая степень токсичности ($0,00 < T \leq 0,40$); умеренная степень токсичности ($0,40 < T \leq 0,70$); высокая степень токсичности ($T > 0,70$).

Из водорослей в качестве тест-культуры, наиболее часто применяется зеленая одноклеточная водоросль Хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer), которая распространена практически повсеместно, что делает ее доступным биологическим объектом [25]. Водоросли широко используются в качестве тест-организмов [26]. Определение острой токсичности проб по изменению оптической плотности тест-культуры зеленой протококковой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) основано на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль), и в тестируемых водных вытяжках (опыт), в которых эти вещества могут присутствовать [27]. Измерение оптической плотности суспензии водоросли позволяет оперативно контролировать изменение численности клеток в контрольном и опытных вариантах токсикологического эксперимента, проводимого в специализированном многоюветном культиваторе KBM-05. Критерием токсичности воды является снижение на 20% и более (подавление роста) или увеличение на 30% и более (стимуляция роста) величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов световой экспозиции на тестируемой воде по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде. Пробы были проанализированы в ряде разбавлений, кратных десяти.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA, а полученные данные выражали в виде средних значений со стандартной ошибкой. В ходе проведения анализа использовали непараметрические методы статистики. Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексное изучение лекарственных средств (амоксициллина и 17 β -эстрадиола) позволило установить чувствительность разных методов биотестирования. В таблице 1 представлены результаты исследования выживаемости дафний в средах с различными концентрациями антибиотика и гормона.

Из данных таблицы видно, что амоксициллин вызвал гибель 93% дафний ($p < 0,05$) в растворе с концентрацией 0,000078 мг/л, что соответствовало ПДК. В растворах с концентрациями ниже установленной ПДК,

Результаты биотестирования на тест-объекте *Daphnia magna* Straus раствора амоксицилина в диапазоне доз от 0,000078 мг/л до 0,00000078 мг/л и 17 β -эстрадиола в диапазоне доз от 0,00001 мг/л до 0,00000001 мг/л

Табл. 1.

Table 1.

The results of biotesting on the *Daphnia magna* Straus test object of amoxicillin solution in the dose range from 0.000078 mg/l to 0.00000078 mg/l and 17 β -estradiol in the dose range from 0.00001 mg/l to 0.00000001 mg/l

Концентрация, мг/л	Кратность разбавления	Гибель тест-объекта, %	Токсичность
Контроль			
–	–	0,0	отсутствует
Амоксициллин			
0,000078	1 (без разбавления)	93,0*	высокая
0,0000078	1:10	0,3	отсутствует
0,00000078	1:100	0,3	отсутствует
0,000000078	1:1000	0,3	отсутствует
17 β -эстрадиол			
0,00001	1 (без разбавления)	0,0	отсутствует
0,000001	1:10	0,0	отсутствует
0,0000001	1:100	0,0	отсутствует

Примечание: * – отличия от контрольных значений статистически значимы, при $p < 0,05$

Note: the differences from the control values are statistically significant, at $p < 0.05$

гибель дафний составила менее 1%. При исследовании 17 β -эстрадиола в изучаемых растворах, так же, как и в контроле, гибели дафний не наблюдали.

Таким образом, в результате изучения токсичности с использованием представителей пресноводного зоопланктона ветвистоусых рачков дафний было выявлено, что данный тест-объект является чувствительным только в отношении антибиотиков. Поскольку даже в ПДК была обнаружена высокая токсичность дафний. В то же время гормоны не оказывают влияния на выживаемость дафний. Однако их активность в подобных растворах увеличивается. В связи с этим тест-объект не должен быть единственным.

В качестве второго теста-объекта был выбран тест с использованием представителя простейших – ресничных инфузорий. Результаты исследований представлены на рисунке 1. Анализ полученных данных по определению общей токсичности показал, что амоксициллин в концентрации 0,000078 мг/л по степени токсичности относится к 3 группе (высокая), индекс которой составил 0,75. Плотность инфузорий в исследуемом растворе

статистически значимо снизилась на 75,4% по отношению к контролю. С разбавлением концентрации в 10 раз токсичность изучаемого раствора снижается до 2 группы (индекс токсичности 0,52), а плотность тест-объекта уменьшилась в 2 раза ($68,8 \pm 9,4$ при значениях в контроле $143,1 \pm 11,7$). При 100-м разбавлении (0,00000078 мг/л) отмечали допустимую степень токсичности (1 группа), индекс которой составил 0,14.

