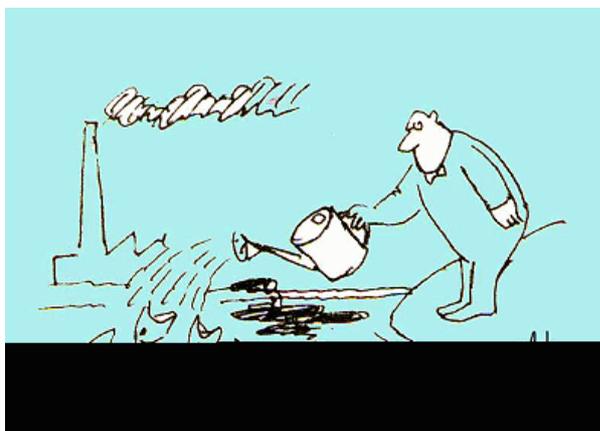


А.Г. Бубнов, С.А. Буймова, А.А. Гуцин, Т.В. Извекова

**БИОТЕСТОВЫЙ АНАЛИЗ – ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТОД
ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Учебно-методическое пособие



ИВАНОВО

2007

Федеральное агентство по образованию

Государственное образовательное учреждение

высшего профессионального образования

Ивановский государственный химико-технологический университет

А.Г. Бубнов, С.А. Буймова, А.А. Гушин, Т.В. Извекова

**БИОТЕСТОВЫЙ АНАЛИЗ – ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТОД
ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Учебно-методическое пособие

Иваново 2007

УДК [502.51(282.02):556.3.01]:574.24

Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды: учебно-методическое пособие / А.Г. Бубнов [и др.]; под общ. ред. В.И. Гриневича; ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т. - Иваново, 2007. - 112 с. ISBN 5-9616-0237-0

Представлены методики биотестирования с использованием различных тест-организмов, включающие процедуры отбора, хранения и подготовки проб воды для анализа, выращивания и проверки чувствительности культуры тест-объектов, построения калибровочных графиков, а также обработки и оценки полученных результатов.

Учебно-методическое пособие предназначено для выполнения научно-исследовательских и исследовательских работ студентов, а также представляет собой основу практикума дисциплин «Экология», «Экологический мониторинг», «Техника защиты окружающей среды» и «Сертификация продукции и услуг по экологическим требованиям», преподаваемых студентам специальностей 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» и 200503 «Стандартизация и сертификация», а также для исследователей и специалистов практиков из специализированных эколого-аналитических лабораторий.

Табл. 8. Ил. 12. Библиограф.: 35 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета ГОУ ВПО Ивановского государственного химико-технологического университета

Рецензенты: доктор химических наук А.М. Колкер (Институт химии растворов РАН); Ивановский филиал ФГУ "Центр лабораторного анализа и технических измерений по ЦФО".

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ИСТОРИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	7
2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	8
3. БИОИНДИКАЦИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	9
3.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОИНДИКАТОРОВ	11
3.2. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ.....	15
3.3. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ.....	17
3.4. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ	20
4. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОИНДИКАТОРОВ	21
4.1. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОЗДУХА	21
4.2. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ	23
4.3. ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ПОЧВ.....	25
5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ И КОЭФФИЦИЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ИНДИКАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	28
6. БИОТЕСТИРОВАНИЕ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ	35
6.1. ЗАДАЧИ И ПРИЁМЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА СРЕДЫ.....	39
6.2. ТРЕБОВАНИЯ К МЕТОДАМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	41
6.3. МЕСТО БИОТЕСТИРОВАНИЯ И БИОИНДИКАЦИИ В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА	42
6.4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	44
6.5. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ МЕТОДА БИОТЕСТИРОВАНИЯ	49
6.6. ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	50
6.6.1. РАКООБРАЗНЫЕ <i>DAPHNIA MAGNA</i>	51
6.6.2. ПРЕСНОВОДНЫЕ РЫБЫ <i>ROESILLIA RETICULATA</i> PETERS	59
6.6.3. ПРОСТЕЙШИЕ <i>PARAMESCIUM CAUDATUM</i>	62

7. МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	68
7.1. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ, ПОДГОТОВКА ПРОБ ВОДЫ.....	68
7.2. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ DAPHNIA MAGNA.....	68
7.3. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ ПРЕСНОВОДНЫХ АКВАРИУМНЫХ РЫБ ROESILLIA RETICULATA PETERS (ГУППИ).....	75
7.4. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ PARAMESCIUM CAUDATUM	81
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.	
Устройство и принцип работы прибора «Биотестер».....	99
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.	
Алгоритм установления характеристик погрешности методик биотестирования.....	104
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.	
Установление средней эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки), бурового раствора.....	110

ВВЕДЕНИЕ

Многообразные загрязняющие вещества (ЗВ), попадая в окружающую среду (ОС), могут претерпевать в ней различные изменения, усиливая при этом свое токсическое действие [1]. Это приводит к необходимости разработки комплексных, интегральных методов контроля качества ряда объектов окружающей природной среды (ОПС), в том числе воды, почвы и воздуха, позволяющих оценить их качество и возможную опасность различных источников загрязнения.

Традиционная эколого-гигиеническая оценка химического загрязнения водных объектов (поверхностных и подземных водоисточников, питьевой воды, сточных вод и др.), основанная на санитарно-химических анализах, нашедшая широкое применение в практике надзорных служб и при производственном контроле, полностью себя оправдывающая, тем не менее, не даёт полного представления о биологической опасности воды того или иного водного объекта [2]. Это связано с тем, что в силу технических и финансовых причин в воде контролируется и определяется только часть вероятных тех или иных загрязнителей. Многие химические вещества, присутствующие в водных объектах, особенно в местах размещения химических, металлургических, машиностроительных и др. предприятий, остаются не идентифицированными. В то же время поверхностные и подземные воды могут загрязняться вредными веществами вследствие миграции их из атмосферного воздуха, талых вод, почвы, производственных отходов, а также при сбросе сточных вод [3].

В связи с этим представляется необходимым иметь данные о возможном неблагоприятном токсическом действии как обнаруженных, так и неидентифицированных вредных веществ, присутствующих в водных объектах. С этой целью распространяется практика биотестирования воды на тест-объектах для характеристики и оценки её токсического эффекта [2]. Наиболее эффективными инструментами аналитического контроля при этом являются методы **биотестирования** и **биоиндикации** [4].

Чтобы в дальнейшем различать очень близкие по целям применения и смысловому использованию понятия, необходимо пояснить значения терминов «биоиндикация» и «биотестирование».

Биоиндикация (*bioindication*) — обнаружение и определение экологически значимых природных и антропогенных нагрузок на основе реакций на них живых организмов непосредственно в среде их обитания. Биологические индикаторы обладают признаками, свойственными системе или процессу, на основании которых производится качественная или количественная оценка тенденций изменений, определение или оценочная классификация состояния экологических систем, процессов и явлений. В настоящее время можно считать общепринятым, что основным индикатором устойчивого развития в конечном итоге является качество среды обитания.

Биотестирование (*bioassay*) — процедура установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Для оценки параметров среды используются стандартизованные реакции живых организмов (отдельных органов, тканей, клеток или молекул). В организме, пребывающем контрольное время в условиях загрязнения, происходят изменения физиологических, биохимических, генетических, морфологических или иммунных систем. Объект извлекается из среды обитания, и в лабораторных условиях проводится необходимый анализ. Живой организм может тестироваться также в специальных камерах или на стендах, где создаются условия изучаемого загрязнения (что очень важно для выявления реакций организма на то или иное доминирующее загрязнение или целый комплекс известных загрязняющих веществ на данной территории обитания).

Хотя подходы очень близки по конечной цели исследований, надо помнить, что биотестирование осуществляется на уровне молекулы, клетки или организма и характеризует возможные последствия загрязнения окружающей среды для биоты, а биоиндикация — на уровне организма, популяции и сообщества и характеризует, как правило, результат загрязнения. Живые объекты — открытые системы, через которые идет поток энергии и круговорот веществ. Все они в той или иной мере пригодны для целей биомониторинга.

1. ИСТОРИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Биотестирование как способ оценки качества воды вошел в практику в начале XX в., когда для токсикологической характеристики широко использовали «рыбную пробу». Первые биотесты на дафниях и циклопах были выполнены в 1918 г. В дальнейшем основным тест-объектом длительное время служила *Daphnia Magna*. С конца 1930-х годов в качестве тест-объектов стали использовать гидробионты разного систематического уровня и с разными трофическими связями. В 1940 – 1941 гг. в систему испытаний включили простейших, ракообразных, червей и рыб. За биологические показатели оценки качества воды были приняты выживаемость, репродуктивность (размножение), выживаемость нарождающейся молодежи, дыхательный и сердечный ритмы, потребление кислорода, выделение углекислого газа и аммиака как конечных продуктов обмена, дыхательный коэффициент, темп роста и питания, кормовой коэффициент, увеличение массы и др. [7].

В средние века был известен метод биотестирования, основанный на использовании канареек для индикации появления рудничного газа в горных выработках. Поведение птицы или её гибель оповещали шахтеров о грозящей им опасности.

Исследования в области разработки и использования метода биотестирования в водоохранной практике проводились во многих научно-исследовательских и учебных институтах [8]. В 1980 г. была признана необходимость применения биотестирования как показателя оперативной интегральной диагностики качества вод. В 1981 – 1986 гг. методики биотестирования были апробированы и рекомендованы для определения токсичности сточных и природных вод. По итогам апробации Всесоюзным научно-исследовательским институтом по охране вод (ВНИИВО) – головным институтом по разработке и использованию методов определения токсичности вод в 1990 г. было подготовлено и утверждено Государственным комитетом СССР по охране природы «Методическое руководство по биотестированию

воды» (РД 118-02-90) [9]. В этот документ вошли методики с использованием тест-объектов – представителей основных трофических звеньев водной экосистемы: водорослей, ракообразных и рыб. Позднее, для целей государственного экологического контроля Минприроды России, а затем Госкомэкологией России были подготовлены и утверждены методики для определения токсичности воды с использованием в качестве тест-объектов инфузорий и ракообразных (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.3-99; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.4-99) и для определения токсичности вод, почв и донных отложений – методика биотестирования по ферментативной активности бактерий (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1-96, 16.2:2:3:1.2-96). ПНД Ф Т – федеральный природоохранный нормативный документ, регламентирующий токсикологические методы контроля [4, 8].

В настоящее время биотесты введены в стандарты на качество воды во многих странах мира.

2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

При использовании методов биотестирования оперируют рядом понятий и определений: под **тест-объектом** понимают живой организм, используемый в биотестировании [4]. При выборе таких организмов приходится соблюдать определенные требования, среди которых возможность фиксировать четкий, воспроизводимый и объективный отклик на воздействие внешних факторов, чувствительность этого отклика на малые содержания поллютантов и др. [1].

Показатель жизнедеятельности водного организма – морфологическая, физиологическая, биохимическая или другая характеристика состояния водного организма.

Тест-реакция (функция) – изменение (ответ) какого-либо показателя тест-объекта под воздействием токсичных веществ, содержащихся в ОПС (воде, почве и воздухе).

Тест-параметр – количественное выражение тест-реакции.

Критерий токсичности – значение тест-параметра или правило, на ос-

новании которого делают вывод о токсичности исследуемой среды [4].

Измерительная система (прибор) – дает количественную величину ответной реакции тест-объекта на воздействие внешних факторов.

Концентрация средняя летальная (ЛК₅₀) – концентрация токсического вещества, вызывающая гибель 50 % тест-объекта при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений.

Концентрация средняя эффективная (ЭК₅₀) – концентрация токсического вещества, вызывающая изменение тест-реакции на 50 % при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений.

Воспроизводимость результатов биотестирования – характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, но в различных условиях (разными операторами или в разных лабораториях, или в разное время).

Сходимость результатов биотестирования – характеристика качества биотестирования, которая отражает близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, в одинаковых условиях (в одной лаборатории, одним и тем же оператором, в одно и то же время) [8].

3. БИОИНДИКАЦИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Биоиндикацию можно проводить на уровне молекул, клеток, органов (систем органов), организмов, популяций или даже биоценоза. Повышение уровня организации живой природы может приводить к усложнению, неоднозначности взаимосвязи биологического отклика с антропогенными факторами исследуемой среды, поскольку на них могут накладываться и природные факторы. Поэтому в качестве биотестов выбирают наиболее чувствительные к исследуемым загрязнителям организмы [1].

Биоиндикация качества наземных экосистем возможна по различным видам и сообществам растений и животных. Для гидробиологического анализа качества вод могут быть использованы практически все группы

организмов, населяющие водоёмы: планктонные и бентосные беспозвоночные с особой ролью простейших, водоросли, макрофиты, бактерии и грибы. Каждая из них, выступая в роли биологического индикатора, имеет свои преимущества и недостатки, которые и определяют границы ее использования при решении задач биоиндикации.

При решении задач биоиндикации и связанных с ними задач экологического прогнозирования необходимо уделять внимание трём основным аспектам:

- выделению системообразующих факторов и целям прогнозирования;
- разработке соответствующих методов и моделей;
- проблеме оценки достоверности получаемых результатов.

Актуальность этих исследований подтверждается тем, что число количественных методов биоиндикации на сегодняшний день еще очень мало.

Многие организмы способны аккумулировать (накапливать) химические загрязнители выше их естественного содержания в воде и почве без быстро проявляющихся нарушений. Такая способность тест-организмов оказалась полезной в качестве индикаторного признака загрязнения ОС и используется для **аккумулятивной биоиндикации** [5]. Этот приём биотестирования применяют при исследовании процессов миграции токсичных веществ в ОС. В качестве тест-организмов выбирают те, которые имеют высокий коэффициент биологического накопления (КН) токсикантов из ОС. Фитопланктон, например, имеет значение КН по тяжелым металлам (ТМ) от 10^2 до 10^4 , для полихлорированных бифенилов (ПХБ) величина КН достигает $1,7 \cdot 10^5$. Значение КН зависит от природных факторов (например, от температуры и др.). Например, бенз(а)пирен в гидробиоте Берингова моря накапливается с КН, равным $3 \cdot 10^3$, а в тёплых водах Средиземного моря КН возрастает в 5 раз. Значение КН используется для глобального и регионального мониторинга ОС [5].

Для оценки загрязнения природных вод кадмием можно использовать

результаты анализа его содержания в водорослях, ПХБ – в жирных тканях морских млекопитающих, никелем – в устрицах. Содержание ртути в почвах наиболее удобно проследить по накоплению в капусте, галогенидов – по содержанию в иглах сосны и в лишайниках. Лучшим индикатором загрязнения автострад свинцом и кадмием считается подорожник, растущий вдоль дорог.

Таким образом, методами биоиндикации и биотестирования определяется присутствие в ОС того или иного загрязнителя по наличию или состоянию определённых организмов, наиболее чувствительных к изменению экологической обстановки, т.е. обнаружение и определение биологически значимых антропогенных нагрузок на основе реакции на них живых организмов и их сообществ. Следовательно, применение биологических методов для оценки среды подразумевает выделение видов животных или растений, чутко реагирующих на тот или иной тип воздействия. Отметим, что методом биоиндикации с использованием подходящих индикаторных организмов в определенных условиях может осуществляться качественная и количественная оценка (без определения степени загрязнения) эффекта антропогенного и естественного влияния на ОС [21].

3.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОИНДИКАТОРОВ

Состояние биологической системы (организм, популяция или биоценоз) в той или иной степени характеризует воздействие на неё природных или антропогенных факторов и условий среды и может применяться для их оценки.

Биоиндикаторы (от био и лат. *indico* — указываю, определяю) — организмы, присутствие, количество или особенности развития которых служат показателями естественных процессов, условий или антропогенных изменений среды обитания. Их индикаторная значимость определяется экологической толерантностью биологической системы. В пределах зоны толерантности организм способен поддерживать свой гомеостаз. Любой фактор, если он выходит за пределы «зоны комфорта» для данного организма, явля-

ется стрессовым. В этом случае организм реагирует ответной реакцией различной интенсивности и длительности, проявление которой зависит от вида и является показателем его индикаторной ценности. Именно ответную реакцию определяют методы биоиндикации. Биологическая система реагирует на воздействие среды в целом, а не только на отдельные факторы, причём амплитуда колебаний физиологической толерантности модифицируется внутренним состоянием системы – условиями питания, возрастом, генетически контролируемой устойчивостью.

Многолетний опыт учёных разных стран по контролю состояния окружающей среды показал ряд преимуществ, которыми могут обладать живые индикаторы:

- в условиях хронических антропогенных нагрузок могут реагировать даже на относительно слабые воздействия вследствие кумулятивного эффекта; реакции проявляются при накоплении некоторых критических значений суммарных дозовых нагрузок;

- суммируют влияние всех без исключения биологически важных воздействий и отражают состояние окружающей среды в целом, включая её загрязнение и другие антропогенные изменения;

- исключают необходимость регистрации химических и физических параметров, характеризующих состояние окружающей среды;

- фиксируют скорость происходящих изменений;

- вскрывают тенденции развития природной среды;

- указывают пути и места скоплений в экологических системах различного рода загрязнений и ядов, возможные пути их попадания в пищу человека;

- позволяют судить о степени вредности любых синтезируемых человеком веществ для живой природы и для него самого, причём дают возможность контролировать их действие.

Выделяют две формы отклика живых организмов, используемых в целях биоиндикации, – *специфическую* и *неспецифическую*. В первом случае

происходящие изменения связаны с действием одного какого-либо фактора. При неспецифической биоиндикации различные антропогенные факторы вызывают одинаковые реакции.

В зависимости от типа ответной реакции биоиндикаторы подразделяют на *чувствительные* и *кумулятивные*. Чувствительные биоиндикаторы реагируют на стресс значительным отклонением от жизненных норм, а кумулятивные накапливают антропогенное воздействие, значительно превышающее нормальный уровень в природе, без видимых изменений.

В качестве биоиндикаторов могут быть использованы представители всех «царств» живой природы. Вместе с тем, для биоиндикации не пригодны организмы, повреждённые болезнями, вредителями и паразитами. Идеальный биологический индикатор должен удовлетворять ряду требований:

- быть типичным для данных условий;
- иметь высокую численность в исследуемом экотопе;
- обитать в данном месте в течение ряда лет, что даёт возможность проследить динамику загрязнения;
- находиться в условиях, удобных для отбора проб;
- давать возможность проводить прямые анализы без предварительного концентрирования проб;
- характеризоваться положительной корреляцией между концентрацией загрязняющих веществ в организме-индикаторе и объекте исследования;
- использоваться в естественных условиях его существования;
- иметь короткий период онтогенеза, чтобы была возможность отслеживания влияния фактора на последующие поколения.

Ответная реакция биоиндикатора на определенное физическое или химическое воздействие должна быть чётко выражена, т.е. специфична, легко регистрироваться визуально или с помощью приборов.

При выборе индикатора необходимо принимать во внимание соображения экономии и учитывать характер использования тех или иных орга-

низмов. Например, широко распространённые на исследуемой территории и не занесённые в «Красную книгу».

На уровне популяции биоиндикация проводится в том случае, если процесс распространения негативных изменений охватывает такое количество особей, при котором заметно сокращается численность популяции, изменяется её половозрастная структура, сокращается продолжительность жизни, происходит сдвиг фенологических фаз и др.

Экосистемный подход к оценке состояния окружающей среды даёт возможность ранней диагностики её изменений. Сигналом тревоги служит разбалансировка продукционно-деструкционных процессов. Диагностическими признаками таких сдвигов являются, например, накопление органического вещества, заиление, зарастание водоёмов, усиленное развитие микроорганизмов.

В качестве объектов для биоиндикации применяются разнообразные организмы — бактерии, водоросли, высшие растения, беспозвоночные животные, млекопитающие. Для гарантированного выявления присутствия в природных средах токсического агента неизвестного химического состава, как правило, используется набор объектов, представляющих различные группы сообщества. С введением каждого дополнительного объекта эффективность схемы испытаний повышается, однако нет смысла бесконечно расширять ассортимент обязательных объектов для использования в такой оценке.

Для биоиндикации необходимо выбирать наиболее чувствительные сообщества, характеризующиеся максимальными значениями скорости отклика и выраженностью параметров. Например, в водных экосистемах наиболее чувствительными являются планктонные сообщества, которые быстро реагируют на изменение среды благодаря короткому жизненному циклу и высокой скорости воспроизводства. Бентосные сообщества, где организмы имеют достаточно длинный жизненный цикл, более консервативны: перестройки происходят в них при длительном хроническом загрязнении, приводящем к необратимости процессов.

К методам биоиндикации, которые можно применять при исследовании экосистемы, относится выявление в изучаемой зоне редких и исчезающих видов (но не "краснокнижников"!). Список таких организмов, по сути, является набором индикаторных видов, наиболее чувствительных к антропогенному воздействию.

3.2. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ

С помощью растений можно проводить биоиндикацию всех природных сред. Индикаторные растения используются при оценке механического и кислотного состава почв, их плодородия, увлажнения и засоления, степени минерализации грунтовых вод и степени загрязнения атмосферного воздуха газообразными соединениями, а также при выявлении трофических свойств водоёмов и степени их загрязнения поллютантами. Например, на содержание в почве свинца указывают виды овсяницы (*Festuca ovina* и др.), полевицы (*Agrostis tenuis* и др.); цинка — виды фиалки (*Viola tricolor* и др.), ярутки (*Traspi alpestre* и др.); меди и кобальта — смолёвки (*Silene vulgaris* и др.), многие злаки и мхи.

Чувствительные фитоиндикаторы указывают на присутствие загрязняющего вещества в воздухе или почве ранними морфологическими реакциями — изменением окраски листьев (появление хлорозов; жёлтая, бурая или бронзовая окраска), различной формы некрозами, преждевременным увяданием и опаданием листьев. У многолетних растений загрязняющие вещества вызывают изменение размеров, формы, количества органов, направления роста побегов или изменение плодовитости. Подобные реакции обычно неспецифичны.

Некоторые естественные факторы могут вызывать симптомы, сходные с антропогенными нарушениями. Так, например, хлороз листьев может быть вызван недостатком железа в почве или ранним заморозком. Поэтому при определении морфологических изменений у растений необходимо учитывать

возможность действия других повреждающих факторов.

Индикаторы другого типа представляют собой растения-аккумуляторы. Они накапливают в своих тканях загрязняющее вещество или вредные продукты метаболизма, образуемые под действием загрязняющих веществ, без видимых изменений. При превышении порога токсичности ядовитого вещества для данного вида проявляются различные ответные реакции, выражающиеся в изменении скорости роста и длительности фенологических фаз, биометрических показателей и в конечном счёте снижении продуктивности.

Получить точные количественные данные о динамике и величине стрессовых воздействий на основе морфологических изменений невозможно, но можно довольно точно определить величину потерь продукции и, имея график зависимости «доза — эффект», рассчитать величину стрессового воздействия.

Б.В. Виноградов классифицировал индикаторные признаки растений как флористические, физиологические, морфологические и фитоценотические. Флористическими признаками являются различия состава растительности изучаемых участков, сформировавшиеся вследствие определенных экологических условий. Индикаторное значение имеет как присутствие, так и отсутствие вида. К физиологическим признакам относятся особенности обмена веществ растений, к анатомо-морфологическим признакам — особенности внутреннего и внешнего строения, различного рода аномалии развития и новообразования, к фитоценотическим признакам — особенности структуры растительного покрова: обилие и рассеянность видов растений, ярусность, мозаичность, степень сомкнутости.

Очень часто в целях биоиндикации используются различные аномалии роста и развития растения — отклонения от общих закономерностей. Их систематизируют в три основные группы, связанные: (1) с торможением или стимулированием нормального роста (карликовость и гигантизм); (2) деформациями стеблей, листьев, корней, плодов, цветков и соцветий; (3) возникновением новообразований (к этой группе аномалий роста относятся также

опухоли).

Гигантизм и карликовость многие исследователи считают уродствами. Например, избыток меди в почве вдвое уменьшает размеры калифорнийского мака, а избыток свинца приводит к карликовости смолёвки.

В целях биоиндикации представляют интерес следующие деформации растений:

- *фасциация* — лентовидное уплощение и сращение стеблей, корней и цветоносов;
- *махровость* цветков, в которых тычинки превращаются в лепестки;
- *пролификация* — прорастание цветков и соцветий;
- *асцидия* — воронковидные, чашевидные и трубчатые листья у растений с пластинчатыми листьями;
- *редукция* — обратное развитие органов растений, вырождение;
- *нитевидность* — нитчатая форма листовой пластинки;
- *филлодий* тычинок — превращение их в плоское листовидное образование.

Биомониторинг может осуществляться путём наблюдений за отдельными растениями-индикаторами, популяцией определенного вида и состоянием фитоценоза в целом. На уровне вида обычно производят специфическую индикацию какого-то одного загрязнителя, а на уровне популяции или фитоценоза — общего состояния природной среды.

3.3. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ

Позвоночные животные также служат хорошими индикаторами состояния среды благодаря следующим особенностям:

- являясь консументами, они находятся на разных трофических уровнях экосистем и аккумулируют через пищевые цепи загрязняющие вещества;
- обладают активным обменом веществ, что способствует быстрому

проявлению воздействия негативных факторов среды на организм;

- имеют хорошо дифференцированные ткани и органы, которые обладают разной способностью к накоплению токсических веществ и неоднозначностью физиологического отклика, что позволяет исследователю иметь широкий набор тестов на уровне тканей, органов и функций;

- сложные приспособления животных к условиям среды и чёткие поведенческие реакции наиболее чувствительны к антропогенным изменениям, что дает возможность непосредственно наблюдать и анализировать быстрые отклики на оказываемое воздействие;

- животных с коротким циклом развития и многочисленным потомством можно использовать для проведения ряда длительных наблюдений и проследивать воздействие фактора на последующие поколения; для долгоживущих животных можно выбрать наиболее чувствительные тесты в соответствии с особо уязвимыми этапами онтогенеза.

Преимущество использования позвоночных животных в качестве биоиндикаторов заключается в их физиологической близости к человеку. Основные недостатки связаны со сложностью их обнаружения в природе, поимки, определения вида, а также с длительностью морфо-анатомических наблюдений. Кроме того, эксперименты с животными, как правило, дороги, требуют многократной повторяемости для получения статистически достоверных выводов.

Оценка и прогнозирование состояния природной среды с привлечением позвоночных животных проводятся на всех уровнях их организации. На организменном уровне с помощью сравнительного анализа оцениваются морфоанатомические, поведенческие и физиолого-биохимические показатели.

Морфоанатомические показатели описывают особенности внешнего и внутреннего строения животных и их изменение под воздействием определенных факторов (депигментация, изменение покровов, структуры тканей и расположения органов, возникновение уродств, опухолей и других

патологических проявлений).

Поведенческие и физиолого-биохимические параметры особенно чувствительны к изменению внешней среды. Токсиканты, проникая в кости или кровь позвоночных животных, сразу же воздействуют на функции, обеспечивающие жизнедеятельность. Даже при узкоспецифичном влиянии токсиканта на определенную функцию её сдвиги отражаются на состоянии всего организма вследствие взаимосвязанности процессов жизнедеятельности. Достаточно отчетливо присутствие токсикантов проявляется в нарушении ритма дыхания, сердечных сокращений, скорости пищеварения, ритмике выделений, продолжительности циклов размножения.

Для того чтобы иметь возможность сравнивать материал, собранный разными исследователями в различных районах, набор видов-индикаторов должен быть един и невелик. Вот некоторые критерии пригодности различных видов млекопитающих для биоиндикационных исследований:

- принадлежность к разным звеньям трофической цепи — растительноядным, насекомоядным, хищным млекопитающим;
- оседлость или отсутствие больших миграций;
- широкий ареал распространения (сравнительно высокая эвритопность), т.е. этот критерий исключает использование в качестве тест-индикаторов эндемиков;
- принадлежность к естественным сообществам: критерий исключает синантропные виды, питающиеся вблизи жилища человека и неадекватно характеризующие микроэлементный состав загрязнения данного региона;
- численность вида должна обеспечивать достаточный материал для анализа;
- простота и доступность методов добывания видов.

Анализируя по данным критериям представителей всех отрядов млекопитающих, встречающихся на территории стран СНГ, можно остановиться на семи видах: обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*), европейский крот (*Talpa europaea*), алтайский крот (*Talpa altaica*), бурый медведь (*Ursus arctos*), лось (*Alces alces*), рыжая полёвка (*Clethrionomys glareolus*), красная полёвка (*Clethrionomys rubilus*).

3.4. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ

Микроорганизмы — наиболее быстро реагирующие на изменение окружающей среды биоиндикаторы. Их развитие и активность находятся в прямой связи с составом органических и неорганических веществ в среде, так как микроорганизмы способны разрушать соединения естественного и антропогенного происхождения. На этом основаны принципы биоиндикации с использованием микроорганизмов. Необходимо иметь сведения о составе, количестве и функциональной активности последних.

При прямом микроскопировании, например воды, количество обнаруживаемых микроорганизмов оказывается небольшим, поэтому для изучения морфологического разнообразия и оценок их общего числа в единице объёма проводят концентрирование пробы. Для фильтрации воды используют фильтры Зейтца или иной конструкции с размером пор 0,35; 0,5; 0,23; 0,3; 0,4 мкм. Объём фильтруемой воды может быть от 10 до 20 мл в зависимости от типа водоёма. Для подсчёта численности микроорганизмов фильтр прокрашивают, переносят на предметное стекло в каплю иммерсионного масла и микроскопируют с перемещением сетчатого микрометра. Просчитывается 20 полей зрения; в каждом поле зрения должно быть не менее 50 микробов.

Число колониеобразующих клеток бактерий в 1 мл воды (N) рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{K n}{V},$$

где $K = S/S_1$ (S - площадь фильтра, мкм²; S_1 - площадь, на которой просчитываются клетки, мкм²); n - среднее число бактерий в одном поле зрения; V - объём профильтрованной воды, мл.

Для определения биомассы бактерий необходимо определить размер клеток с помощью микрометра.

Выявление микроорганизмов и их учёт можно произвести путём вы-

сева проб в жидкие и агаризованные питательные среды. Для учёта сапрофитов используют мясопептонный агар, олиготрофных бактерий выращивают на агаризованной воде из исследуемого водоёма.

Чаще всего для оценки качества вод используют показатель микробного числа - это число клеток аэробных сапрофитных организмов в 1 мл воды. В водопроводной воде согласно ГОСТ микробное число не должно превышать 100. В чистых водоёмах число сапрофитов может исчисляться десятками и сотнями, а в загрязнённых и грязных водоёмах этот показатель достигает сотен тысяч и миллионов.

Помимо микробного числа используются данные по видовому составу микроорганизмов. В полисапробной зоне наблюдается массовое развитие нитчатых бактерий. В загрязненной фекалиями воде высок коли-индекс, характеризующий наличие в среде энтеробактерий *Escherichia coli* - условных патогенов и постоянных обитателей кишечника человека и животного. Определение коли-индекса ведется в среде эндо (фуксин-сульфатный агар) подсчетом колоний *E.coli*. Иногда делают пересчёт, определяя коли-титр - наименьший объем воды (в мл), содержащий одну кишечную палочку. Коли-титр = 1000/коли-индекс.

4. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОИНДИКАТОРОВ

4.1. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОЗДУХА

Как известно, воздух представляет собой смесь определённых газов, повсюду на Земле представленных приблизительно в равных объёмных долях. Загрязнение воздуха имеет место в том случае, если в смеси имеются вещества в таких количествах и так долго, что создают опасность для человека, животных, растений или имущества. От загрязнения воздуха страдают все живые организмы, но особенно растения. По этой причине растения, в том числе низшие, наиболее пригодны для обнаружения начального изменения состава воздуха. Соответствующие индексы дают количественное представление о токсичном эффекте загрязняющих воздух веществ.

Лишайники являются симбиотическими организмами. Многими исследователями показана их пригодность для целей биоиндикации. Они обладают весьма специфическими свойствами, так как реагируют на изменение состава атмосферы, обладают отличной от других организмов биохимией, широко распространены по разным типам субстратов, начиная со скал и кончая корой и листьями деревьев, удобны для экспозиции в загрязненных районах.

Выделяют четыре основные экологические группы лишайников: *эпифитные* — растущие на коре деревьев и кустарников; *эпиксилльные* — растущие на обнаженной древесине; *эпигейные* — на почве; *эпилитные* — на камнях. Из них наиболее чувствительны к загрязнению воздуха эпифитные виды. С помощью лишайников можно получать вполне достоверные данные об уровне загрязнения воздуха. При этом можно выделить группу химических соединений и элементов, к действию которых лишайники обладают сверхповышенной чувствительностью: оксиды серы и азота, фторо- и хлороводород, а также тяжелые металлы. Многие лишайники погибают при невысоких уровнях загрязнения атмосферы этими веществами. Процедура определения качества воздуха с помощью лишайников носит название лишеноиндикации (см. гл. 5).

Оценку чистоты воздуха можно проводить с помощью высших растений. Например, голосеменные — отличные индикаторы чистоты атмосферы. Возможно также изучение мутаций в волосках тычиночных нитей традесканции. Французские ученые подметили, что при увеличении в воздухе оксида углерода (II) и оксидов азота, выбрасываемых двигателями внутреннего сгорания, окраска её тычиночных нитей меняется от синей к розовой. Последствия нарушений в индивидуальном развитии растений могут быть выявлены также по частоте встречаемости морфологических отклонений (фенодевиантов), величине показателей флуктуирующей асимметрии (отклонение от совершенной билатеральной и радиальной симметрии), методом анализа сложноорганизованных комплексных структур (фрактал-анализ). Уровни любых отклонений от нормы оказываются минимальными лишь при оптимальных условиях и возрастают при любых стрессовых воздействиях.

4.2. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ

Сразу оговоримся, что биологическое исследование изучает не воду, а водоём в целом как единую экосистему. Н.С. Строганов определил водную токсикологию как науку о токсичности среды обитания гидробионтов на всех уровнях организации живого, которая изучает все реакции гидробионтов на загрязнение любого происхождения.

Для того чтобы оценить уровень токсического загрязнения водного объекта промышленными или иными стоками, нужно ответить на вопросы: токсична ли исходная вода, поступающая в водоём со сточными водами; какова степень её токсичности; на каком расстоянии от источника загрязнения токсичность снижается до минимального значения. В качестве эквивалента было использовано разведение сточной жидкости, при котором ещё наблюдается повреждающий эффект по примененному биотесту. Ориентируясь как на основной показатель токсичности химических веществ для гидробионтов на величину медиальной летальной концентрации (LC_{50}), принятую в общей (медицинской) токсикологии для теплокровных животных, Н.С. Строганов предложил количественное определение токсичности как величины, обратной медиальной летальной концентрации, устанавливаемой в 48-часовом опыте, с учетом разведения пробы:

$$T = \frac{1}{LC_{50}^{48}}$$

где T - токсичность.

Например, если d (коэффициент разведения) = 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:500 и т.д., то токсичность соответственно выражается величинами 1; 2; 5; 10; 25; 50; 100; 500 и т.д., т.е. целыми числами, удобными для сравнения. Величину, обратную разведению, назвали баллом интегральной токсичности (БИТ).

Для биологической индикации качества вод могут быть использованы практически все группы организмов, населяющие водоёмы: планктонные и бентосные беспозвоночные, простейшие, водоросли, макрофиты, бактерии и

рыбы. Каждая из них, выступая в роли биологического индикатора, имеет свои преимущества и недостатки, которые определяют границы её использования при решении задач биоиндикации, так как все эти группы играют ведущую роль в общем круговороте веществ в водоёме. Организмы, которые обычно используют в качестве биоиндикаторов, ответственны за самоочищение водоёма, участвуют в создании первичной продукции, осуществляют трансформацию веществ и энергии в водных экосистемах. Всякое заключение по результатам биологического исследования строится на основании совокупности всех полученных данных, а не на основании единичных находок индикаторных организмов. Как при выполнении исследования, так и при оценке полученных результатов необходимо иметь в виду возможность случайных, местных загрязнений в точке наблюдения. Например, разлагающиеся растительные остатки, труп лягушки или рыбы могут вызывать местные изменения в характере населения водоёма.

Наиболее разработанной оценкой степени загрязнённости вод по индикаторным организмам является *система сапробности*.

Метод учитывает относительную частоту встречаемости гидробионтов h (от 1 до 9 или от единичных экземпляров, например, инфузорий, в поле зрения микроскопа и до очень частой встречаемости, когда их много в каждом поле зрения) и их индикационную значимость S . Для статистической достоверности результатов необходимо, чтобы в пробе содержалось не менее 12 видов индикаторных организмов одной зоны сапробности с $\sum_{i=1}^{12} h_i \geq 30$. Индикаторные значимости S для соответствующих зон сапробности табулированы для многих организмов. По рассчитанной величине S можно судить о состоянии водоёма. Заключение о степени загрязнённости воды дают обычно по системе баллов от 1 до 6. Кроме того, качество воды можно оценить с помощью биотического индекса по системе Ф. Вудивиса.

Высшие водные растения среди вышеуказанных групп организмов-индикаторов являются наименее изученным звеном, хотя имеют ряд пре-

имуществ. Они представляют собой видимый невооружённым глазом и поэтому весьма удобный для наблюдения объект, а также дают возможность при рекогносцировочном гидробиологическом осмотре водоёмов в первом приближении визуально оценить их экологическое состояние. Макрофиты позволяют определить трофические свойства воды, а иногда и специфику её химизма, что имеет существенное значение при биоиндикации чистых вод.

4.3. ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ПОЧВ

В основе принципа биологической диагностики почв лежит представление о том, что почва как среда обитания составляет единую систему с населяющими её популяциями разных организмов.

Лучше других разработаны ботанические методы фитоиндикации и диагностики почв. Например, путём анализа состава и структуры растительных сообществ, распространения растений-индикаторов или определенных индикационных признаков у отдельных видов растений можно установить тип почвы, степень её гидроморфизма, развитие процессов заболачивания, соленакопления и т.д. Среди растений обнаружены индикаторы на тот или иной механический и химический состав почв, степень обогащённости питательными элементами, на кислотность или щелочность, глубину протаивания мерзлотных почв или уровень грунтовых вод.

Теоретической предпосылкой применения почвенно-зоологического метода для целей диагностики почв является сформулированное М. С. Гиляровым в 1949 г. представление об «экологическом стандарте» вида — потребности вида в определенном комплексе условий среды. Каждый вид в пределах своего ареала встречается только в тех местообитаниях, которые обеспечивают полный комплекс необходимых для проявления жизнедеятельности условий. Амплитуда варьирования отдельных факторов среды характеризует экологическую пластичность вида. Эврибионты мало пригодны для индикационных целей, тогда как стенобионты служат хорошими индикаторами определенных условий среды и свойств субстрата. Это положение представляет собой общий теоретический принцип в биологической

диагностике. Однако использование для индикации одного вида не дает полной уверенности в правильности выводов (здесь имеет место «правило смены местообитаний» и как следствие смена экологических характеристик вида). Лучше исследовать весь комплекс организмов, из которых одни могут быть индикаторами на влажность, другие — на температуру, третьи — на химический или механический состав. Чем больше общих видов почвенных животных встречается на сравниваемых участках, тем с большей долей вероятности можно судить о сходстве их режимов, а следовательно, о единстве почвообразовательного процесса. Менее других полезны микроскопические формы — простейшие и микроартроподы (клещи, ногохвостки). Их представители отличаются космополитизмом в силу того, что почва для них не выступает как единая среда обитания: они живут в системе пор, капилляров, полостей, которые можно найти в любой почве. Из микроартропод наиболее хорошо изучены индикаторные свойства панцирных клещей. Состав их комплексов сообществ зависит не только от почвенных условий, но и от характера и флористического состава растительности, поэтому данный объект перспективно использовать для индикации повреждающих воздействий на почву.