Воздействие 17 β -эстрадиола на хематоксическую реакцию инфузорий было более токсичнее, по сравнению с действием антибиотика. Так, действие гормона в диапазоне концентраций от 0,00001 мг/л до 0,00000001 мг/л характеризуется высокой токсичностью (3 группа) с индексом 0,71–0,78. Отмечали 3–4 кратное снижение плотности тест-объекта (в концентрации 0,00001 мг/л число инфузорий составило $34,3 \pm 1,3$ против контрольных значений $143,1 \pm 11,7$ ($p < 0,05$)).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о чувствительности инфузорий к антибиотикам и гормонам даже в низких концентрациях, сопоставимых с установленными ПДК.

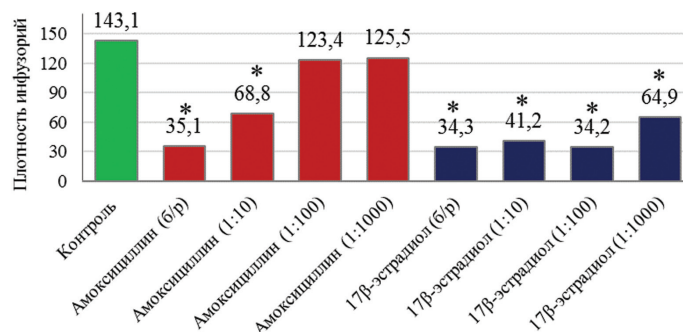


Рис. 1. Результаты изменения плотности инфузорий *Paramecium caudatum* в растворах амоксицилина в диапазоне доз от 0,000078 мг/л до 0,000000078 мг/л и 17 β -эстрадиола в диапазоне доз от 0,00001 мг/л до 0,00000001 мг/л. Примечание: *значимые отличия от фоновых значений, при $p < 0,05$

Fig. 1. The results of density changes of ciliates *Paramecium caudatum* in amoxicillin solutions in the dose range from 0.000078 mg/l to 0.000000078 mg/l and 17 β -estradiol in the dose range from 0.00001 mg/l to 0.00000001 mg/l. Note: *significant difference from the background values, at $p < 0.05$

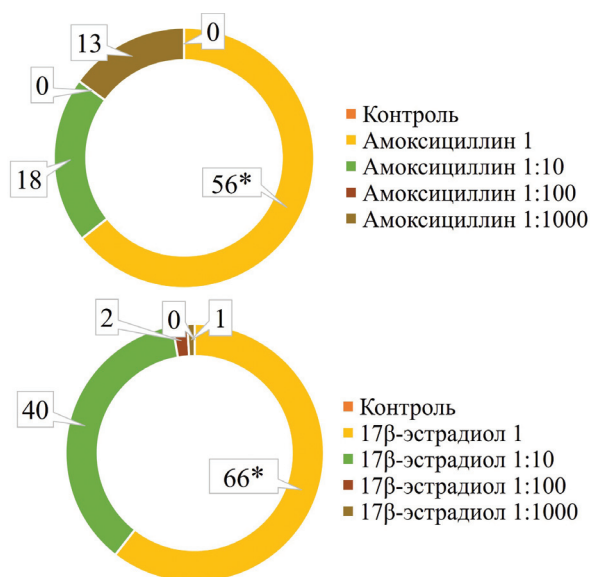


Рис. 2. Процентное изменение оптической плотности тест-объекта *Chlorella vulgaris* Beijer в растворах амоксициллина в диапазоне доз от 0,000078 мг/л до 0,000000078 мг/л (сверху) и 17β-эстрадиола в диапазоне доз от 0,00001 мг/л до 0,00000001 мг/л (снизу) по отношению к контролю. Примечание: *значимые отличия от фоновых значений, при $p < 0,05$