Особенно ценны и удобны для индикационных работ сообщества крупных беспозвоночных (дождевые черви, многоножки, личинки насекомых). Так, стафилиниды рода *Bledius* и чернотелки рода *Belopus* показательны для солончаково-солонцовых почв, многоножки-кивсяки, некоторые мокрецы и легочные моллюски служат индикаторами содержания в почве извести. Дождевые черви *Octolasion lacteum* и некоторые виды проволочников являются показателями высокого содержания кальция в грунтовых водах.

Интерес представляет почвенно-альгологическая диагностика, в основе которой лежит положение о том, что зональности почв и растительности соответствует зональность водорослевых группировок. Она проявляется в общем видовом составе и комплексе доминантных

видов водорослей, наличии специфических видов, характере распространения по почвенному профилю, преобладании определенных жизненных форм.

Микробиологическая и биохимическая характеристики почв - наиболее сложные разделы почвенной биодиагностики. Микроорганизмы - очень чуткие индикаторы, резко реагирующие на различные изменения в среде. Отсюда необычайная динамичность микробиологических показателей. Почва характеризуется не только составом и численностью разных групп биоты, но и их суммарной активностью, а также активностью биохимических процессов, обусловленных наличием определенного пула ферментов, выделенных в результате жизнедеятельности растений, животных и микроорганизмов, а также аккумулярованных почвой после разрушения клеток. Показателями биологической активности почв, применяемых в биоиндикации, могут служить количественные характеристики численности и биомассы разных групп почвенной биоты, их общая продуктивность, некоторые энергетические данные, активность основных процессов, связанных с круговоротом элементов, ферментативная активность почв, а также количество и скорость накопления некоторых продуктов жизнедеятельности почвообитающих организмов.

Для определения размеров микробной биомассы и продуктивности используют не только прямые подсчеты числа клеток, но и косвенные методы - биохимические и физиологические. Например, биомассу водорослей предложено определять по количеству хлорофилла, бактерий - по специфической для прокариот мурамовой кислоте, грибов - по хитину, который входит в состав их клеточной стенки. Микробную активность в почве определяют также по уровню АТФ и полифосфатов, содержанию ДНК, РНК и аминокислот.

Наиболее общими являются методы, позволяющие оценить суммарные биологические процессы по исходным или конечным продук-

там: методы определения дыхания почвы по поглощению O_2 или выделению CO_2 ; учёт активности азотфиксации по восстановлению ацетилена; микрокалориметрические измерения для установления уровня термостойкости; аппликационные методы с применением специальных материалов (целлюлозы, хроматографической бумаги, целлофана) для оценки скорости и степени их разложения и накопления продуктов метаболизма, например, аминокислот. Особую группу составляют методы определения потенциальной активности отдельных ферментов в почвах (именно активности, а не количественного содержания).

5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ И КОЭФФИЦИЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ИНДИКАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Для практических целей необходимо знание о надёжности и эффективности того или иного индикатора, поэтому было предложено характеризовать индикаторы по двум показателям - достоверности и значимости.

Достоверность - это степень сопряжённости индикатора с объектом индикации. Абсолютно достоверным считается индикатор, которому объект индикации соответствует в 100 % случаев. Для расчёта показателя достоверности берут определённое число эталонных участков (или площадок), где обязательно имеется индикатор. Среди них есть такие, где индикатор встречается вместе с объектом индикации. Процентное соотношение этих участков и участков с индикатором, но без объекта индикации служит количественным показателем достоверности индикатора. Например, если из 100 обследованных участков с произрастанием растения-индикатора неглубокого залегания грунтовых вод (1,5 - 5 м) вода была обнаружена только на 95 участках, а на 5 нет, то достоверность индикатора составляет $95/100 = 0,95$. Это довольно большой показатель. Если сопряженность превышает 90 %, а показатель достоверности больше 9, то индикатор считается *надёжным*. *Удовлетворительным* индикатор будет в том случае, если сопряжённость равна 75 – 90 %, а показатель достоверности находится в пределах 3-9. *Сомнитель-*

ным индикатор считается, когда сопряжённость составляет 60-75 %, а показатель достоверности лежит в диапазоне от 1,5 до 3. Когда сопряжённость менее 60 %, а показатель достоверности менее 1,5, индикация *невозможна*.

Показатель достоверности ещё не даёт полного представления о практической значимости того или иного индикатора. Так, если растение является абсолютным индикатором, но редко встречается в природе (например, вид занесен в Красную книгу), то его практическое значение ограничено. Вот почему для индикаторов введен показатель *значимости*, который дает представление о том, насколько часто индикатор встречается вместе с объектом индикации. За 100 % принимается количество эталонных участков с объектом индикации. Значимость выражается отношением (в %) количества эталонных участков, где объект индикации присутствует вместе с индикатором, к общему количеству эталонных участков с объектом индикации. Например, объект индикации обнаружен на 60 эталонных участках, причём на 42 участках он присутствует вместе с индикатором; следовательно, значимость данного индикатора составляет, %:

$$\frac{42}{60}100 = 70.$$

Коэффициенты достоверности и значимости являются важными характеристиками индикаторных свойств растения. Если они достаточно высокие, можно начинать фитоиндикацию.

При оценке уровня загрязнения биогеоценозов обычно используют различные критерии, самыми распространёнными из которых являются характеристики видового состава, обилия видов и жизненное состояние особей, входящих в сообщество. Первые два критерия тесно связаны между собой, поскольку сравнение сообществ только по составу имеющихся видов без указания на их обилие представляет приблизительную, рекогносцировочную оценку. Для объективного сравнения двух исследуемых площадок в одном биотопе используются различные индексы.

При биоиндикации загрязнения атмосферного воздуха или почвенного покрова применяют *коэффициент Жаккара*, определяемый как число видов, общих для двух площадок, выраженное в процентах от общего числа видов, %:

$$K_j = \frac{c}{a+b-c} 100,$$

где a - число видов на первой площадке; b - число видов на второй площадке; c - число общих видов для этих двух площадок.

Обобщением коэффициента Жаккара является *индекс биотической дисперсии Коха*, служащий для оценки общей степени сходства некоторого числа видовых списков. Если n списков включают соответственно S_1, S_2, \dots, S_n видов и общее число отличных видов равно S , то индекс Коха, %:

$$I_K = \frac{(n-1)S}{t-S} 100,$$

где $t = S_1 + S_2 + \dots + S_n$. При $n = 2$ индекс Коха совпадает с коэффициентом Жаккара.

Другой широко используемый коэффициент общности, *коэффициент Серенсена* K_s , равен числу видов, общих для двух участков c , выраженному в процентах от среднего числа видов на участках a и b , %:

$$K_s = \frac{2c}{a+b} 100,$$

Этот индекс можно применять для регистрации изменений в биогеоценозе за определенный промежуток времени. При этом требуется знать число видов в момент (день, год) начала наблюдений и в момент (день, год), взятый для сравнения.

Если оценка изменения степени проективного покрытия важнее, чем оценка изменения числа видов, применяют несколько иной коэффициент общности. При этом изменения степени проективного покрытия учитываются с помощью *процентного сходства (ПС)*, %:

$$ПС = \frac{2 \sum_{i=1}^n \min(x_i, y_i)}{\sum_{i=1}^n (x_i + y_i)} 100,$$

где $\min(x_i, y_i)$ – наименьшая степень покрытия вида, общего для описаний x и y .

Важным требованием при проведении сравнительных оценок биоценозов является использование статистических критериев, поэтому вопрос о числе повторностей сравниваемых площадок или о величине площадей должен быть решен с помощью статистических критериев.

При лишеноиндикации атмосферного воздуха используются индексы, в которых учитывается степень проективного покрытия лишайниками и либо общее число видов на площадке, либо среднее число видов, находящихся на всех сравниваемых площадках. *Индекс полеотолерантности вида (ИП)* соответствует определенной концентрации газообразных соединений, загрязняющих атмосферу, и по нему можно составить карту среднегодовых концентраций загрязняющих веществ на определенной территории:

$$ИП = \sum_{i=1}^n \frac{a_i c_i}{c_n},$$

где c_n – общее проективное покрытие; a_i – класс полеотолерантности i -го вида, определяемый по справочной таблице в соответствии с видом лишайника; c_i – проективное покрытие i -го вида.

Более простым для использования является *индекс чистоты атмосферы (ИЧА)*, не требующий специальных таблиц и сложных расчетов:

$$ИЧА = \sum_{i=1}^n Q_i f_i,$$

где Q_i – коэффициент токсикотолерантности вида, равный среднему числу видов, сопровождающих данный вид i по всем пунктам; f_i – степень проективного покрытия.

Недостаток этих индексов в том, что при их использовании необходимо учитывать площадь исследования, поскольку индекс в значительной

степени (хотя и косвенно) зависит от её величины.

Для оценки уровней загрязнения биогеоценозов могут быть использованы различные индексы видового разнообразия. Максимальным индекс будет в случае, когда каждая особь принадлежит к отдельному виду, а минимальным – когда все особи относятся к одному виду. Преимущество имеют те индексы разнообразия, которые не зависят от размеров пробы, показывают относительное значение видов в сообществе и являются безразмерными. Наиболее широко в биомониторинге используют *индекс Шеннона-Винера* – *индекс H*. Разнообразие *H* по Шеннону-Винеру математически характеризует два параметра ценоза – число имеющихся видов и равномерность распределения их популяций (численность особей или их количественную долю):

$$H = \sum_{i=1}^S h_i, \quad \text{где} \quad h_i = p_i \ln \frac{1}{p_i}.$$

В выборке истинное значение p_i неизвестно, поэтому в качестве оценки берётся n_i/N , отсюда:

$$N = \sum_{i=1}^S n_i,$$

где S – число видов; n_i – количество (численность или масса особей) i -го вида; N – общее количество видов; p_i – относительная частота встречаемости i -го вида; h_i – частичная мера информации i -го вида или структура доминирования i -го вида.

Величина индекса разнообразия Шеннона-Винера обычно укладывается в интервале от 1,5 до 3,5 и очень редко превышает 4,5. Применение этого индекса для экологического анализа водоёма показало, что его величина резко падает в месте сброса сточных вод независимо от того, оценивается ли он на уровне видов, родов, отрядов или классов гидробионтов на разных трофических уровнях. Это значительно расширяет возможности применения данного индекса, причем не только для оценки разнообразия гидробионтов, но и для оценки степени загрязнения, например, городских

экосистем.

Индекс видового разнообразия Маргалефа \bar{d} был предложен для оценки загрязнения водоёмов, которые обычно характеризуются уменьшением биоразнообразия:

$$\bar{d} = (S - 1) \ln N,$$

где S - количество видов; $\ln N$ - натуральный логарифм количества особей.

Коэффициент принимает максимальное значение, если все особи принадлежат к разным видам ($S = N$), и равен нулю, когда все особи принадлежат к одному виду.

Проточные водоёмы могут быть оценены с помощью *биотического индекса*, разработанного в Великобритании (Англия) и впервые опробованного на реке Трент. Определение биотического индекса ведётся по рабочей шкале, в которой использована наиболее часто встречаемая последовательность исчезновения бентосных беспозвоночных по мере увеличения загрязнения. Метод Вудивиса имеет много численных сторонников, которые, однако, признают ряд его недостатков: довольно общий и часто упрощённый с плохой репрезентативностью отбор проб; часто не принимающиеся во внимание трудности идентификации; недостатки стандартной таблицы для расчёта индекса, а именно – различная чувствительность к загрязнению в некоторых группах выделенных видов, недостаточное таксономическое разнообразие.

Обобщенный индекс биологического качества имеет ряд преимуществ: дифференцированный отбор проб с идентификацией разных зон, стандартная таблица благодаря коррекциям и уточнениям, внесенным в списки таксонов и в классификацию, более удобна в пользовании. Вместе с тем рабочая нагрузка, обусловленная большим разнообразием проб, недостаток классов таксономического разнообразия в стандартной таблице делают использование этого индекса сомнительным. Параллельно с обобщенным индексом биологического качества был предложен *индекс потенциального*

биологического качества, удобный для исследования больших глубин. Более совершенным является *биологический индекс общего качества*, отличающийся тем, что усовершенствованный отбор проб дает мозаичную картину населения зоны; в списке из 135 таксонов 38 являются индикаторами.

Общий уровень загрязнения часто оценивают по *индексу сапробности* Пантле и Букка:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (S_i h_i)}{\sum_{i=1}^n h_i},$$

где S – индекс значимости вида; h – частота встречаемости организмов.

Загрязнение приводит не только к снижению видового разнообразия, но и к увеличению доминирования определенных видов. При этом обилие свойственно небольшому числу видов, которые можно оценить *индексом неоднородности Симпсона*:

$$D = \sum_{i=1}^n \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)},$$

где n_i – число особей i -го вида; N – общее число особей. По мере увеличения D разнообразие уменьшается, поэтому используют его обратную величину $1/D$. Величина индекса в сильной степени зависит от присутствия в пробе самых обильных видов, но в слабой от видового разнообразия.

При оценке водоёмов, загрязненных органическими соединениями, может использоваться *олигохетный индекс*, или *индекс Гуднайта и Уитлея*. В собранной пробе подсчитывается общее количество организмов и отдельно число олигохет: $(N_{\text{олигохет}}/N_{\text{общая}})100\%$, где N – численность, экз./м².

Значение коэффициента увеличивается по мере ухудшения качества воды. Так, высокую концентрацию загрязнения характеризует олигохетный индекс $>80\%$; сомнительным загрязнение считается при индексе $60 - 80\%$; состояние водной среды хорошее, когда индекс $<60\%$.

Помимо олигохет в бентосе континентальных водоемов широко представлены личинки комаров-звонцов, принадлежащие к трем подсемействам: *Chironominae*, *Orphocladinae* и *Tanypodinae*. Орфоклады обитают в основном в чистых водах, таниподины – в загрязненных, хириномиды выдерживают относительно невысокие степени загрязнения. Таким образом, по соотношению численности представителей этих подсемейств можно судить о качестве воды. Е.В. Балущкина предложила индекс K , который может служить для этой цели:

$$K = \frac{d_T + 0,5d_{Ch}}{d_{Or}},$$

где $d_T = N_T + 10$, $d_{Ch} = N_{Ch} + 10$, $d_{Or} = N_{Or} + 10$; N_T ; N_{Ch} ; N_{Or} – выраженные в процентах отношения численности личинок одного из подсемейств к общей численности личинок этого семейства. Величина 10 – верхний предел значений индекса. Нижний предел его равен нулю.

6. БИОТЕСТИРОВАНИЕ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ

Результаты, полученные с помощью химико-аналитического контроля и биотестирования, дополняют друг друга. В последнее время интенсивно развиваются методы биотестирования с применением моделей экосистем, а также использование животных и растений в качестве индикаторов ранних стадий загрязнения водных источников [10]. Можно ожидать, что потребность в диагностике объектов экологии, медицины, пищевой промышленности приведет к возрастанию роли тест-методов [11 – 16].

Наиболее широко методы биотестирования применяются для оценки качества водных объектов. **Качество воды** – характеристика состава и свойств воды, определяющая ее пригодность для конкретных видов водопользования [8]. С помощью методов биотестирования определяется токсичность водных объектов [4], т.е. устанавливается **сапробность** водоёма, которая указывает на степень загрязнения органическими, гнилостными веществ-

вами [17]. Кроме того, биологический анализ определяет наличие токсических веществ, влияющих на водные организмы. Методы определения токсичности позволяют оценить влияние сточных вод на водные организмы.

Токсичность воды – свойство воды вызывать патологические изменения или гибель организмов, обусловленное присутствием в ней токсичных веществ [9].

Острая токсичность – токсичность воды, проявляющаяся вследствие кратковременного воздействия токсического вещества.

Острая летальная токсичность воды – летальная токсичность воды, обусловленная кратковременным воздействием токсического вещества [8].

Уровень токсичности воды – количественная характеристика токсичности воды, определяемая через минимальную кратность разбавления, при котором токсичность воды уже не проявляется.

Степень токсичности характеризует общий (брутто) уровень загрязнения водного объекта, учитывающий присутствие в воде всех токсикантов и их взаимодействие. Это особенно важно в связи с тем, что химические и физико-химические методы анализа дают информацию чаще всего о наличии в воде одного ЗВ без учета совместного присутствия других ингредиентов (эффекты суммации, синергизма и др.) [4].

Наибольшую проблему при загрязнении вод создают ядохимикаты и ТМ, с трудом выявляемые из-за очень низких концентраций, но способные постепенно накапливаться в организме, вызывая многочисленные нарушения здоровья при потреблении воды. Большинство ТМ растворимы в воде и могут попадать в организм, где, взаимодействуя с рядом ферментов, подавляют их активность. Даже малые их количества могут вызывать тяжелые физиологические и неврологические нарушения в организме.

С помощью метода биотестирования определяют предельно допустимые концентрации (ПДК) новых химических соединений, проводят биохимический и генотоксический мониторинг водных экосистем. Известны способы определения микроколичеств фосфоорганических пестицидов в воде

биотестированием относительно дафний. Биотестирование относительно рыб широко применяют для определения следовых и ультраследовых количеств пестицидов и их метаболитов в водных экосистемах.

Биотестирование является дополнительным экспериментальным приемом для проверки необходимости корректировки величин предельно допустимого сброса (ПДС) по показателю «токсичность воды». Это позволяет учесть ряд существенных факторов: наличие в сточной воде токсических веществ, не учитываемых при установлении ПДС, вновь образовавшихся соединений – метаболитов, различные виды взаимодействий химических веществ – синергизм, антагонизм, аддитивность и т.д. Необходимость корректировки величин ПДС возникает в том случае, если при биотестировании воды из контрольного створа водного объекта установлено несоответствие её качества требуемому нормативу: вода в контрольном створе водного объекта не должна оказывать хронического токсического действия на тест-объекты [18].

При мониторинге природных и сточных вод предприятий в качестве тест-объектов удобно применять фитопланктон и дафний. Показателем при этом служит выживаемость гидробионта. Для биоиндикации состояния водоёмов используют так называемые «рыбные пруды», в которых тест-объектами служат караси и аквариумные рыбы гуппи [1]. Вышеперечисленные тест-организмы нашли широкое применение при биотестировании благодаря быстрой реакции на токсическое действие ЗВ и простоте культивирования. Использование различных методов биотестирования зависит от конкретных практических задач (рис. 1) [4].