Fig. 2. Percentage change in the optical density of the test object *Chlorella vulgaris* Beijer in amoxicillin solutions in the dose range from 0.000078 mg/l to 0.000000078 mg/l (top) and 17β-estradiol in the dose range from 0.00001 mg/l to 0.00000001 mg/l (bottom) compared with control. Note: *significant difference from the background values, at $p < 0,05$

В следующей серии экспериментов проводили оценку токсического воздействия на водорослях хлорелла. Было выявлено, что рост хлореллы стимулировался низкими концентрациями амоксициллина (0,000078 мг/л) и 17β-эстрадиола (0,00001 мг/л) на 56% и 66% соответственно ($p < 0,05$), оказывая тем самым токсическое действие (рис. 2).

Этот эффект снижался при уменьшении концентрации исследуемых растворов. Однако 17β-эстрадиол в концентрации 0,000001 мг/л (разбавление 1:10) все еще оказывал токсическое действие. Рост хлореллы при этом увеличился на 40% по отношению к контрольным значениям. Данные результаты свидетельствуют о том, что гормоны обладают более высоким токсическим действием на зеленые водоросли, чем антибиотики. Однако амоксициллин является не менее токсичным фармполлютантом на эти таксоны, что подтверждается высоким процентом роста водорослей под их воздействием. Концентрации ниже ПДК амоксициллина (0,0000078 мг/л (кратность разбавления 1:10)) не оказывали токсического действия, что, вероятно, связано со свойствами антибиотика, таких как электрофильность, стабильность и гидрофобность.

ВЫВОДЫ

Выявлено, что используемые в биотестировании тест-организмы по своей чувствительности к раствору амоксициллина составляли следующий ряд в порядке убывания: инфузории > дафнии > хлорелла, а по чувствительности к раствору 17β-эстрадиола – инфузории > хлорелла (табл. 2).

Из представленной таблицы мы видим, что антибиотик в установленной Роспотребнадзором ПДК (0,000078 мг/л) оказывает высокую степень токсичности на все изучаемые тест-культуры. Концентрации ниже ПДК не оказывают токсического действия на такие тест-культуры, как дафнии и хлорелла. Однако инфузории со снижением концентрации амоксициллина имела дозозависимое снижение токсичности, которая в тысячекратном разбавлении снизилась до допустимой.

При изучении токсичности воды, с содержанием гормона 17β-эстрадиола, самой чувствительной тест-культурой также оказались инфузории (*Paramecium caudatum*). Токсическое действие на тест-объект хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) исчезало при концентрации раствора 17β-эстрадиол при стократном разбавлении исследуе-

Сводная таблица результатов элюатного биотестирования лекарственных средств

Табл. 2.

Table 2.

Summary table of the results of eluate biotesting of medicinal products

Лекарственное средство (разведение)	<i>Daphnia magna</i> Straus	<i>Paramecium caudatum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijer
	Степень токсичности	Группа токсичности	Оценка токсичности
Р-р амоксициллина 0,000078 мг/л (б/р)	Острое токсическое действие	III, высокая степень токсичности	Токсическое действие на тест-объект
Р-р амоксициллина 0,0000078 мг/л (1:10)	Отсутствует	II, умеренная степень токсичности	Отсутствует
Р-р амоксициллина 0,00000078 мг/л (1:100)	Отсутствует	I, допустимая степень токсичности	Отсутствует
Р-р амоксициллина 0,000000078 мг/л (1:1000)	Отсутствует	I, допустимая степень токсичности	Отсутствует
Р-р 17β-эстрадиол 0,00001 мг/л (б/р)	Отсутствует	III, высокая степень токсичности	Токсическое действие на тест-объект
Р-р 17β-эстрадиол 0,000001 мг/л (1:10)	Отсутствует	III, высокая степень токсичности	Токсическое действие на тест-объект
Р-р 17β-эстрадиол 0,0000001 мг/л (1:100)	Отсутствует	III, высокая степень токсичности	Отсутствует
Р-р 17β-эстрадиол 0,00000001 мг/л (1:1000)	–	II, умеренная степень токсичности	Отсутствует

мого раствора (0,0000001 мг/л). Дафнии (*Daphnia magna* Straus) вовсе оказались не чувствительны к данному классу лекарственных средств.