Результаты биотестирования устанавливают токсичность вод вне связи с конкретными веществами, т.к. неизвестно, какое именно вещество произвело токсический эффект. Таким образом, *биотестирование позволяет определить интегральную токсичность, обусловленную совокупностью всех присутствующих в пробе опасных химических веществ и их метаболитов.*

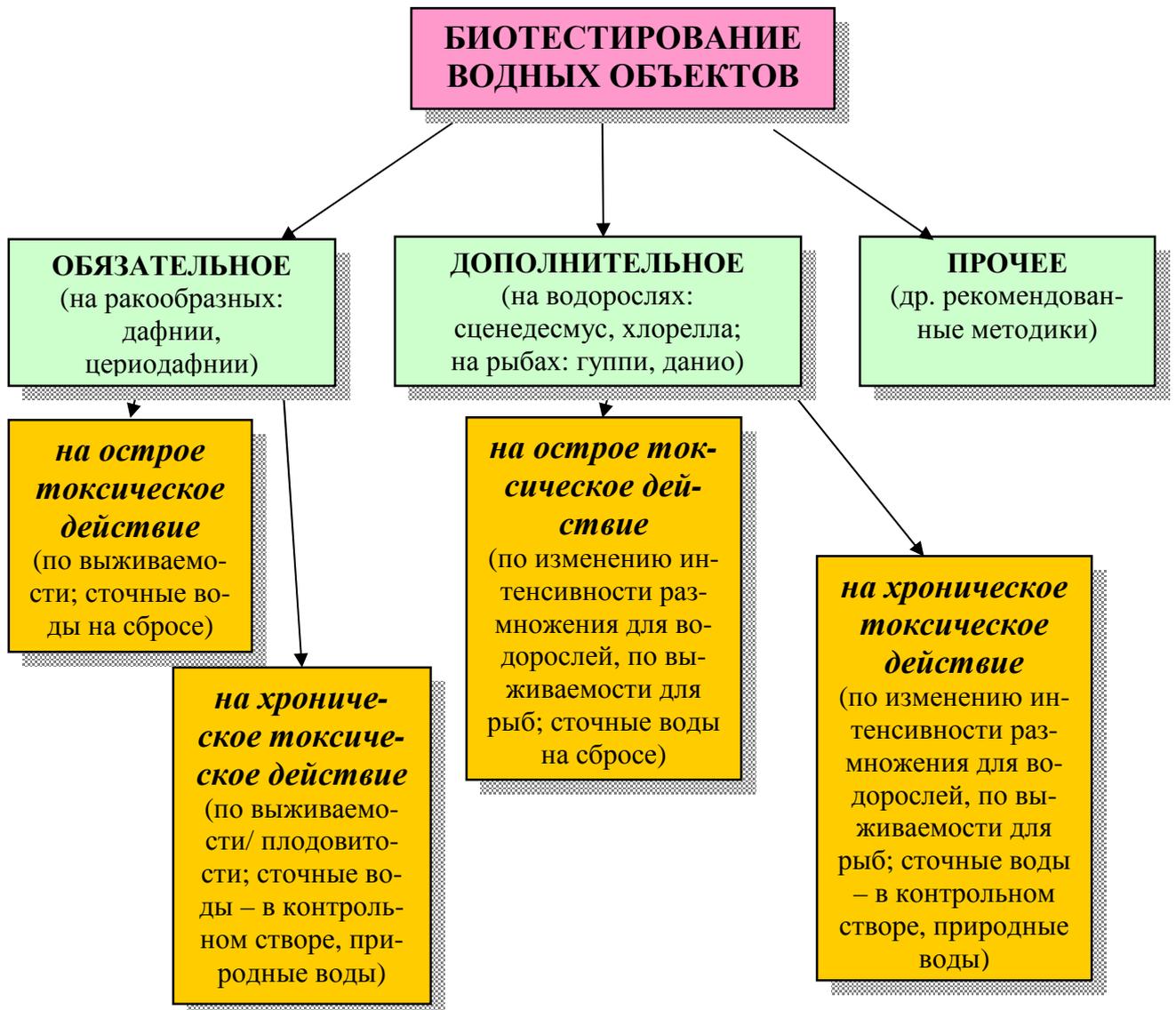


Рис.1. Схема методов биотестирования водных объектов

Конечной целью биотестов является оценка безопасности или иных свойств исследуемого объекта на организмах-моделях и на основании полученных результатов прогнозирование реакции организма человека и/или животных. Самым сложным при таком подходе к оценке безопасности является получение прогноза с достаточным уровнем достоверности, так как любые модели, в том числе и биологические, имеют разную степень приближения к организму, который моделируют. Часто о качестве биологической модели (насколько она близка к моделируемому организму) можно судить только после накопления большого количества результатов исследований и последующего статистического анализа [19].

Методика биотестирования не только достоверно дает информацию о количественном загрязнении, но и более полно отображает сами последствия

загрязнения воды. Говорить об универсальности такой методики было бы неверно за счет ее специфичности, но на практике возможно ее применение, тем более, что себестоимость такой методики гораздо ниже стоимости методов химико-аналитического анализа [10].

В литературных источниках имеются сведения о применении методов биотестирования для оценки токсичности водной среды в США, Великобритании, Германии, Франции, Австрии, Индии, Норвегии, Швеции, Швейцарии, Финляндии, Японии и др. [4]. В последнее время во многих странах мира биотестирование стало обязательным и общепризнанным элементом системы контроля загрязнения водных объектов токсическими веществами, многие методы стандартизованы [20]. В литературе обобщен опыт разработки международных стандартов ИСО по контролю воды, в частности, описаны методы биотестирования с помощью пресноводных рыб (ИСО 7346), дафний (ИСО 6341), водорослей (ИСО 8693) и активированного ила (ИСО 8192) [20]. За последние годы происходит накопление опыта работы в этой области и в России [20].

Методическое руководство по биотестированию [9] включает методики определения токсичности с использованием в качестве тест-объектов ракообразных (дафний), водорослей и рыб. Помимо обязательных тестов (на дафниях) допускается использование других рекомендованных методов биотестирования [4].

Таким образом, перечисленные методы не исчерпывают области применения биотестов для оценки загрязнения биосферы и прогноза влияния поллютантов на живую природу. Несмотря на сложность выявления биологического отклика на воздействие внешних факторов, проблема экологического состояния ОПС, очевидно, будет стимулировать дальнейшее развитие биоаналитических методов [1].

6.1. ЗАДАЧИ И ПРИЁМЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА СРЕДЫ

В выявлении антропогенного загрязнения среды наряду с химико-аналитическими методами находят применение приёмы, основанные на

оценке состояния отдельных особей, подвергающихся воздействию загрязненной среды, а также их органов, тканей и клеток. Их применение вызвано технической усложненностью и ограниченностью информации, которую могут предоставить химические методы. Кроме того, гидрохимические и химико-аналитические методы могут оказаться неэффективными из-за недостаточно высокой их чувствительности. Живые организмы способны воспринимать более низкие концентрации веществ, чем любой аналитический датчик, в связи с чем биота может быть подвержена токсическим воздействиям, не регистрируемым техническими средствами.

Как было показано в гл. 3, биоиндикация предусматривает выявление уже состоявшегося или накапливающегося загрязнения по индикаторным видам живых организмов и экологическим характеристикам сообществ организмов. Пристальное внимание в настоящее время уделяется приемам биотестирования, т.е. использования в контролируемых условиях биологических объектов в качестве средства выявления суммарной токсичности среды. Биотестирование представляет собой методический приём, основанный на оценке действия фактора среды, в том числе и токсического, на организм, его отдельную функцию или систему органов и тканей.

Кроме выбора биотеста существенную роль играет выбор тест-реакции – того параметра организма, который собственно и измеряется при тестировании.

Наиболее информативны интегральные параметры, характеризующие общее состояние живой системы соответствующего уровня. Для отдельных организмов к интегральным параметрам обычно относят характеристики выживаемости, роста, плодовитости, тогда как физиологические, биохимические, гистологические и прочие параметры относят к частным. Для популяций интегральными параметрами являются численность и биомасса, а для экосистем – характеристики видового состава, активности продукции и деструкции органического вещества.

С увеличением интегральной тест-реакции повышается «экологиче-

ский реализм» теста, но обычно снижаются его оперативность и чувствительность. Функциональные параметры оказываются более лабильными, чем структурные, а параметры клеточного и молекулярного уровней проигрывают в отношении экологической информативности, но выигрывают в отношении чувствительности, оперативности и воспроизводимости.

6.2. ТРЕБОВАНИЯ К МЕТОДАМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Для того чтобы быть пригодными для решения комплекса современных задач, методы биотестирования, используемые для оценки состояния окружающей природной среды, должны соответствовать следующим требованиям: быть применимыми для оценки любых экологических изменений среды обитания живых организмов; характеризовать наиболее общие и важные параметры жизнедеятельности биоты; быть достаточно чувствительными для выявления даже начальных обратимых экологических изменений; быть адекватными для любого вида живых существ и любого типа воздействия; быть удобными не только для лабораторного моделирования, но также и для исследований в природе; быть достаточно простыми и не слишком дорогостоящими для широкого использования.

Одним из наиболее важных требований при оценке состояния ОПС является чувствительность применяемых методов. Потребность в таких методах особенно возрастает в настоящее время, когда в силу повышенного внимания к проблемам охраны природы и в связи с необходимостью проведения природоохранных мероприятий становится необходимым оценивать не только и не столько существенные, как правило, уже необратимые изменения в среде, но первоначальные незначительные отклонения, когда еще возможно вернуть систему в прежнее нормальное состояние.

Другое важное требование – универсальность в отношении физического, химического или биологического оцениваемого воздействия и типа экосистем и/или видов живых существ, по отношению к которым такая оценка проводится. Причём это необходимо в отношении и отдельных агентов и кумулятивного воздействия любого их сочетания (включая весь

комплекс как антропогенных, так и естественных факторов).

Система должна быть относительно простой и доступной, пригодной для широкого использования. В настоящее время существует ряд современных молекулярно-биологических тестов качества среды, но в силу высокой технологической сложности и стоимости их применение оказывается ограниченным. При этом перед экспериментаторами и исследователями неизбежно возникает вопрос: нужно ли прибегать к таким сложным методам при решении общей задачи мониторинга состояния среды и нельзя ли получить сходную информацию более доступным способом?

6.3. МЕСТО БИОТЕСТИРОВАНИЯ И БИОИНДИКАЦИИ В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Важнейшей составной частью экологического мониторинга ОПС является **биомониторинг** – система наблюдений, оценки и прогноза различных изменений в биоте, вызванных факторами антропогенного происхождения. Биомониторинг делает возможной прямую оценку качества среды и является одним из уровней последовательного процесса изучения здоровья экосистемы. **Основной задачей биологического мониторинга** является наблюдение за уровнем загрязнения биоты с целью разработки систем раннего оповещения, диагностики и прогнозирования. Главными этапами являются отбор подходящих природных объектов и создание автоматизированных систем, способных с достаточно большой точностью выявлять «отклик» организма на загрязнение среды, в которой он находится, определение регламента, согласование методик, проектирование и эксплуатация сети мониторинга [21].

Биологические методы помогают диагностировать негативные изменения в природной среде при низких концентрациях ЗВ. При этом используемые виды **биоиндикаторов должны удовлетворять** следующим **требованиям**:

- это должны быть виды, характерные для природной зоны, где располагается данный объект;

- организмы-мониторы должны быть распространены на всей изучаемой территории повсеместно;
- они должны иметь четко выраженную количественную и качественную реакцию на отклонение свойств среды обитания от экологической нормы;
- биология данных видов-индикаторов должна быть хорошо изучена.

С помощью биоиндикаторов возможно:

- обнаруживать места скоплений в экологических системах различного рода загрязнений;
- проследить скорость происходящих в ОПС изменений;
- только по биоиндикаторам можно судить о степени вредности тех или иных веществ для живой природы;
- прогнозировать дальнейшее развитие экосистемы.

Преимуществом методов биоиндикации и биотестирования перед физико-химическими методами является интегральный характер ответных реакций организмов, которые:

- суммируют все без исключения биологически важные данные об ОС и отражают её состояние в целом;
- выявляют наличие в ОПС комплекса загрязнителей;
- в условиях хронической антропогенной нагрузки реагируют на очень слабые воздействия в силу аккумуляции дозы;
- фиксируют скорость происходящих в ОС изменений;
- указывают пути и места скоплений различного рода загрязнений в экологических системах и возможные пути попадания этих веществ в организм человека.

Особую значимость имеет то обстоятельство, что биоиндикаторы отражают степень опасности соответствующего состояния ОС для всех живых организмов, в том числе и для человека.

Высокочувствительными к антропогенному загрязнению представителями биоты являются организмы-индикаторы, которые используются для

идентификации изменений в ОС, обусловленных действием смеси загрязнителей.

К чувствительным биоиндикаторам относятся лишайники, мхи, почвенные и водные микроорганизмы (водоросли, бактерии, микрогрибы). В роли биоиндикаторов могут быть использованы пыльца растений, хвоя сосны обыкновенной и др. Среди животных также выделяются группы организмов, положительно или отрицательно реагирующие на различные формы антропогенной трансформации среды (ракообразные, хирономиды, моллюски, рыбы, личинки ручейников, поденок, веснянок и др.).

Присутствие толерантных индикаторных организмов в виде высокой плотности популяций или отсутствие чувствительных популяций может служить показателями загрязнений [21].

6.4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Методы биотестирования по определению токсичности сточных и природных, пресных и морских вод, донных отложений применяются наряду с физико-химическими методами:

- при установлении нормативных требований к качеству вод;
- проведении экологического контроля за соблюдением нормативов допустимых сбросов химических веществ в водные объекты и нормативов допустимых воздействий хозяйственной и иной деятельности на водные объекты;
- осуществлении государственного экологического мониторинга водных объектов, прежде всего, в районах расположения источников антропогенного воздействия;
- проведении экологической экспертизы новых технологий материалов, проектов очистных сооружений, реконструкций и технического перевооружения народно-хозяйственных объектов;
- проведении оценки степени токсичности вод на разных стадиях формирования для проектирования локальных очистных сооруже-

ний;

– проведении оценки состояния водных экосистем [8, 22].

Биологический анализ может быть использован для решения целого ряда специальных практических задач, связанных с водоснабжением населения, промышленности и сельского хозяйства:

1. С помощью биотестирования определяют ПДК новых химических соединений, проводят биохимический и генотоксический мониторинг водных экосистем.
2. На основании состава организмов определяется степень загрязнения воды органическими веществами с установлением соответствующей зоны сапробности, которая определяет тем самым практическую применимость водоисточника для целей водоснабжения и необходимость его очистки.
3. Объясняет условия стратификации в водохранилищах и способствует установлению наиболее пригодных слоев забора воды с точки зрения экономической водоподготовки на водопроводных станциях в различные периоды года.
4. Биологический анализ водоёмов даёт основание для объяснения круговорота веществ в воде, их суточных и сезонных изменений и способствует общей оценке физических, химических и бактериологических анализов воды, являясь одновременно их целесообразным дополнением.
5. Определяет причины цветности, мутности и запаха и способствует их устранению.
6. Помогает установить общие трофические свойства воды, общую характеристику водоема, в некоторых случаях специфический химизм и его происхождение.
7. Устанавливает причины возникновения и развития организмов, влияющих на качество воды, разрушающих технические сооружения и причиняющих ряд других неприятностей.
8. Определяет пригодность воды для водоснабжения, лечебных целей и физкультурных мероприятий.

Например, при оценке качества поверхностных вод (степени их загрязнённости), которая хорошо разработана и базируется на представительном пакете нормативных и директивных документов, широкое распространение получили *индикационные критерии оценки* [23]. В последние годы биоиндикация достаточно широко используется и при оценках качества поверхностных вод. Она по функциональному состоянию (поведению) тест-объектов (ракообразные - дафнии, водоросли - хлорелла, рыбы - гуппи) позволяет ранжировать воды по классам состояний (нормы, риска, кризиса и бедствия) и по существу даёт интегральную оценку их качества и определяет возможность использования воды для питьевых целей. Лимитирующим фактором использования метода биотестирования в указанных целях является продолжительный срок проведения анализа (не менее 96 ч) и отсутствие информации о химическом составе воды. Пример использования биотестов для определения качества воды приводится в табл. 1 (по Ю. Я. Кислякову).

Таблица 1

Критерии оценки состояния поверхностных и сточных вод на основе биотестов (по состоянию тест-объектов)

Показатели	Классы состояния поверхностных вод			
	нормы (Н) нормальная степень за- грязнения	риска (Р) (малая сте- пень загряз- нения)	кризиса (К) (средняя сте- пень загряз- нения)	бедствия (Б) (катастрофы)
Ракообразные (дафнии)	< 10	20	40	> 60
Водоросли (хлорелла)	< 10	20	40	> 60
Рыбы (гуппи)	< 10	20	40	> 60

Цифры в таблице:

- для дафний – процент гибели в течение 96 ч экспозиции в тестируемой воде;
- хлорелл – процент уменьшения числа клеток в тестируемой воде по сравнению с контрольной;
- гуппи – процент гибели в течение 96 ч экспозиции в тестируемой воде.

9. Помогает расшифровать сущность процессов, протекающих в сооружениях биохимической очистки сточных вод, способствует также установлению причин недостаточно эффективной работы этих сооружений и помогает в их устранении.
10. По действию ядовитых веществ на индикаторные организмы устанавливают концентрацию, при которой эти вещества не будут отрицательно влиять на жизнь водоема или биохимические очистные сооружения.
11. Биологический анализ даёт возможность выявить поступление в толщу воды новых масс из других источников, их распределение и взаимный обмен (например, поверхностная вода – подземная вода).
12. Биологический метод может внести ценный вклад при изучении вопросов интенсификации рыбного хозяйства.
13. Кроме того, необходимо указать на роль водных организмов как накопителей загрязнений.

Отметим, что в соответствии с п. III «Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды», утверждённых приказом МПР России от 15.06.2001 № 511 «Об утверждении Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды» (не нуждается в государственной регистрации согласно заключению Минюста России от 24.07.2001 № 07/7483-ЮД) отнесение опасных отходов к классу опасности для ОПС возможно экспериментальным методом. Экспериментальный метод основан на биотестировании водной вытяжки отходов. В случае присутствия в составе отхода органических или биогенных веществ, проводится тест на устойчивость к биodeградации для решения вопроса о возможности отнесения отхода к классу меньшей опасности. Устойчивостью отхода к биodeградации является способность отхода или отдельных его компонентов подвергаться разложению под воздействием микроорганизмов. При определении класса опасности отхода для ОПС с помощью метода биотестирования водной вытяжки применяется не менее двух тест-объектов из разных систематических групп (дафнии и инфузории, це-

риодафнии и бактерии или водоросли и т.п.). Таким образом, для биотестирования отходов используются различные гидробионты – водоросли, микроорганизмы, беспозвоночные и рыбы. Наиболее популярные объекты – ювенальные формы (juvenile forms) планктонных ракообразных-фильтров *Daphnia magna* и *Ceriodaphnia affinis*. За окончательный результат принимается класс опасности, выявленный на тест-объекте, проявившем более высокую чувствительность к анализируемому отходу. Для подтверждения отнесения отходов к V классу опасности для ОПС, установленного расчётным методом, определяется воздействие только одной вытяжки отхода без её разведения. Класс опасности устанавливается по кратности разведения водной вытяжки, при которой не выявлено воздействие на гидробионтов в соответствии со следующими диапазонами кратности разведения, приведенными в табл. 2.

Таблица 2

Класс опасности отхода	Кратность разведения водной вытяжки из опасного отхода, при которой вредное воздействие на гидробионтов отсутствует
I	Более 10000
II	От 10000 до 1001
III	От 1000 до 101
IV	От 100 до 1
V	1 и менее

Экспериментальный метод используется в следующих случаях:

- для подтверждения отнесения отходов к V классу опасности, установленного расчётным методом;
- при отнесении к классу опасности отходов, у которых невозможно определить их качественный и количественный состав;
- при уточнении по желанию и за счёт заинтересованной стороны класса опасности отходов, полученного в соответствии с расчётным методом.

В соответствии с требованиями нормативных документов МПР (поскольку в 2001 г. МПР России являлось специально уполномоченным органом в сфере экологически безопасного обращения с отходами) исследования качества природных сред должны проводиться на базе аттестованных лабораторий, обладающих необходимым набором поверенных приборов, реакти-

вов и квалифицированным персоналом. Поэтому если класс опасности отходов установлен экспериментальным путём, то в состав материалов, обосновывающих отнесение отхода к классу опасности для окружающей среды (которые направляются в Управление по технологическому и экологическому надзору для рассмотрения и принятия решения о регистрации отхода в Федеральном классификационном каталоге отходов с соответствующим данному виду отходов кодом), должны входить протоколы биотестирования в лаборатории, аккредитованной на биотестирование водных вытяжек отходов, а также копия аттестата аккредитации такой лаборатории с приложением, в котором указана соответствующая область аккредитации.

Таким образом, спектр задач, решаемых с помощью метода биотестирования уже сейчас достаточно широк, и он всё шире внедряется в природоохранную практику.

6.5. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ МЕТОДА БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Методики биотестирования:

- 1) устанавливают процедуры проведения биотестирования с использованием лабораторных культур гидробионтов - представителей основных трофических звеньев водной экосистемы: бактерий, простейших, водорослей, ракообразных и рыб;
- 2) предназначены для определения острой (в краткосрочных экспериментах) и хронической (в долгосрочных экспериментах) токсичности сточных и природных (пресных и морских) вод, донных отложений, загрязняющих химических веществ (смеси химических веществ). Выбор методики для определения токсичности того или иного объекта тестирования следует производить с учётом поставленной задачи в области охраны и использования водных объектов;
- 3) учитывают требования европейских стандартов и документов международных организаций;
- 4) способы обработки и оценки результатов биотестирования основаны на

стандартных и широко используемых в отечественной и международной практике методах статистической обработки экспериментальных данных;

Авторами методик являются специалисты ведущих научных учреждений как бывшего Советского Союза, так и России: Всесоюзного научно-исследовательского института по охране вод (сейчас Украинский научно-исследовательский институт экологических проблем Минэкоресурсов Украины), Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Гидрохимического института Росгидромета, Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии Госкомрыболовства России, Государственного научно-исследовательского института озерного и речного рыбного хозяйства Росрыбхоза России, Федерального государственного унитарного предприятия комплексного научно-исследовательского и конструкторско-технологического института водоснабжения, канализации, гидротехнических сооружений и инженерной гидрогеологии Госстроя России, Института биологии внутренних вод РАН, бывшего Главного управления аналитического контроля при Минприроды России (ныне ФГУ «Центр экологического контроля и анализа МПР России»), Института экологической токсикологии МПР России, Института гидробиологии АН СССР (сейчас НАН Украины), Института биологии южных морей АН СССР (сейчас НАН Украины), ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН; Красноярского государственного университета и др. [8, 22].

6.6. ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

По чувствительности и степени изученности среди тест-организмов, используемых для биотестирования водных объектов, выделяют дафний (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*), несколько видов микроскопических одноклеточных зелёных водорослей из класса протококковых (*Scenedesmus Scenedesmus quadricauda*, хлорелла *Chlorella* sp.) и пять-шесть видов рыб как аквариумных (гуппи, данио-рерио), так и мелких аборигенных (голец, голь-

ян). Кроме того, для биотестового анализа можно использовать инфузорию туфельку – *Paramecium caudatum*. Каждый из этих объектов имеет свои преимущества и ограничения при использовании, и *ни один из организмов не может служить универсальным "тестером", одинаково чувствительным ко всем ЗВ*. Однако опыт токсикологического нормирования показывает, что при использовании этих видов методом биотестирования может быть охвачено более 80 % подлежащих контролю загрязняющих воду веществ [24].

6.6.1. РАКООБРАЗНЫЕ *DAPHNIA MAGNA*

Во второй половине XX века в связи с необходимостью оценки токсичности природных и сточных вод, а также некоторых химических веществ во многих странах мира стали использовать биотестирование на *Daphnia magna Straus*. Впервые *Daphnia magna* как индикатор токсичности воды была предложена в 1929 г. Позже также стали использовать *Ceriodaphnia a/finis Lilljeborg*, и этот вид, наряду с *Daphnia magna* и *Daphnia pulex*, был введен в руководства по биотестированию во многих странах мира [25].

Морфология (биологические особенности). Дафнии или «водяные блохи» (*Daphnia*) – род ветвистоусых рачков, внешний вид и строение которых представлены на рис. 2 и 3.

Под общим названием «дафнии» фигурирует несколько сот различных видов ветвистоусых рачков, относящихся примерно к 10 семействам. Все они характеризуются двумя парами усиков, ясно выраженной головой с большим сложным глазом, 4 – 6 парами ножек и мешковидным выростом с яйцами на спине. Тело нередко заключено в двустворчатую хитиновую раковину, размер её до 10 мм, чаще 3 – 6 мм. На зиму откладывают покоящиеся яйца – **эфипии**.

Рачок имеет овальное тело, двигается в воде скачками при помощи антенн, развитых несоразмерно с телом. Тело сжато с боков и неявственно сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы. Самцы меньше самок

в 2 – 2,5 раза. Снаружи туловище покрыто прозрачным двустворчатым хитиновым панцирем (раковиной), состоящим из двух слоев и несущим защитную функцию туловища вместе с 5 парами конечностей. Пространство между верхней и верхнебоковой стенками раковины и спиной туловища образуют выводковую камеру, в которой вынашиваются яйца и протекает их эмбриональное развитие [5, 26].

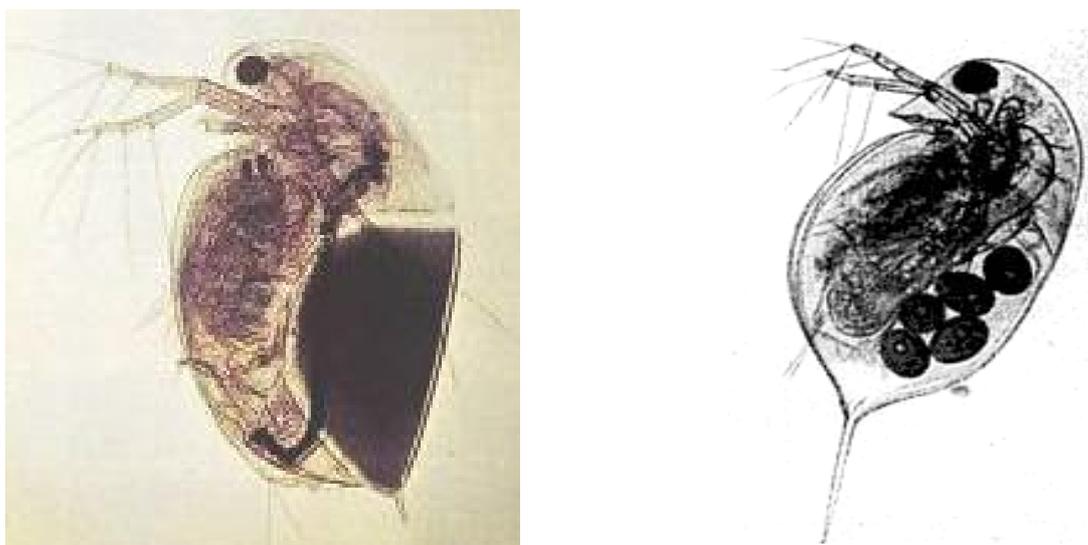
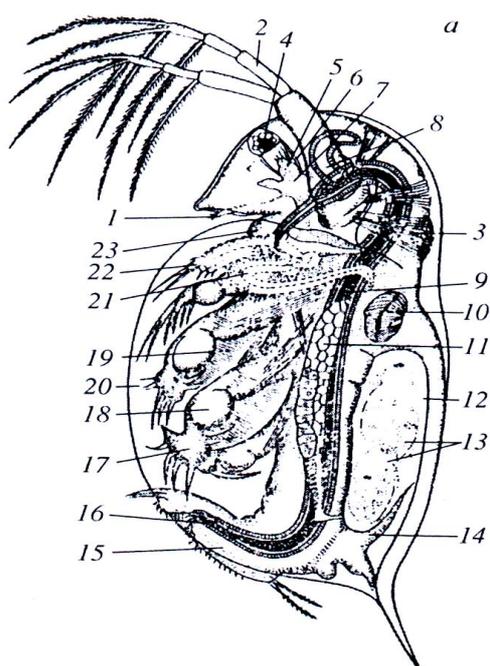


Рис. 2. Внешний вид ветвистоусых рачков дафний



- | | |
|-----------------------------|---|
| 1 – антеннулы; | 15 – постабдомен; |
| 2 – антенны; | 16 – анальное отверстие; |
| 3 – мышцы антенн; | 17 – грудные ножки; |
| 4 – комплексный глаз; | 18 – дыхательные мешочки (жабры); |
| 5 – глазной ганглий; | 19 – фильтрующие щетинки; |
| 6 – мускулатура глаз; | 20 – панцирь; |
| 7 – мозг; | 21 – максиллярная (выделительная) железа; |
| 8 – печеночные выросты; | 22 – первая пара ножек; |
| 9 – кишечник; | 23 – мандибула (челюсть) |
| 10 – сердце; | |
| 11 – яичник; | |
| 12 – зародышевая камера; | |
| 13 – эмбрионы; | |
| 14 – абдоминальные выросты; | |

Рис. 3. Строение самки *Daphnia Magna*

Нахождение в природе. Дафнии широко распространены на территории России в стоячих и слабопроточных водоёмах, особенно в больших ко-

личествах встречаются во временных (лужи, канавы) и непроточных водоёмах (небольшие озера) [27]. Чаще всего в водоёмах встречаются представители рода *Daphnia*. Самый крупный представитель рода дафния magna (*Daphnia magna*) достигает 5 – 6 мм длины, живет она обычно в мелких водоёмах (пруды, ямы, лесные лужи). Более мелкая дафния пулекс (*Daphnia pulex* De Geer) имеет размер 3 – 4 мм и также предпочитает мелкие водоёмы. Очень вариативная дафния лонгиспина (*Daphnia longispina* Muller) живет как в мелких, так и в глубоких водоёмах. Также повсеместно распространены представители родов *Ceriodaphnia* и *Moina*.

Ловля в природе. В природе дафний ловят сачком. Сачок для этого нужен специальный – с длинной рукояткой (до 2 – 3 метров, обычно делается составной из нескольких свинчивающихся отрезков), диаметром порядка 25 – 30 см и тканевым конусом около 50 – 60 см длины с закруглением на конце. Кольцо сачка изготавливается из прочного материала, например, из нержавеющей проволоки диаметром 3 – 5 мм. Если сделать из более тонкой проволоки, то она будет легко гнуться. Ткань для сачка предпочтительнее подбирать из синтетических материалов, которые не гниют от длительного контакта с водой (например, капрон). Сачком действуют спокойно, плавно, без особых усилий вода его “восьмеркой” в местах скопления дафний. Отловленных дафний помещают в ёмкость (для транспортировки) [28].

Затем отловленных дафний переливают в широкий плоский сосуд (желательно белый). В течение некоторого времени все нежелательные организмы оседают на дне и стенках, на белом фоне их легко обнаружить.

Можно добывать дафний в природе, однако некоторые виды (например, *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Moina rectirostris* и др.) возможно вполне успешно разводить и в домашних условиях.

Разведение. Обычно дафнии отлавливаются в теплое время года. Осенью можно в больших количествах собрать эфиппии на поверхности воды и уже из них выводить культуру. Но тут заранее невозможно предугадать, какие именно виды в ней будут преобладать [17].

Оптимальные условия: рН = 7,2 – 8,0, температура 20 – 24 °С, слабая аэрация, свет 14 – 16 ч в день.

В лабораторных условиях дафний подкармливают ежедневно хлореллой (200 тыс. клеток/мл) или пекарскими дрожжами (2 мл суспензии на 1 л воды). Вода должна быть слабо-зеленого или слабо-коричневого цвета. Коричневый цвет воды – показатель неблагоприятных условий, в этом случае кормление необходимо немедленно прекратить. Обычно через день вода снова становится зеленоватой, если этого не происходит, то лучше систему перезапустить.

В качестве корма для дафний можно использовать хлебопекарные дрожжи. Для приготовления дрожжевого корма 1 г свежих или 0,3 г воздушно-сухих дрожжей заливают 100 мл дистиллированной воды. После набухания дрожжи тщательно перемешивают. Образовавшуюся суспензию отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в сосуды с дафниями из расчета 3 мл на 1 л воды. Подкармливание проводят 1 – 2 раза в неделю при средней плотности тест-культуры 20 – 30 половозрелых самок в 1 л воды.

Через несколько месяцев культура дафний начинает истощаться, в таком случае рекомендуется устроить им «зимовку» чтобы стимулировать откладку эфиппиев. Достаточно постепенно снизить интенсивность кормежки, а потом и вовсе перестать подкармливать культуру и немного понизить температуру, чтоб через неделю вся популяция вымерла и образовалась масса эфиппиев. Для лучшей стимуляции эфиппиев можно проморозить их несколько дней в морозилке или подсушить. После такой искусственной паузы культура начинает расти с новой силой.

Питание. Источником питания дафний в природных водоемах являются бактерии, одноклеточные водоросли (хлорелла или сценедесмус), детрит, растворенные органические вещества [17]. Интенсивность потребления корма зависит от его характера, концентрации в среде, температуры, возраста рачков и т.д. Процесс питания дафний непосредственно свя-

зан с движением грудных ножек, направляющих ток воды внутрь панциря.

У дафний между грудными ножками пролегает брюшной желобок. Ритмическое движение ножек, которое можно наблюдать сквозь полупрозрачные стенки раковины, создает в желобке ток воды. Этот ток не только приносит кислород к жабрам, но и доставляет ко рту пищевые частицы (микроскопические водоросли, бактерий, инфузорий и т. п.). Для дафний характерна непрерывная фильтрация потоков частиц и сортировка их пищевыми органами (крупные кусочки удаляются). Чрезмерно высокое содержание кормовых частиц снижает активность питания дафний, и они могут погибнуть вследствие засорения пищевого аппарата. Если кишечник заполняется до отказа пищей, то продолжающаяся фильтрация совершается без захода частиц в рот, которые, пройдя по брюшному желобку, выбрасываются в воду [5, 26].

Процессу питания способствует поддержание на определенном уровне водно-солевого баланса дафний. Полную замену воды в своем организме рачок проводит в течение 2 – 3 мин [17].

Рост дафний в течение всей жизни неравномерный, с возрастом он замедляется и связан с периодическими линьками; первые три – **ювенильные** следуют через 20, 24, 36 ч, четвертая – созревание яиц в яичнике, и пятая – откладывание яиц в выводковую камеру следуют с интервалом 24 – 36 ч [28]. Начиная с шестой, каждая линька сопровождается откладыванием яиц. Растет дафния наиболее интенсивно в первые дни после рождения. При хорошем питании размеры молодых дафний после каждой линьки удваиваются. Выметанная молодь имеет 0,7 – 0,9 мм в длину, к моменту половозрелости самки достигают 2,2 – 2,4 мм, а самцы 2,0 – 2,1 мм.

Окраска дафний зависит от состава потребляемой пищи, содержания гемоглобина в крови и численности животных [28]. При хорошем газовом режиме дафнии имеют розово-желтую окраску, а при дефиците кислорода

краснеют. В теплое время года дафнии выглядят как желтовато-красные пятна, перемещающиеся в воде.

Размножение. В природе в летнее время, а в лаборатории при благоприятных условиях круглый год дафнии размножаются без оплодотворения – **партеногенетически**, причем рождаются в большинстве самки [27]. При резком изменении условий существования (недостаток пищи, перенаселенность, понижение температуры и т. д.) в популяции дафний появляются самцы, и дафнии переходят к половому размножению, откладывая после оплодотворения «зимние яйца» (1 – 2 шт.), которые падают на дно водоёма, где проходят стадию покоя. Такие яйца опускаются на дно, где легко переносят замораживание или высыхание, с пылью они далеко переносятся ветром, благодаря чему мы и имеем дафний во всех постоянных лужах.

Весной, попав в воду, яйца активируются, и из них снова выводятся самки, которые в дальнейшем дают партеногенетические поколения дафний, и в течение нескольких поколений, фактически до осени, размножаются без самцов.

Оптимальные условия созревания рачков – температура 20 ± 2 °С и хорошее питание дафнии в течение 5 – 8 суток. Наступление половозрелости отмечают по моменту выхода яйцеклеток в выводковую камеру. Длительность эмбрионального развития обычно 3 – 4 сут, а при повышении температуры до 25 °С – 46 ч. Вывод молоди идет через каждые 3 – 4 сут. Число яиц в кладке увеличивается от 10 – 15 (в первых пометах) до 30 – 40 и более (у самок среднего возраста), а затем снижается (по мере старения) до 3 – 8. В лабораторных условиях продолжительность жизни дафний 3 – 4 мес. и более. Дафнии легко культивируются в лабораторных условиях в любое время года.

Чувствительность дафний к ядовитым веществам зависит от их возраста, вследствие этого возраст дафний должен отмечаться в описании эксперимента.

Пик численности дафний приходится на весну и лето [27]. В это время они активно питаются различными микроорганизмами: водорослями, бакте-

риями, инфузориями. На этом основан один из старинных способов очистки аквариумной воды при нарушении биологического равновесия – в аквариум с помутневшей водой выпускается большое количество дафний, которые быстро поедают размножившихся бактерий или «зелёную воду». А рыбы, тем временем, активно поедают дафний. Причём дафнией невозможно перекормить рыбу – рыбы поедают дафний постепенно, так что возможно длительное совместное содержание дафний в аквариуме с рыбами.

Отметим, что для гидробиологического анализа качества вод могут быть использованы практически все группы организмов, населяющие водоёмы: планктонные и бентосные беспозвоночные с особой ролью простейших, водоросли, макрофиты, бактерии и грибы. Каждая из них, выступая в роли биологического индикатора, имеет свои преимущества и недостатки, которые и определяют границы её использования при решении задач биотестирования.

Среди животных на клеточном уровне организации наиболее важное индикаторное значение имеют дафнии. Преимущество перед другими группами простейших они имеют потому, что видовой состав и численность их наиболее четко соответствуют каждому уровню сапробности среды, они отличаются высокой чувствительностью к изменениям внешней среды и отчетливо выраженной реакцией на эти изменения, имеют относительно крупные размеры и быстро размножаются [17].

Таким образом, *метод биотестирования* с использованием ветвистоусых рачков рода *Daphnia* очень удобен, так как дафнии широко распространены в природе, легко культивируются, обладают высокой чувствительностью к токсикантам различной природы (*вещества, токсичные для дафний*: бихромат калия, медь, кадмий, ртуть и их комбинированное (аддитивное) воздействие, а также хлор, тяжёлые металлы, пестициды, аммиак, полихлорфенилы). Оценка токсичности проводится по разнообразным тест-функциям: выживаемости, плодовитости, двигательной активности, поведенческим реакциям, а также по качеству потомства. Дафнии довольно

чувствительны к повреждениям, и поэтому для достижения хороших результатов в опыте необходимо, особенно при переносе рачков, соблюдать осторожность.

Большинство методов биотестирования с использованием дафний базируется на регистрации визуально или автоматически гибели рачков под воздействием вредных веществ. Однако еще до гибели действие токсиканта проявляется в изменении поведенческих реакций организмов. Эти реакции можно разделить на функциональные и органические. **Функциональные реакции** проявляются на ранних стадиях отравления и носят обратимый характер, если воздействие токсиканта прекратится. **Органические реакции** свидетельствуют о глубоком отравлении организма и носят необратимый характер.

У дафний наиболее показательной поведенческой реакцией является их двигательная активность. Рачки находятся в постоянном движении, чтобы поддерживать оптимальное положение тела в водной толще, осуществлять функцию дыхания, питания и размножения. На воздействие токсикантов дафнии реагируют либо резким повышением двигательной реакции, хаотическим передвижением в пространстве, быстрым вращением на одном месте, либо замедлением гребных движений, что приводит к скоплению их в придонном слое и в конечном итоге к обездвиживанию.