Таким образом, наиболее чувствительной тест-культурой к антибиотикам (раствор амоксициллина) и гор-

монам (17 β -эстрадиол) являются инфузории (*Paramecium caudatum*). В связи с чем, предложенные методы биотестирования для обнаружения лекарственных средств в водной среде являются перспективным направлением в оценке токсичности фармполлютантов в сточных водах.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Баренбойм Г. М. Загрязнение природных вод лекарствами / Г. М. Баренбойм, М. А. Чиганова. – Москва: Наука, 2015. – 283 с.
2. Patel M., Kumar R., Kishor K., et al. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods // *Chemical Reviews*. 2019. Vol. 119, no.6. P. 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>.
3. Gutierrez-Macias T., Mijaylova Nacheva P., Esquivel-Sotelo A., et al. Batch Kinetic Studies of Pharmaceutical Compounds Removal Using Activated Sludge Obtained from a Membrane Bioreactor // *Water Air Soil Pollut.* 2022. Vol. 233, no. 36. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05508-w>.
4. Чиганова М. А. Нормативно-правовое регулирование лекарственного загрязнения окружающей среды / М. А. Чиганова // *Контроль качества продукции*. – 2017. – № 1. – С. 56–63.
5. Эльхам Э. А. Влияние фармацевтических отходов на окружающую среду и проблемы обращения с ними / Э. А. Эльхам, Т. А. Романова // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2021. – Т. 108. – № 6. Часть 2. – С. 15–17. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.108.6.034>.
6. Ting Y. F., Praveena S. M. Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review // *Environ Monit Assess.* 2017. Vol. 189, no. 4. P. 178. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5890-x>.
7. Zhang Q. Q., Ying G. G., Pan C. G., et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance // *Environ Sci Technol.* 2015. Vol. 49. P. 6772–6782.
8. Карноух К. И. Анализ потребления антибактериальных средств на фоне пандемии COVID-19: уровень стационара / К. И. Карноух, Н. Б. Лазарева // *Медицинский совет*. – 2021. – № 16. – С. 118–128. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-16-118-128>.
9. Wang L., Chen Y., Zhao Y., et al. Toxicity of two tetracycline antibiotics on *Stentor coerules* and *Stylonychia lemnae*: potential use as toxicity indicator // *Chemosphere*. 2020. Vol. 255. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127011>.
10. Qiulian Y., Yuan G., Jian K., et al. Antibiotics: an overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods // *Bioengineered*. 2021. Vol.12, no. 1. P. 7376–7416. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974657>.
11. Scaria J., Anupama K. V., Nidheesh P. V. Tetracyclines in the environment: an overview on the occurrence, fate, toxicity, detection, removal methods, and sludge management // *Sci Total Environ.* 2021. Vol. 771. P. 145291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145291>.
12. Касимов А. О. Система мониторинга для определения лекарственных препаратов в сточных водах / А. О. Касимов, А. Ж. Есиркепова, М. А. Хизирова [и др.] // *Инновационные, информационные и коммуникационные технологии*. – 2017. – № 1. – С. 688–693.
13. Sanderson H., Laird B., Pope L., et al. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms // *Aquat. Toxicol.* 2007. Vol. 85. P. 229–240.
14. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. №2 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21 „Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания“».
15. Bilal M., Barcelo D., Iqbal H. M. Occurrence, environmental fate, ecological issues, and redefining of endocrine disruptive estrogens in water resources // *Sci Total Environ.* 2021. Vol. 800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149635>.
16. Машченко З. Е. Исследование токсичности ампициллина для рачков *Daphnia magna* и сообщество активного ила / З. Е. Машченко, Е. В. Маслова, П. Г. Мизина [и др.] // *Токсикологический вестник*. – 2018. – № 1 (148). – С. 30–34. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2018-1-30-34>.
17. Зарицкая Е. В. Современные альтернативные токсикологические методы исследования и перспективы их использования в практической деятельности / Е. В. Зарицкая, Е. В. Полозова, А. С. Богачева // *Гигиена и санитария*. – 2017. – Т. 96. – № 7. – С. 671–674. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-7-671-674>.
18. Terekhova V. A., Kirit W., Fedoseeva E. V., et al. Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions // *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, EDP Sciences (France)*. 2018. No. 419 (32). P. 14. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018015>.
19. Bardina T. V., Chugunova M. V., Kulibaba V. V., et al. Applying Bioassay Methods for Ecological Assessment of the Soils from the Brownfield Sites // *Water, Air, & Soil Pollution*. 2017. P. 228–351. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3521-3>.

20. Pukalchik M. A., Terekhova V. A., Karpukhin M. M., et al. Comparison of Eluate and Direct Soil Bioassay Methods of Soil Assessment in the Case of Contamination with Heavy Metals // *Eurasian soil science*. 2019. Vol. 52, no. 4. P. 464–470. <https://doi.org/10.1134/S1064229319040112>.

21. Чеснокова С. М. Оценка устойчивости антибиотиков различных групп в водной среде методом биотестирования / С. М. Чеснокова, О. В. Савельев // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2020. – Т. 99. – № 9. Часть 1. – С. 101–109. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2020.99.9.018>.

22. Guler U. A., Solmaz B. Biosorption of Tetracycline and Cephalaxin onto Surfactant-Modified Waste Biomass Using Response Surface Methodology and Ecotoxicological Assessment: Phytotoxicity and Biototoxicity Studies // *Water Air Soil Pollut.* 2022. Vol. 233, no. 4. P. 117. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05590-0>.

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

24. ПНД ФТ 14.:2:3:4.2-98 ФР 1.39.2015.19242. Определение токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер». – Санкт-Петербург, 2015. – 21 с.

25. Зарицкая Е. В. Альтернативные методы исследования при токсиколого-гигиенической оценке объектов производственной и окружающей среды / Е. В. Зарицкая, В. В. Шилов, Е. В. Полозова // *Медицина труда и промышленная экология*. – 2016. – № 6. – С. 17–19.

26. Wang W., Freemark K. The use of plants for environmental monitoring and assessment // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1995. No. 30. <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1033>.

27. ПНД ФТ 14.1:2:3:4.10-04 Т. 16,1:2:3:3.7-04 ФР.1.39.2015.20001. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. – Москва, 2014. – 38 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Анастасия Альбертовна Кряжевских – лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации; магистрант Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, anastasiya.parfionova@spcru.ru

Виктория Ивановна Бардина – научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского центра экологической безопасности РАН – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки (НИЦЭБ РАН – СПб ФИЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия, vicula128@mail.ru

Наталья Анатольевна Складорова – канд. техн. наук, доцент кафедры промышленной экологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, natalia.sklyarova@pharminnotech.com

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 03.04.2022 г., одобрена после рецензирования 17.04.2022 г., принята к публикации 30.04.2022 г.

Biotesting methods for the detection of drugs in the aquatic environment

© 2022. Anastasiya A. Kryazhevskikh^{1,2}, Victoria I. Bardina³, Nataliya A. Sklyarova¹

¹Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

²State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

³Federal State Budgetary Scientific Institution "St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences", Scientific Research Centre for Ecological Safety Russian Academy of Sciences, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author: Anastasiya A. Kryazhevskikh, anastasiya.parfionova@spcpcu.ru

ABSTRACT. The article presents experimental data on the use of the biotesting method for the toxicological evaluation of tap water containing the antibiotic amoxicillin solution and the hormone 17 β -estradiol solution. Test organisms differ in their sensitivity to toxicants. Therefore, a series of biotests were performed using different test organisms from various systematic groups: daphnia (*Daphnia magna* Straus), infusoria (*Paramecium caudatum*) and algae (*Chlorella vulgaris* Beijer) were used to increase the accuracy of toxicity assessment of solutions. It was found that of the selected test cultures infusoria were the most sensitive to the solution with antibiotic and hormone. The effect of amoxicillin in the dose range from 0.000078 mg/L to 0.00000078 mg/L contributed to the toxic effect of the test cultures in the following sequence in descending order: infusoria>daphnia=chlorella. In a toxicity study of water containing the hormone 17 β -estradiol in the dose range from 0.00001mg/L to 0.00000001 mg/L, the sensitivity of the test objects developed in the following chronology: infusoria>chlorella. *Daphnia* (*Daphnia magna* Straus) were not at all susceptible to this class of drugs. Therefore, the proposed biotesting methods for the detection of drugs in the aquatic environment are a promising direction in assessing the toxicity of pharmpollutants in wastewater.