В России дафниевый тест обязателен при установлении ПДК отдельных веществ в воде рыбохозяйственных водоемов.

Метод определения угнетения подвижности дафний позволяет изучить влияние воды или веществ, растворенных в ней, на жизнедеятельность живых организмов.

Кратковременное биотестирование – до 96 ч позволяет определить острое токсическое действие воды на дафний по их выживаемости. Показателем выживаемости служит среднее количество тест-объектов, выживших в тестируемой воде или в контроле за определенное время. Критерием токсич-

ности является гибель 50 и более процентов дафний за период времени до 96 ч в тестируемой воде по сравнению с контролем.

Более *длительное биотестирование* позволяет определить хроническое токсическое действие воды на дафний по снижению выживаемости и плодовитости. Показателем выживаемости служит количество выживших исходных особей в контроле и тестируемой воде, показателем плодовитости – среднее количество молоди, выметанной в течение биотестирования, в пересчете на одну выжившую исходную самку. Критерием токсичности является гибель 20 % и более дафний или достоверное снижение их плодовитости в тестируемой воде по сравнению с контролем за период до 7 суток [17, 27, 28].

6.6.2. ПРЕСНОВОДНЫЕ РЫБЫ РОЕСИЛЛИА РЕТИКУЛАТА ПЕТЕРС

Внешний вид рыб *Poecilia Reticulata Peters* (гуппи) представлен на рис. 4.



Рис. 4. Внешний вид пресноводных аквариумных рыб ГУППИ

Содержание. Гуппи могут жить при температуре воды в диапазоне от 15 до 36 °С (допустимы только плавные, постепенные повышения и понижения). Однако оптимальной следует считать температуру 22 – 25 °С. Более высокая температура приводит к быстрому созреванию рыб и как следствие к их раннему старению. Гуппи вырастают малорослыми, вуаль недоразвита. Сопrotивляемость к некоторым заболеваниям понижается. При температуре ниже оптимальной (20 – 22 °С) созревание происходит позже, поэтому рыбы вырастают более крупными, а плавники достигают максимальной величины. В «старой» воде с большим содержанием органических отходов у рыб понижается аппетит, ухудшается окраска. Гуппи плавают, сжимая плавники и

«шатаясь», подолгу задерживаются в углу аквариума. Заметив такое поведение, особенно у рыб вуалевых и шарфовых вариаций, в воду желательно добавить соль (лучше грубого помола) из расчёта 2 чайные ложки на 10 л воды или 5 % спиртовой раствор йода в количестве 1 капля на каждые 10 л воды.

Резкие изменения температуры воды и её химических характеристик (главным образом рН) плохо сказываются на гуппи. Самки могут стать бесплодными. У вуалевых самцов происходит сечение краев вуали хвоста или, что значительно хуже, её продольный раскол. Это необходимо учитывать при транспортировке рыб и пересадке из одного аквариума в другой. Аквариум для содержания породистых гуппи должен быть не менее 40 сантиметров в длину и не более 40 сантиметров в высоту. В качестве грунта можно использовать хорошо промытый и прокипяченный крупный речной песок или мелкий гравий темного цвета. Каждые полгода грунт рекомендуется промывать. Иногда грунт в аквариум не помещают, а растения сажают в горшочки. В таких гигиенических аквариумах легче проводить чистку и удалять органические остатки. Воду следует регулярно заменять на свежую такой же температуры, отстоявшуюся в течение 2 – 3 суток. Взрослым рыбам еженедельно надо заменять 1/3 часть объёма воды, а ещё лучше – половину и даже 2/3, но только постепенно, в течение всей недели. При единовременной подмене большого количества свежей воды у вуалевых самцов «лопаются» хвосты. Молодым, с ещё неразвитой вуалью, а также короткохвостым вариациям воду можно заменять так, чтобы за неделю сменился полный объём: три раза по 1/3, а малькам в отдельном аквариуме – ещё чаще. В таких условиях, да ещё и при обильном полноценном кормлении, мальки подрастают очень быстро: уже через две недели после их рождения можно отличить самок от самцов (у самцов анальный плавник вытягивается, туловище утончается). В небольшом 15 – 20 л непродуваемом аквариуме вуалевых самцов можно содержать из расчёта 1 – 1,5 л, а самок – 2-3 л на рыбку. В постоянно аэрируемом сосуде плотность посадки может быть в 2-3 раза выше, а при содержании круглохвостых гуппи – ещё больше. Как и все мелкие рыбы, гуппи лучше всего

смотрятся на фоне мелколистных растений, которых не должно быть слишком много. Иначе перепады рН днём и ночью будут большими, особенно если аквариум не аэрируется круглосуточно. Гуппи лучше содержать в непродуваемом аквариуме. Но иногда это не удается (или аквариум мал, или рыб много), и приходится устраивать аэрацию и фильтрацию воды. Чтобы рыбы не выпрыгивали, сосуд нужно прикрыть стеклом или сделать уровень воды ниже краев аквариума на 5 – 6 см [29].

Размножение и питание. В зависимости от условий содержания гуппи достигают половой зрелости в возрасте 3 – 5 месяцев. Каждые 3 – 6 недель, в течение всего года, самка приносит потомство. Чтобы другие рыбы не съели новорожденных, самку нужно переместить в банку объёмом 1 – 5 л в то время, когда брюшко у нее станет почти прямоугольным, а пятно у анального плавника большим и очень темным. Мальки у гуппи крупные, длиной 5 – 8 мм, и очень подвижные. Сразу после рождения они начинают резво плавать по аквариуму, отыскивая и поедая инфузорий и мелких циклопов. Заранее стоит позаботиться о том, чтобы у мальков в аквариуме были укрытия: камешки и заросли мелколистных растений (в толще воды и на поверхности). Первую неделю мальков кормят 4 раза в сутки маленькими порциями, вторую – три раза и далее, до полутора-двухмесячного возраста – не менее 2 раз.

Гуппи всеядны: поедают мелкий мотыль, коретру и другие живые корма, мелконарезанное или скоблёное говяжье мясо, печень, филе морских рыб, крошки белого хлеба и вареного яичного желтка, слегка разваренную манку. Сухой корм (дафния, гаммарус) – неполноценная пища, его следует применять только как дополнительный. Живую дафнию и мотыль можно замораживать впрок в холодильнике. В зоомагазинах продается комбикорм для аквариумных рыбок, имеющий вид хлопьев и являющийся большим подспорьем при содержании гуппи (особенно при выкармливании мальков). Продолжительность жизни самцов при умеренной температуре воды 2,5 – 3 года, самок – 3,5 – 4 года, но размножаться они прекращают на 1 – 1,5 года раньше [30].

6.6.3. ПРОСТЕЙШИЕ PARAMESCIUM CAUDATUM

Систематическое положение и местообитание. Инфузория туфелька относится к подцарству простейших или одноклеточных животных (Protozoa) к многочисленному (свыше 7 тысяч видов) типу реснитчатых или инфузорий (Ciliophora), к роду *Paramecium*, виду *Paramecium caudatum*.

Инфузория туфелька широко распространена в природе. Живет в пресных водоёмах. По сравнению с другими группами простейших инфузории имеют наиболее сложное строение и отличаются разнообразием и сложностью функций.

Строение, морфология. Инфузория туфелька – это довольно крупный организм эллипсоидной формы с размерами тела $0,2 \times 0,04$ мм (рис. 5).



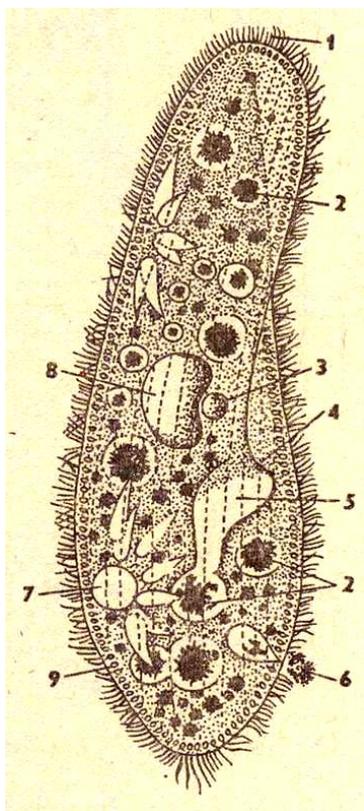
Рис. 5. Внешний вид инфузории туфельки

Строение инфузории *Paramecium caudatum* приведено на рис. 6. Тело парамеции состоит из *протоплазмы*, которая достигает высшей степени дифференцировки. Различают два морфологически и функционально различных слоя: наружный (*эктоплазма*) более светлый, служащий для защиты, ощущения и передвижения и внутренний (*эндоплазма*) более темный и зернистый, заведующий пищеварением и выделением.

Эктоплазма является однородной (гомогенной) или же, состоя из одного ряда ячеек, образует *альвеолярный слой*, ограниченный снаружи *пелликулой*, представляющей продукт изменения эктоплазмы. Эндоплазма заполняет большую часть тела инфузорий, является менее плотной, чем эктоплазма, и имеет ячеистое строение.

Эктоплазма парамеции (*кортекс*) имеет сложное строение – сеть мем-

бран, ресничек, трихоцист. Все тело инфузории равномерно покрыто ресничками, расположенными рядами, их больше 10 тысяч. Они имеют вид тонких, однородных и прозрачных нитей, заостренных к концу и находятся на маленьких возвышениях (*папиллах*) эктоплазмы. Реснички служат для движения. Работают реснички синхронно, совершая волнообразные движения, что обеспечивается плотными цитоплазматическими нитями – *фибриллами* или *мионемами* (плавают тупым концом вперед). При этом реснички служат и для привлечения добычи. Мионемы – это тонкие, гомогенные, сильно преломляющие свет, волнообразно изогнутые нити, залегающие между ячейками эктоплазмы или в особых светлых канальцах, лежащих в альвеолярном слое. Сокращением мионем обуславливается быстрое сокращение тела инфузорий при раздражении.



- 1 – реснички; 2 – пищеварительные вакуоли;
- 3 – микронуклеус (малое ядро); 4 – рот;
- 5 – глотка; 6 – порошица; 7 – сократительная вакуоль (центральный резервуар и приводящие каналы); 8 – макронуклеус (большое ядро);
- 9 – трихоцисты

Рис. 6. Строение инфузории *Paramecium caudatum*

Между ресничками расположены мелкие веретеновидные тельца (*трихоцисты*) органониды защиты и нападения. Трихоцисты располагаются в альвеолярном слое перпендикулярно к поверхности тела и имеют вид ма-

леньких веретенообразных палочек, заостренных на обоих концах; они прозрачны, гомогенны, бесструктурны и довольно сильно преломляют свет. В ответ на механическое, электрическое или химическое раздражение трихоцисты с силой выбрасываются наружу, принимают форму длинных нитевидных палочек и вонзаются в тело жертвы или врага, убивая или парализуя его.

Посередине тела у инфузорий имеется глубокая впадина – ротовое отверстие (*перистом*), покрытая более мощным, чем поверхность тела, слоем ресничек, которые служат для захватывания частичек пищи. Парамеции, как и другие инфузории, имеют два ядра: генеративное (малое) ядро (*микронуклеус*) и вегетативное (большое) ядро (*макронуклеус*). Макронуклеус имеет очень тонкую оболочку и ячеистое строение, состоит из *хроматинного* и *ахроматинного* вещества и включает одно или несколько ядрышек. Микронуклеус имеет тончайшую оболочку и является однородным (гомогенным).

У инфузории имеются вакуоли сократительные и пищеварительные. *Сократительных вакуолей* 2, они служат для поддержания определенного осмотического давления. Кроме дыхательной функции, они заведуют выделением. *Пищеварительные вакуоли* представляют пузырьки воды с захваченной пищей. Количество этих вакуолей зависит от интенсивности питания.

Питание и пищеварение. Основную пищу инфузории туфельки составляют бактерии, водоросли, дрожжи. Ротовое отверстие всегда открыто, околоротовые реснички создают непрерывный ток воды с взвешенными в ней частицами в направлении ротового отверстия. Частицы пищи проникают через рот в небольшую трубковидную глотку и скапливаются на ее дне, на границе с эндоплазмой. Скопившийся на дне глотки комок пищи отрывается от глотки и поступает в эндоплазму, образуя пищеварительную вакуоль, которая совершает в теле инфузории сложный путь – *циклон*, в процессе которого происходит переваривание пищи и всасывание продуктов переваривания в эндоплазму. При обилии пищи и нормальных температурных условиях (15 °C) пищеварительные вакуоли образуются каждые 1 – 2 мин. После переваривания и усвоения пищи цитоплазмой пищеварительная вакуоль, пройдя

по часовой стрелке, подходит к заднему концу тела инфузории, где через специальное отверстие в оболочке – *порошицу* выбрасывает непереваренные остатки пищи наружу. Функцию осморегуляции выполняют 2 *сократительные вакуоли*.

Движение. Инфузория туфелька находится в непрерывном *быстром движении*. Скорость ее при комнатной температуре составляет от 2,0 до 2,5 мм/с. Траектория движения сложная: организм движется вперед и при этом вращается вдоль продольной оси тела. Двигается инфузория туфелька с помощью тончайших волосковидных придатков-ресничек, количество которых достигает 10 – 15 тысяч. Здесь реснитчатый аппарат инфузории представляет собой единое функциональное и физиологическое целое. *Изменение внешних условий (температура, химический состав среды, электромагнитные колебания и другие факторы) воспринимаются клеткой, и первая ответная реакция – изменение характера движения.*

Размножение. Инфузория туфелька размножается бесполом и половым способом (рис. 7).

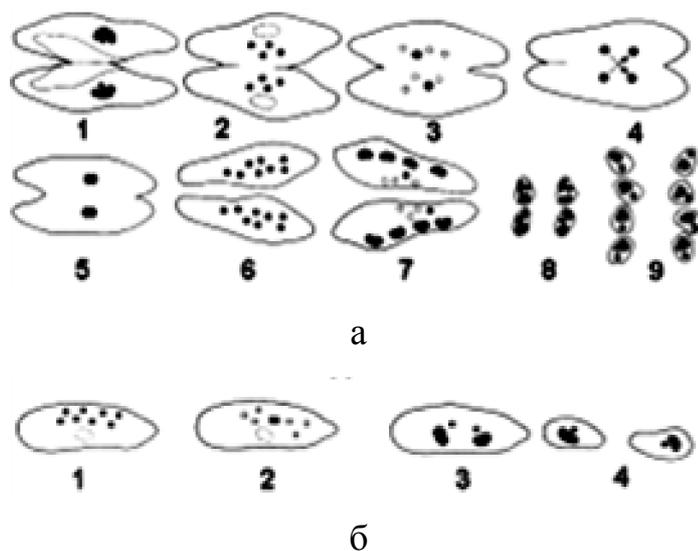


Рис. 7. Половое (а) и бесполое (б) размножение инфузории *Paramecium caudatum*

Бесполое размножение происходит путём поперечного деления клетки. Тело туфельки вытягивается в длину, посередине тела появляется поперечная перетяжка, которая постепенно увеличивается, инфузория туфелька переш-

нуровывается пополам, и из одной материнской особи получается две, несколько меньших размеров. Процесс этот при комнатной температуре занимает около 1 ч и происходит 1 – 2 раза в сутки. Через несколько поколений бесполое размножение сменяется половым, называемым *конъюгацией* или *копуляцией*.

При этом две инфузории соединяются друг с другом околотростовыми областями, в этом месте происходит разрушение *пелликулы*, и образуется цитоплазматический мостик, соединяющий обе инфузории. В теле каждого участника макронуклеус (большое ядро) разрушается, а микронуклеус (малое ядро) делится на 4 части, образуя 4 *гаплоидных ядра*. Вскоре 3 новых ядра разрушаются, а четвертое вновь делится и образует в каждой инфузории одно женское (стационарное, которое остается на месте) и одно мужское ядро. Мужское ядро мигрирует по цитоплазматическому мостику в другую инфузорию, где сливается с женским ядром. После этого инфузории расходятся. Конъюгация продолжается до 12 ч.

Таким образом, при половом процессе происходит обмен ядерным материалом между отдельными особями, которые получают новые признаки и свойства. Вскоре в каждой из них ядро делится на большое и малое. В результате конъюгации из двух особей образуется восемь. При половом размножении происходит объединение в одном организме наследственных свойств 2-х особей, что повышает жизнеспособность организма, которая выражается в лучшей приспособленности к условиям окружающей среды.

Методы выращивания культуры. Инфузория туфелька – хорошо изученная лабораторная культура. Для нее определены *оптимальные режимы выращивания и основные факторы, влияющие на скорость роста*. К таким факторам относятся, в первую очередь, *количество и качество корма, температура, кислородный режим, рН среды, накопление продуктов метаболизма*. Согласно литературным данным [31 – 33] лучшим кормом для *Paramecium caudatum* являются бактерии *Bacillus subtilis*, *Aerobacter aerogenes*, а также смесь бактерий и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Хорошие результаты получены при выращивании инфузории туфельки на *сухих пекарских дрожжах*, лейкоцитарном масле, сухом молоке и других кормах.

Оптимальная температура для выращивания культуры *Paramecium caudatum* составляет 26 – 28 °С, *оптимальный рН* – 6,8 – 7,0. Кроме того, для нормальной жизнедеятельности культуре необходим *кислород*. При выращивании в сосудах с большой поверхностью жидкости, например, в чашках Петри или подобных ёмкостях, достаточно кислорода, поступающего через поверхность жидкости. При увеличении соотношения объема жидкости к ее поверхности ухудшается кислородный режим, культура без аэрации развивается плохо. *На потребность культуры в кислороде влияют также температура выращивания и количество корма.*

В лабораторных условиях разработаны различные методики по выращиванию *Paramecium caudatum*. Можно вести культуру в периодическом режиме, с регулярными пересевами на свежую среду. Также можно культивировать инфузорию туфельку в непрерывном режиме, в специальном аппарате с подачей воздуха, пищи, обогревом. *Наиболее простым является способ периодического выращивания культуры, т.к. он доступен любому лаборанту даже небιологического профиля, не требует специальных микробиологических сред, а следовательно, данную экспресс-методику биотестового анализа можно использовать в любой лаборатории, как научно-исследовательского профиля, так и заводской.*

Получение исходного посевного материала. Исходный материал для культуры *Paramecium caudatum* можно получить в лабораториях, работающих с этим видом, однако, если доставка инфузории туфельки затруднена, можно выделить культуру из местного водоёма. При этом нужно помнить, что видовую принадлежность организма может определить только специалист-протозоолог, т.к. существуют другие представители рода *Paramecium*, морфологически мало отличимые от *Paramecium caudatum*.

7. МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

7.1. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ, ПОДГОТОВКА ПРОБ ВОДЫ

- 1) Пробы воды отбирают в количестве, указанном в соответствующих методиках биотестирования. Для отбора и хранения проб используют стеклянную посуду, которую заполняют под пробку и плотно закрывают;
- 2) пробы, отобранные для биотестирования, не подлежат консервированию химическими веществами или замораживанию;
- 3) биотестирование проб воды проводят не позднее 6 ч после отбора, а при отсутствии такой возможности допускается биотестирование проб воды, которые хранились в темноте в доверху наполненной плотно закрытой посуде при температуре 4 ± 2 °C не более 72 ч;
- 4) перед биотестированием пробы воды перемешивают и фильтруют через фильтровальную бумагу. Если того требует цель биотестирования, пробы воды не фильтруют;
- 5) для определения средней летальной (эффективной) концентрации вещества (смеси веществ) – ЛК₅₀ (ЭК₅₀) готовят серию (не менее пяти) разбавлений пробы воды или серию (не менее пяти) растворов с разными концентрациями исследуемого вещества (смеси веществ) [8, 22].

7.2. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ DAPHNIA MAGNA [8, 22]

Назначение и область применения

Методика устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), водных растворов отдельных веществ и их смесей.

Принцип метода

Методика основана на установлении различия между количеством погибших дафний в анализируемой пробе (опыт) и культивационной воде (контроль).

Критерием острой летальной токсичности является гибель 50 % дафний и более в опыте за 96 ч биотестирования.

Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью $P = 0,95$, составляют $\pm 66 \%$.

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения (СКО) случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике $\sigma(\delta)$ составляет 34% .

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества – калия дихромовоокислого ($K_2Cr_2O_7$). Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в приложении 2.

Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- микрокомпрессор аквариумный АЭН ТУ 16-064-011;
- лупа складная ГОСТ 7954, ТУ 3-3-227;
- груши резиновые разные ТУ 38-106-003;
- весы лабораторные по ГОСТ 24104, 2 класса точности, с наибольшей предельной нагрузкой 200 г;
- воронки разные лабораторные ГОСТ 25 336;
- бюксы или стаканчики для взвешивания, диаметром 30, 40 мм ГОСТ 7148;
- термометр по ГОСТ 112 с ценой деления шкалы $1^\circ C$;
- рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;
- колбы мерные по ГОСТ 1770, вместимостью 0,5 и 1,0 $дм^3$ по ГОСТ 1770, 2 класса точности;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 $см^3$ по ГОСТ 29227, 2 класса точности;
- посуду стеклянную: вместимостью 2 $дм^3$ для культивирования дафний; вместимостью от 100 до 150 $см^3$ для биотестирования; вместимостью 1 $дм^3$ для транспортирования и хранения проб воды;

- пробирки стеклянные, вместимостью 10 см³ ГОСТ 25336;
- трубки стеклянные внутренним диаметром 5 – 7 мм для отлова дафний;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм³ по ГОСТ 1770, 2 класса точности;
- дрожжи хлебопекарные по ГОСТ 171;
- бихромат калия (калий двуххромовоокислый) по ГОСТ 4220.

Условия выполнения биотестирования

1. Биотестирование проводят в помещении, где не хранят и не работают с летучими веществами, не используют обработку помещения инсектицидами.

2. Объем пробы воды для определения острой летальной токсичности должен быть не менее 1 дм³.

3. Температура анализируемой пробы при биотестировании должна быть (20 ± 2) °С, концентрация кислорода в пробе в начале биотестирования – не менее 6 мг/дм³. Если его концентрация ниже 6 мг/дм³, пробу аэрируют микрокомпрессором. Воздух должен подаваться равномерно до достижения концентрации кислорода 6 мг/дм³. Во время биотестирования пробу не аэрируют.

Биотестирование проводят при рассеянном свете. Не допускается попадание прямых солнечных лучей на тест-объект. Длительность светового периода соответствует естественному. Рекомендуется использовать термолюминостаг.

4. Плотность посадки односуточных дафний в опыте и контроле должна составлять 10 экземпляров на 100 см³. Повторность трёхкратная.

5. Результаты учитывают, если температура воды составляла (20 ± 2) °С, количество погибших дафний в контроле не превышало 10 %, ЛТ₅₀ за 24 ч эталонного вещества К₂Сг₂О₇ для культуры дафний находилось в диапазоне времени до 24 ч.

Подготовка к выполнению биотестирования

1. В качестве тест-объекта используют лабораторную культуру дафний – *Daphnia magna*.

Условия культивирования (и биотестирования) дафний соответствуют

п. «Условия выполнения биотестирования».

Культуру дафний выращивают в стеклянной посуде вместимостью до 2 дм³. Посуду моют питьевой содой и тщательно ополаскивают дистиллированной водой. Нельзя применять синтетические моющие средства и органические растворители.

Для культивирования дафний используют питьевую воду. Питьевую воду предварительно дехлорируют путем кипячения и отстаивания в течение 2 суток, а также аэрируют микрокомпрессором до достижения концентрации растворенного кислорода не менее 6 мг/дм³.

Начальная плотность культуры дафний должна быть от 10 до 15 особей в 1 дм³. Один раз в неделю взрослых дафний в возрасте до 4 недель и молодь (для дальнейшего поддержания культуры) пересаживают отдельно в посуду со свежей водой.

Пересаживают дафний при помощи стеклянной трубки внутренним диаметром 5 – 7 мм так, чтобы их не травмировать. Для этого конец трубки помещают под поверхность воды и держат до тех пор, пока дафнии не перейдут в трубку. Аэрировать воду в посуде с дафниями не рекомендуется.

Дафний кормят один раз в сутки суспензией зеленых водорослей и один раз в неделю – суспензией хлебопекарных дрожжей.

Для приготовления дрожжевого корма 1 г свежих или 0,5 г воздушно-сухих дрожжей заливают 100 см³ дистиллированной воды. После набухания дрожжей суспензию тщательно перемешивают и отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в посуду с дафниями в количестве 5 см³ на 1 дм³ воды.

В качестве водорослевого корма для дафний рекомендуется использовать зеленые протококковые водоросли – сценедесмус или хлореллу. Водоросли вносят в культуру дафний из расчета 1 см³ суспензии водорослей (плотность клеток составляет примерно 350 млн. клеток/см³). Суспензию водорослей получают центрифугированием или отстаиванием в холодильнике в течение 2 – 3 суток. Надосадочную жидкость сливают, а осадок разбавляют в 2 раза дистиллированной водой и используют в качестве корма.

2. Для биотестирования используют дафний в возрасте до 24 ч, кото-

рых кормят за 2 – 3 ч до начала биотестирования. Чтобы получить необходимое количество тест-объектов для биотестирования, 20 – 30 самок дафний с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей, за одни сутки до биотестирования пересаживают в стеклянную посуду емкостью от 0,5 до 1,0 дм³ с водой для культивирования и вносят корм. После появления молоди (каждая самка может выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослых особей удаляют.

3. Культуру односуточных дафний проверяют на пригодность к биотестированию. С этой целью устанавливают среднее значение величины летального времени (ЛТ₅₀) для тест-организмов, находящихся в растворе эталонного вещества – K₂Cr₂O₇ (стандартный токсикант, который продолжительное время сохраняет первоначально внесённую концентрацию, стабилен в растворах и относится к классу сильнотоксичных веществ) с концентрацией 0,9 – 2,5 мг/дм³. Значение ЛТ₅₀ в этих условиях должно находиться на уровне до 24 ч.

Для этого готовят исходный раствор K₂Cr₂O₇ с концентрацией 1 г/дм³, используют дистиллированную воду. Далее, разбавляя исходный раствор культивационной водой, готовят серию растворов с концентрациями 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мг/дм³. Контролем служит культивационная вода. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 24 ч в соответствии с процедурой, изложенной в п. «Выполнение биотестирования». Полученные результаты заносят в табл. 3 и строят график зависимости «% погибших дафний – время». По графику находят ЛТ₅₀ бихромата калия.

Пример представления и обработки полученных результатов биотестирования на дафниях

Таблица 3

Калибровка чувствительности тест-объекта (*Daphnia Magna*) на стандартном токсиканте K₂Cr₂O₇ с концентрацией n мг/дм³

Время, ч		0	1	5	6	9	11	14	16	18	20	22	24
Количество выживших дафний, шт.	проба № 1	10	7	6	6	5	5	4	3	2	2	0	0
	проба № 2	10	8	6	6	5	3	3	1	1	1	1	0
	проба № 3	10	8	6	5	5	4	4	2	2	0	0	0
Среднее количество выживших дафний, шт.		10	8	6	6	5	4	4	2	2	2	1	0
Количество погибших дафний, %		0	20	40	40	50	60	60	80	80	80	90	100

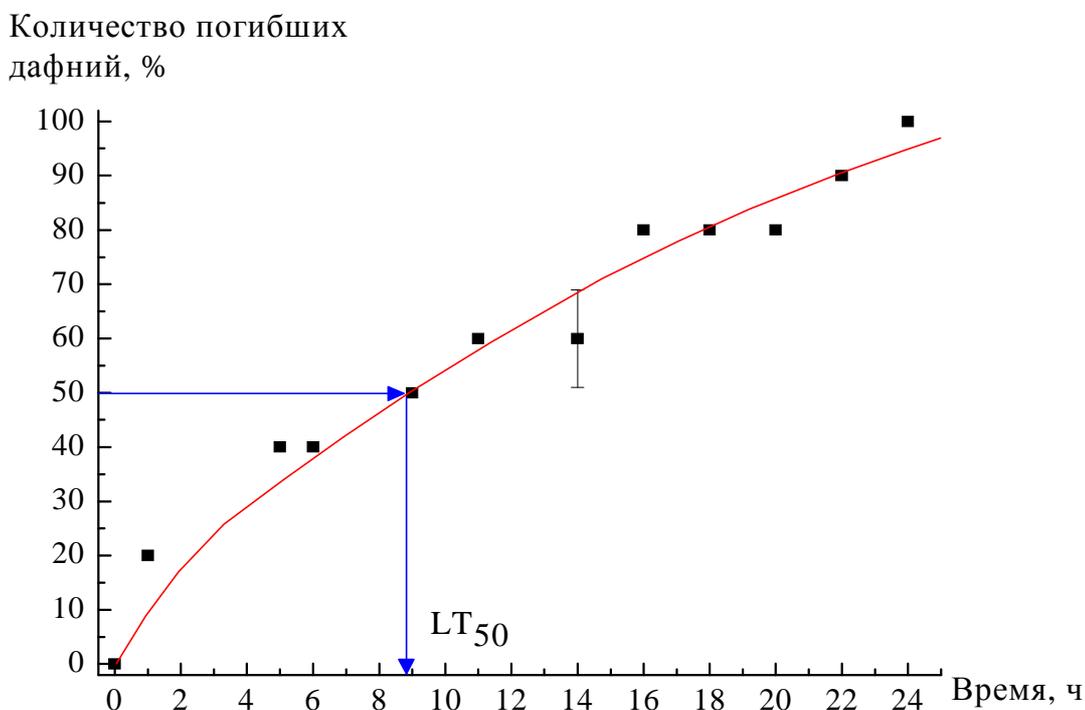


Рис. 8. Зависимость количества погибших дафний от времени при биотестировании на $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией n мг/дм³

Если LT_{50} находится в диапазоне реагирования тест-объекта до 24 ч, то делают вывод о пригодности культуры дафний для биотестирования.

Если LT_{50} не находится в указанном диапазоне реагирования, проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры. При необходимости культуру заменяют на новую.

Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

1. Пробу воды наливают в стеклянные сосуды по 100 см³ (опыт). Другие сосуды наполняют таким же объемом отфильтрованной воды из емкостей, где культивируются дафнии (контроль). Повторность в опыте и контроле трёхкратная.

2. В каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 дафний в возрасте до 24 ч. Их быстро переносят стеклянной трубкой диаметром 5 – 7 мм, погрузив ее в воду.

3. Продолжительность биотестирования составляет 96 ч. Во время биотестирования дафний не кормят.

4. В течение 1, 6, 24, 48, 72, 96 ч биотестирования визуально подсчитывают количество живых дафний. Живыми считают дафний, которые свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позже, чем через 15 с после его легкого встряхивания. Остальных дафний считают погибшими.

Длительное биотестирование позволяет определить хроническое токсическое действие воды на дафний по снижению выживаемости и плодовитости. Критерием токсичности является гибель ≥ 20 % дафний или достоверное снижение их плодовитости в тестируемой воде по сравнению с контролем за период до 7 суток. Полученные результаты заносят в таблицу и строят график зависимости «% погибших дафний – время».

Результаты биотестирования считаются достоверными, если гибель дафний в контроле за весь период наблюдений не превышает 10 %.

Обработка и оценка результатов

1. На основании результатов трех параллельных определений количества выживших дафний в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых дафний в контроле (опыте) по формуле:

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)i}}{I},$$

где $X_{k(on)i}$ – результат i -го измерения количества живых дафний в контроле (опыте);

i – номер измерения количества живых дафний в контроле (опыте); $i=1, \dots, I$;

I – количество параллельных измерений количества живых дафний в контроле (опыте); $I = 3$.

Экспериментально определяют значение среднего летального времени (LT_{50}) – периода, в течение которого в анализируемой пробе погибает 50 % особей.

Рассчитывают количество погибших дафний в опыте по отношению к контролю по формуле, %:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} 100 .$$

2. Если в течение 96 ч гибнет более 50 % тест-организмов (LT_{50} меньше 96 ч), то считают, что исследуемая проба оказывает острое токсическое действие на дафнии; если менее 50 % (LT_{50} больше 96 ч), то делают вывод об отсутствии острого токсического действия исследуемой пробы на тест-организмы. Соответственно, если в течение 7 суток погибает ≥ 20 % тест-объектов, считают, что исследуемая проба оказывает хроническое токсическое действие; если < 20 %, то делают вывод об отсутствии хронической интоксикации. Чем меньше LT_{50} , тем токсичнее исследуемая вода.

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5 % от количества текущих измерений, а также по результатам двух определений токсичности анализируемых проб воды, полученных в условиях воспроизводимости (LP_1 , LP_2 или LK_1 , LK_2).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии, %:

$$\frac{2|LP_1 - LP_2|}{LP_1 + LP_2} 100 \leq D,$$

где LP – среднее летальное разбавление пробы воды;

D – норматив оперативного контроля воспроизводимости, который составляет 94 %.

7.3. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ ПРЕСНОВОДНЫХ АКВАРИУМНЫХ РЫБ ROESILLIA RETICULATA PETERS (ГУППИ) [8]

Назначение и область применения

Настоящая методика устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), буровых растворов, водных растворов отдельных веществ и их смесей.

Применение методики

Методика основана на установлении различия между количеством погибших рыб в анализируемой пробе (опыт) и воде, которая не содержит ток-

сических веществ (контроль).

Критерием острой летальной токсичности является гибель 50 % рыб и более в опыте по сравнению с контролем за 96 ч биотестирования.

Характеристика и погрешность измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью $P = 0,95$ составляют ± 42 %.

Наибольшее возможное значение СКО случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике $\sigma(\delta)$ составляет 21 %.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества – бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$). Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в прил. 2.

Средства измерения, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы:

- аквариумы емкостью 50 и 200 дм³;
- микрокомпрессор аквариумный АЭН ТУ 16-064,011;
- рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;
- приспособление для термостатирования;
- весы лабораторные по ГОСТ 24104;
- термометр по ГОСТ 112 с ценой деления шкалы 1°С;
- холодильник, поддерживающий температуру (4 ± 2) °С;
- колбы мерные по ГОСТ 1770, вместимостью 0,5 и 1,0 дм³ по ГОСТ 1770;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см³ по ГОСТ 29227;
- посуду для транспортирования и хранения проб воды вместимостью 5 дм³;
- сачок для отлова рыб;

- стеклянную палочку;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм³ по ГОСТ 1770;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- воду питьевую по ГОСТ 2874;
- бихромат калия по ГОСТ 4220.

Установление условий биотестирования

1. Биотестирование проводят в помещении, где не хранят и не работают с химическими веществами, не используют обработку инсектицидами. Используют рассеянный свет, естественный световой период.

2. Объем пробы воды (водной вытяжки), буровых растворов, водных растворов отдельных веществ и их смесей для определения острой летальной токсичности должен быть не менее 30 дм³.

3. Температура анализируемой пробы должна быть $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, концентрация растворенного кислорода не менее 4 мг/дм³, если она меньше, то пробу аэрируют микрокомпрессором. Воздух должен подаваться равномерно.

4. Плотность посадки гуппи в возрасте 24 – 48 ч в опыте и контроле должна быть 10 экземпляров рыб на 5 дм³. Повторность трехкратная.

5. Результаты учитывают, если при биотестировании концентрация растворенного кислорода была не менее 4 мг/дм³, температура составляла $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, количество погибших рыб в контрольной пробе не превышало 10 %, ЛК₅₀ за 24 ч для K₂Cr₂O₇ находилась в диапазоне 106 – 175 мг/дм³.

Подготовка к выполнению биотестирования

1. В качестве тест-объектов используют мальков гуппи в возрасте не более 2 суток (от 24 до 48 ч).

Для получения тест-объектов выбирают рыб не старше 2 лет (продолжительность жизни гуппи 3 – 3,5 года), без каких-либо признаков заболевания.

Отобранных самцов и самок рекомендуется содержать в отдельных аквариумах. При совместном содержании самцы растут медленнее и имеют меньшие размеры. Половозрелые гуппи имеют четко развитые половые признаки, что облегчает их сортировку. Самцы, как правило, мельче (3 – 4 см) и

имеют более яркую окраску, чем самки. У них преобладают серовато-коричневые тона с очень яркими красными, голубыми зелёными и черными пятнами. Самки больше самцов, до 6 см в длину, чаще желто-зеленые. Анальный плавник у самок округлый. У молодых самцов он имеет ту же форму, но со временем, в период полового созревания, он начинает удлиняться и превращается в подвижный гоноподий.

Для содержания производителей пригодны любые термостатируемые аквариумы, которые обеспечивают температуру воды $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Плотность посадки самцов 1 – 2 дм³ воды на экземпляр, самок – не менее 4 дм³. Перед размещением рыб аквариумы засаживают растениями без жестких, режущих кромок. Предпочтение следует отдать густым мелколистным и, обязательно, плавающим растениям (риччия, сальвиния). В аквариуме должно быть свободное пространство для плавания.

Аквариумы освещают верхним светом не менее 8 ч в сутки. В качестве источника света используют обычные лампы дневного света.

Для содержания производителей используют питьевую воду, которую отстаивают в течение 7 суток. Воду аэрируют, фильтруют и термостатируют $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Содержание растворенного в воде кислорода должно быть не менее 4 мг/дм³. Один раз в месяц 1/3 часть воды меняют на свежую. Добавление воды должно быть той же температуры, что и в аквариуме. Вместо испарившейся воды добавляют дистиллированную воду.

Кормят производителей гуппи 3 – 5 раз в день живым кормом. Корм дается в таком количестве, чтобы рыбы съедали все без остатка за 3 – 5 мин.

Для получения тест-объектов самок и самцов помещают в один аквариум для совместного содержания. Гуппи относятся к рыбам с внутренним развитием икры, способными к нересту полностью сформившихся мальков. Готовность самок к нересту определяется наличием хорошо заметного темного пятна перед анальным плавником. При этом форма брюшка приближается к прямоугольной, и оно становится намного шире спины.

Самку, готовую к нересту, помещают в отдельную нерестовую посудину, вместимость не менее 4 дм³ с большим количеством мелколистных рас-

тений. Нерестовые посудины наполняют водой такого же качества, как и для содержания производителей, и термостатируют при температуре $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Самок после нереста удаляют, т.к. они поедают мальков.

Мальков рекомендуется кормить «пылью», состоящей из инфузорий, эвглен, коловраток, молоди ветвистоусых рачков и науплиусов веслоногих рачков. При отсутствии «пыли» молодь гуппи можно кормить перетертой сухой дафнией или каким-либо другим сухим кормом. На 100 рыб его необходимо не более 1 г в сутки. По мере того, как растут рыбы, в их рацион вводят резаный трубочник, мотыль, коретру и другие живые корма. Одно-, двух-дневных мальков кормят по 5 раз в день, более взрослых – 2 – 3 раза.

Мальков сортируют, чтобы избежать неравномерности развития, и постепенно переводят из нерестовых посудин в аквариумы вместимостью 50 дм³, а далее 200 дм³. Аквариумы заполняют водой такого же качества, как и для производителей гуппи.

2. Тест-организмы (возрастом 1 – 2 суток) перед серией экспериментов проверяют на пригодность для биотестирования.