KEYWORDS: biotesting; test culture; *Paramecium caudatum*; *Daphnia magna* Straus; *Chlorella vulgaris* Beijer; estradiol benzoate; amoxicillin; aquatic environment; drug contamination; toxicity

REFERENCES

1. Barenboym G. M., Chiganova M. A., eds. *Zagryaznenie prirodnikh vod lekarstvami*. Moscow: Nauka, 2015. 283 p. (In Russ.).
2. Patel M., Kumar R., Kishor K., et al. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews*. 2019;119(6):3510-3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>.
3. Gutierrez-Macias T., Mijaylova Nacheva P., Esquivel-Sotelo A., et al. Batch Kinetic Studies of Pharmaceutical Compounds Removal Using Activated Sludge Obtained from a Membrane Bioreactor. *Water Air Soil Pollut*. 2022;233(36). <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05508-w>.
4. Chiganova M. A. Normativno-pravovoe regulirovanie lekarstvennogo zagryazneniya okruzhayushchey sredy. *Kontrol' kachestva produktsii = Production Quality Control*. 2017;(1):56-63. (In Russ.).
5. Elham E. A., Romanova T. A. Impact of pharmaceutical waste on the environment and problems of its management. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Research Journal*. 2021;108(6,Pt.2):15-17. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2021.108.6.034>. (In Russ.).
6. Ting Y. F., Praveena S. M. Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review. *Environ Monit Assess*. 2017;189(4):178. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5890-x>.
7. Zhang Q. Q., Ying G. G., Pan C. G., et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environ Sci Technol*. 2015;49:6772-6782.
8. Karnoukh K. I., Lazareva N. B. Analysis of the antibiotic consumption on the backdrop of the COVID-19 pandemic: hospital level. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2021;16:118-128. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-16-118-128>. (In Russ.).
9. Wang L., Chen Y., Zhao Y., et al. Toxicity of two tetracycline antibiotics on *Stentor coeruleus* and *Stylonychia lemnae*: potential use as toxicity indicator. *Chemosphere*. 2020;255. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127011>.

10. Qiulian Y., Yuan G., Jian K., et al. Antibiotics: an overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. *Bioengineered*. 2021;12(1): 7376-7416. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974657>.
11. Scaria J., Anupama K. V., Nidheesh P. V. Tetracyclines in the environment: an overview on the occurrence, fate, toxicity, detection, removal methods, and sludge management. *Sci Total Environ*. 2021;771:145291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145291>.
12. Kasimov A. O., Esirkepova A. Zh., Khizirova M. A., et al. Sistema monitoringa dlya opredeleniya lekarstvennykh preparatov v stochnykh vodakh. *Innovatsionnye, informat-sionnye i kommunikatsionnye tekhnologii*. 2017;1:688-693. (In Russ.).
13. Sanderson H., Laird B., Pope L., et al. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. *Aquat. Toxicol*. 2007;85:229-240.
14. Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF ot 28 yanvarya 2021 g. N 2 «Ob utverzhdenii sanitarnykh pravil i norm SanPiN 1.2.3685-21 «Gigienicheskie normativy i trebovaniya k obespecheniyu bezopasnosti i (ili) bezvrednosti dlya cheloveka faktorov sredy obitaniya». (In Russ.).
15. Bilal M., Barcelo D., Iqbal H. M. Occurrence, environmental fate, ecological issues, and redefining of endocrine disruptive estrogens in water resources. *Sci Total Environ*. 2021;800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149635>.
16. Mashchenko Z. E., Maslova E. V., Mizina P. G., et al. Study of ampicillin toxicity to *Daphnia magna* crustaceans and activated silt community. *Toksikologicheskii vestnik = Toxicological Review*. 2018;1(148):30-34. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2018-1-30-34>. (In Russ.).
17. Zaritskaya E. V., Polozova E. V., Bogacheva A. S. Modern alternative toxicological research methods and prospects of their use in practical activities. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*. 2017;96(7):671-674. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-7-671-674>. (In Russ.).
18. Terekhova V. A., Kirit W., Fedoseeva E. V., et al. Bioassay standardization issues in freshwater ecosystem assessment: test cultures and test conditions. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, EDP Sciences (France)*. 2018;419(32):14. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018015>.
19. Bardina T. V., Chugunova M. V., Kulibaba V. V., et al. Applying Bioassay Methods for Ecological Assessment of the Soils from the Brownfield Sites. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2017;228-351. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3521-3>.
20. Pukalchik M. A., Terekhova V. A., Karpukhin M. M., et al. Comparison of Eluate and Direct Soil Bioassay Methods of Soil Assessment in the Case of Contamination with Heavy Metals. *Eurasian soil science*. 2019;52(4):464-470. <https://doi.org/10.1134/S1064229319040112>.
21. Chesnokova S. M., Savelev O. V. Assessing the antibiotic resistance of various groups in water environment through biotesting. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Research Journal*. 2020;99(9,Pt.1):101-109. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2020.99.9.018>. (In Russ.).
22. Guler U. A., Solmaz B. Biosorption of Tetracycline and Cephalexin onto Surfactant-Modified Waste Biomass Using Response Surface Methodology and Ecotoxicological Assessment: Phytotoxicity and Biototoxicity Studies. *Water Air Soil Pollut*. 2022;233(4):117. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05590-0>.
23. PND FT 14.1:2:3:4.12-06 T 16.1:2:2:3:9-06. Metodika izmereniy kolichestva *Daphnia magna* Straus dlya opredeleniya toksichnosti pit'evykh, presnykh, prirodnykh i stochnykh vod, vodnykh vytyazhek iz gruntov, pochv, osadkov stochnykh vod, otkhodov proizvodstva i potrebleniya metodom pryamogo scheta. Moscow; 2014. 39 p. (In Russ.).
24. 2016;(6):17-19. (In Russ.) PND FT 14.1:2:3:4.2-98 FR 1.39.2015.19242. Opredelenie toksichnosti prob prirodnykh, pit'evykh, khozyaystvenno-pit'evykh, khozyaystvenno-bytovykh stochnykh, ochishchennykh stochnykh, stochnykh, talykh, tekhnologicheskikh vod ekspress-metodom s primeneniem pribora serii «Biotester». Saint Petersburg; 2015. 21 p. (In Russ.).
25. Zaritskaya E. V., Shilov V. V., Polozova E. V. Alternative investigation methods in toxicologic hygienic evaluation of industrial and environmental objects. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology*. 2016;6:17-19. (In Russ.).
26. Wang W., Freemark K. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1995;30. <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1033>.
27. PND FT 14.1:2:3:4.10-04 T.16.1:2:2:3:7-04 FR.1.39.2015.20001. Metodika izmereniy opticheskoy plotnosti kul'tury vodorosli khlorella (*Chlorella vulgaris* Beijer) dlya opredeleniya toksichnosti pit'evykh, presnykh prirodnykh i stochnykh vod, vodnykh vytyazhek iz gruntov, pochv, osadkov stochnykh vod, otkhodov proizvodstva i potrebleniya. Moscow; 2014. 38 p. (In Russ.).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasiya A. Kryazhevskikh – Research Assistant at the Research Department, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia; Master Student, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia, anastasiya.parfionova@spcpu.ru

Victoria I. Bardina – Researcher, Scientific Research Centre for Ecological Safety, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia, vicula128@mail.ru

Nataliya A. Sklyarova – Ph.D. in Engineering Sciences, Associate Professor at the Industrial Ecology Department, Saint Petersburg, Russia, natalia.sklyarova@pharminnotech.com

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted April 03, 2022; approved after reviewing April 17, 2022;
accepted for publication April 30, 2022.