Для определения пригодности рыб для биотестирования устанавливают среднюю летальную концентрацию раствора эталонного вещества – $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ за 24 ч биотестирования (ЛК_{50} за 24 ч). Для этого готовят известный раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ концентрацией 10 г/дм³, используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ от 100 до 200 мг/дм³ с интервалом 25 мг/дм³, используя культивационную воду. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 24 ч в соответствии с процедурой, изложенной в п. «Выполнение биотестирования». Полученные результаты заносят в таблицу и строят график зависимости «% погибших рыб – время». По графику находят ЛТ_{50} для $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (см. *Пример представления и обработки полученных результатов биотестирования на дафниях*).

На основании полученных результатов рассчитывают ЛК_{50} за 24 ч для $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Если полученная величина ЛК_{50} для $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ за 24 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объектов 106

– 175 мг/дм³, гуппи пригодны для биотестирования. Если ЛК₅₀ за 24 ч для К₂Cr₂O₇ не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры.

Выполнение биотестирования

При выполнении биотестирования проводят следующие операции.

1. Разбавленная проба воды (водной вытяжки), буровых растворов и растворы с различными концентрациями вещества (смеси веществ) готовят прибавлением определённого объёма анализируемой пробы в дехлорированную питьевую воду.

2. Приготовленные пробы воды (водной вытяжки), буровых растворов и растворы с различными концентрациями вещества (смеси веществ) наливают в сосуды по 5 дм³ (опыт). Другие сосуды наполняют таким же образом дехлорированной питьевой водой (контроль). Повторность в опыте и контроле трёхкратная.

3. В каждый из опытных и контрольных сосудов помещают по 10 экземпляров гуппи в возрасте от 24 до 48 ч.

4. Продолжительность биотестирования составляет 96 ч. Во время биотестирования рыб не кормят.

5. Ежедневно подсчитывается количество живых рыб и удаляются погибшие особи. Погибшими считают рыб, которые не подают признаков движения и дыхания при прикосновении к ним стеклянной палочкой.

Обработка и оценка результатов. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Обработка и оценка полученных результатов биотестирования на тест-организмах *Poecilia Reticulata* Peters проводится, так же как для тест-объектов *Daphnia Magna* (см. п. 9.2), при этом норматив оперативного контроля воспроизводимости (Д) составляет 58 % [8].

7.4. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ PARAMECIUM CAUDATUM [31 – 33]

Назначение и область применения

Метод биотестового анализа основан на способности инфузорий избегать неблагоприятных и опасных для жизнедеятельности зон и активно перемещаться по градиентам концентраций химических веществ в благоприятные зоны. Метод позволяет оперативно определять острую токсичность водных проб и предназначен для контроля токсичности природных, сточных, питьевых вод, водных вытяжек из различных материалов и пищевых продуктов.

Характеристика тест-реакции

Способность инфузории туфельки воспринимать изменение разнообразных факторов среды и отвечать на них реакцией изменения подвижности, реакцией избегания обеспечивает организму большую вероятность выживания: организм может покинуть неблагоприятную зону или, наоборот, концентрироваться в зонах, благоприятных для жизни, например, в зонах скопления пищи. Направленное активное перемещение и концентрация организмов в определенных зонах носит название *таксисов*. Инфузория туфелька проявляет разнообразные таксисы: гео-, магнито-, гальвано-, *хемотаксис*. Последний *происходит под действием химических веществ*.

Количество клеток инфузории туфельки, переместившихся вдоль градиента концентрации химических веществ (хемотаксис), зависит как от природы вещества, так и от его концентрации, поэтому хемотаксис может служить количественной характеристикой степени воздействия неблагоприятных факторов на тест-объект, т.е. быть тест-реакцией. Хемотаксическая реакция относится к поведенческим реакциям, которые более чувствительны и быстры, чем реакции биохимические и физиологические. Поэтому хемотаксис инфузории туфельки к токсикантам может быть использован в биотестовом экспресс-анализе.

Восприятие химических веществ происходит у инфузории на рецепторном уровне, чем и объясняется высокая чувствительность и быстрота от-

вета на воздействие токсиканта. Кроме того, структура рецепторов реснитчатых организмов (в том числе инфузорий) идентична хеморецепторным структурам высших организмов, поэтому данная совокупность: тест-объект (инфузория туфелька) – тест-реакция (хемотаксис) хорошо моделирует воздействие загрязнителей на высшие организмы.

Хемотаксис как тест-реакция реализуется только при условии стабильного и воспроизводимого градиента концентрации химических веществ.

Принцип метода биотестового анализа

Градиент концентрации химических веществ создают, используя поливиниловый спирт для увеличения плотности взвеси клеток тест-объекта. Для этого в фотометрическую кювету помещают взвесь клеток инфузории туфельки, добавляют раствор поливинилового спирта и на более плотный слой жидкости с тест-объектом наслаивают исследуемую пробу. Граница между слоями жидкости сохраняется практически неограниченное время и не препятствует свободному перемещению клеток организма из нижнего слоя в верхний и наоборот.

При этом *хемотаксические реакции протекают так: в нетоксичную пробу клетки тест-объекта выходят практически полностью, с увеличением токсичности пробы количество клеток в пробе уменьшается*. Величину тест-реакции измеряют по количеству клеток в верхней зоне кюветы.

Средства измерения, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

- Дрожжи пищевые сухие. Хранить в закрытой емкости в течение нескольких месяцев;

- среда Лозина-Лозинского (Л-Л) следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaCl – 0,1; KCl – 0,01; MgSO₄ – 0,01; CaCl₂ – 0,01; NaHCO₃ – 0,02. Реактивы марки ч.д.а. Среда может стоять в течение суток. Концентрат среды (10-ти кратный) можно хранить до недели. Среду использовать для выращивания культуры, для разведения взвеси микроорганизмов, анализируемых проб;

- поливиниловый спирт (ПВС). Исходный продукт порошкообразный. Рабочий раствор ПВС – 5 % готовят следующим образом: навеску 0,5 г ПВС и 9,5 мл среды Л-Л кипятят на водяной бане до растворения порошка. Используют раствор в течение суток;

- 1 % раствор красителя эозина в дистиллированной воде. Можно хранить практически неограниченное время в герметично закрытой емкости;

- смесь 5 % раствора ПВС и 1 % раствора эозина в объемных отношениях компонентов 10:1.32. Готовят непосредственно перед анализом;

- 4 % раствор формалина;

- химическая посуда: чашки Петри (или другие емкости для выращивания культуры), пипетки на 1, 5, 10 мл, колбы мерные вместимостью 100, 200, 500 мл, химические стаканы, пробирки;

- приборы:

1) «Биотестер» с набором фотометрических кювет, позволяющий измерять концентрацию *живых движущихся клеток* микроорганизмов (инфузории туфельки) при перемещении их из одной исследуемой среды (токсичной) в другую (нетоксичную). Особенность данной измерительной системы состоит в том, что *прибор измеряет только подвижные микроорганизмы*. Такая способность дает возможность определить концентрацию клеток, которые практически невидимы на других оптических средствах измерения;

2) дистиллятор;

3) бинокулярный микроскоп (оптимальное увеличение для микроскопии *Paramecium caudatum* 15 – 30 раз);

4) весы до 500 – 1000 мг с ценой деления до 1 мг.

Подготовка к выполнению биотестирования

Выращивание. Для проведения биотестового анализа возможны различные варианты выращивания культуры *Paramecium caudatum*, но для получения воспроизводимых результатов необходимо использовать тест-объект в определенной стадии развития.

Развитие популяции инфузорий в ограниченном объеме происходит по

общим для микроорганизмов закономерностям. На кривой роста микроорганизмов можно выделить следующие фазы (рис. 7): 1) латентную фазу, в течение которой микроорганизмы акклиматизируются в питательной среде путем модификации ферментативной системы; 2) фазу роста с постоянной скоростью (экспоненциальная фаза); 3) фазу замедления скорости роста; 4) фазу стационарного равновесия между погибшими и образующимися клетками; 5) фазу отмирания; 6) фазу уменьшения скорости отмирания, т.е. оставшиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

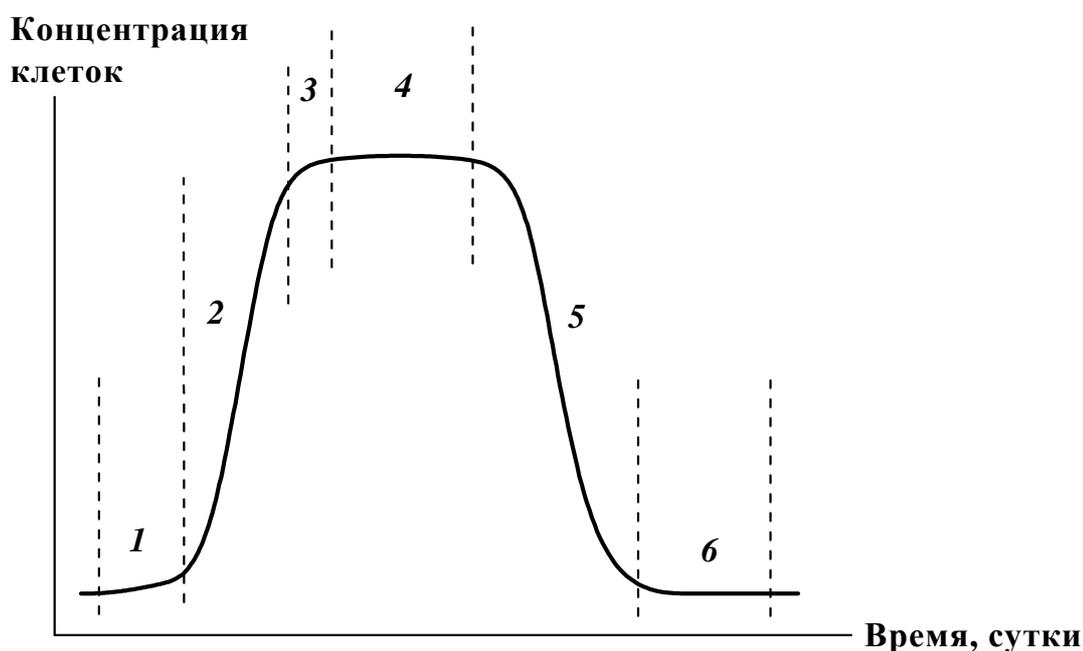


Рис. 9. Кривая роста микроорганизмов: 1 – латентная фаза (лаг-фаза); 2 – фаза роста с постоянной скоростью (экспоненциальная фаза); 3 – фаза замедления скорости роста; 4 – фаза стационарного равновесия; 5 – фаза отмирания; 6 – фаза уменьшения скорости отмирания

Для биотестового анализа используют культуру в начале стационарной фазы равновесия (рис. 9, фаза 4). Культуру выращивают в чашках Петри. В чашку вносят 40 мл среды Л-Л, 40 мг сухих пекарских дрожжей и посевной материал, обеспечивающий плотность посева 200 клеток/мл. Количество засеваемых чашек определяется числом проводимых анализов. Контроль за ростом концентрации клеток ведут ежедневно и для данных условий культивирования определяют начальную стадию стационарной фазы равновесия по формуле:

$$M = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1},$$

где M – удельная скорость роста, ч^{-1} ;

N_1, N_2 – концентрация (число) клеток, клеток/мл;

t_1, t_2 – время наблюдения, ч.

Начальную стадию стационарной фазы равновесия характеризует величина μ , близкая к 0.

При данных условиях культивирования *стационарная фаза наступает на 2 – 3 сутки при достижении плотности культуры 500 – 1000 клеток/мл.*

Если условия становятся неблагоприятными, скорость роста снижается. Причинами для замедления или прекращения роста являются снижение концентрации субстрата (питания), накопление токсичных продуктов обмена или изменение условий окружающей среды. Если в процессе выращивания культуры температура не является величиной постоянной (комнатная температура), то нужно определять стационарную фазу равновесия в каждом эксперименте. Теоретически при строгом соблюдении всех параметров, влияющих на скорость роста (количество и качество корма, температура, рН, кислородный режим и т.п.), кривая роста определяется один раз и используется в дальнейших экспериментах, но практически трудно обеспечить все условия выращивания постоянными, поэтому фазы роста и равновесия культуры определяют регулярно.

Примечание. Данная методика выращивания обеспечивает получение культуры в любой лаборатории, в т.ч. небиологического профиля. Использование чашек Петри обеспечивает достаточную микробиологическую чистоту, а главное – хороший кислородный режим для культуры, хотя определенные трудности существуют при перемешивании культуры при взятии пробы для определения концентрации клеток. Вместо чашек Петри можно использовать колбы, химические стаканы и другую химическую посуду, главное требование при этом – не заполнять емкость на большую высоту (кислородный режим при большом столбе жидкости плохой).

Необходимо помнить, что *начальная плотность посева существенно влияет как на лаг-фазу, так и на длительность логарифмической фазы роста, поэтому при изменении плотности посева время выхода на стационарную фазу меняется.*

Кроме среды Л-Л, для посева можно использовать водопроводную воду после длительного отстаивания и проверки на пригодность для выращивания культуры (по выживаемости и скорости роста).

Подготовка выросшей культуры к анализу. Тест-объект перед использованием для биотестирования нужно отмыть от продуктов метаболизма и приготовить рабочую концентрацию взвеси клеток инфузории туфельки.

Для этого сливают выращенную для анализа культуру в мерную посуду, например, химический стакан, добавляют свежую среду Л-Л, приблизительно равную по объему культуре или больше, так, чтобы общий объем составил количество, равное объему мерной колбы (например, 500, 1000 мл). При отсутствии колб больших объемов можно использовать несколько колб меньших размеров или пользоваться пробирками. Затем необходимо тщательно перемешать тест-культуру со средой и перелить в мерную (мерные) колбу, обязательно заполняя горлышко. Через 5 – 15 мин клетки *Paramecium caudatum* соберутся в верхней зоне горлышка колбы. После этого нужно слить верхний слой жидкости с концентратом клеток. Если в колбе осталось много клеток, то процедуру можно повторить: добавить еще порцию свежей среды Л-Л, все интенсивно перемешать и снова вылить в мерную колбу. Затем собравшихся в горлышко колбы инфузорий слить к первой собранной порции. *Взвесь клеток инфузорий должна визуально выглядеть как прозрачный раствор, в котором плавают парамеции.* Если взвесь клеток выглядит визуально мутной (но не из-за инфузорий), необходимо провести операцию отмывания еще раз.

Взвесь клеток доводят до рабочей концентрации 500 – 1000 клеток/мл и проверяют готовность тест-объекта к анализу постановкой контрольной пробы на хемотаксис. При выходе клеток в верхнюю зону кюветы на 90 – 100 % считают, что тест-объект готов к постановке серии анализов.

Возможные причины плохой концентрации клеток в верхней зоне колбы и их устранение

После разбавления тест-культуры средой Л-Л и интенсивного перемешивания необходимо сразу все перелить в колбу. Не оставлять стоять, т.к. организмы быстро адаптируются к изменившимся условиям и могут не подняться в горлышко колбы. После того, как колба заполняется культурой, не трясти ее, не перемещать, т.к. уже собравшиеся в горлышке колбы клетки могут быстро (за секунды) опуститься на дно.

Определение концентрации клеток *Paramecium caudatum*. Необходимость определения концентрации взвеси клеток тест-объекта возникает при приготовлении рабочего разведения для биотестирования, контроле скорости роста, посева для обеспечения заданной плотности посева. Построив предварительно калибровочную кривую, концентрацию взвеси определяют на приборе «Биотестер». Калибровочную кривую можно использовать для выражения уровня загрязненности (токсичности) величиной тест-реакции (хемотаксиса), выраженной количеством клеток, проявляющих хемотаксическую реакцию к загрязнителям.

Увеличение концентрации клеток повышает точность анализа, но требует большого количества культуры. *Оптимальное число взвеси клеток около 1000 в мл.* При построении калибровочной кривой для одной точки (исходная взвесь) производят как подсчет клеток под микроскопом, так и измерение их концентрации на приборе «Биотестер». Для всех других разведений концентрацию рассчитывают с учетом разбавления и снимают показания на приборе.

Для этого сначала *определяют исходную концентрацию взвеси.* В три пробирки отмеряют по 1 мл взвеси, клетки фиксируют формалином. Отмеряют 0,1 мл взвеси и считают количество клеток. Количество повторений из каждой пробирки не менее 3. Для облегчения счета можно использовать измерительные сетки с шагом 1 мм, можно разграфить чашку Петри на квадраты или использовать любые другие приспособления и приемы, облегчающие

счет частиц с размерами клетки инфузории туфельки. Полученные результаты усредняют, концентрацию пересчитывают на 1 мл.

Далее взвесь клеток с известной концентрацией разводят средой Л-Л. Шаг разведения – 2, конечная концентрация – 5 – 10 клеток в миллилитре. Клетки не фиксируют. Концентрацию клеток в полученных разведениях рассчитывают и параллельно определяют на приборе. Для определения на приборе в фотометрическую кювету вносят 4,2 мл взвеси клеток и снимают 5 показаний. Повторность разведений трёхкратная. Полученные данные обрабатывают. В результате получают ряд разведений клеток известной концентрации и соответствующие концентрации клеток показания прибора. По данным строят график зависимости «концентрация (число) клеток/мл – показания прибора».

Возможные ошибки и их устранение

При сливе взвеси клеток из пипетки значительная часть их задерживается в кончике пипетки. Необходимо выдувать содержимое или промывать пипетку. Возможно неравномерное распределение клеток по кювете, их оседание на стенках кюветы (прибор измеряет только двигающиеся организмы). Поэтому измерять концентрацию необходимо сразу после заполнения кюветы. Нужно визуально контролировать равномерность распределения организмов по кювете и при необходимости перемешать пипеткой или палочкой. Если клетки осели на стенки кюветы, перед измерением нужно постучать по кювете, осевшие на стенки парамеции при этом начинают активно двигаться в среде.

Отмывание *Paramecium caudatum* от посторонних микроорганизмов. При работе в нестерильных условиях тест-культура часто зарастает посторонними мелкими организмами (простейшими, жгутиконосцами и др.). Для того чтобы выделить чистую культуру можно использовать следующий прием: отлавливают одну инфузорию-туфельку и проводят (пересаживают) ее через серию чистых сред, контролируя под микроскопом результат отмывания. Когда посторонние микроорганизмы визуально не обнаруживаются,

инфузорию тифельку оставляют в микроаквариуме на сутки. Если через сутки в микроаквариуме присутствуют только парамеции, их используют для дальнейшего разведения культуры. Для ускорения процесса получения массовой культуры обычно отмывают не одну клетку, а сразу десяток и более, через сутки их пересаживают в один микроаквариум, кормя и пересаживая (сливая) во всё большие объемы среды. Таким образом получают чистую культуру, достаточную для посева и анализа.

Поддержание и хранение культуры. Для сохранения посевного фонда параллельно с разведением культуры для массовых анализов необходимо вести культивирование для поддержания культуры, например, на среде Л-Л с добавлением 1 – 2 зерен сырого риса на 10 – 20 мл среды. В таких условиях культура сохраняется до 2-х недель. Затем тонкой пастеровской пипеткой клетки отлавливаются (обычно они концентрируются вокруг зерен риса) и пересаживаются на свежую среду вместе с зернами.

Культуру можно хранить в холодильнике в условиях низких положительных температур, при этом скорость деления может составлять 1 деление в 16 – 18 суток.

Культура, предварительно помещенная в свежую среду, с добавлением корма в количестве 0,1 – 0,2 от оптимального количества, может сохраняться в течение месяца и дольше. При использовании культуры из холодильника для посева необходимо дождаться, когда культура нагреется до комнатной температуры, и только после этого производить посев. Необходимо помнить, что *инфузория тифелька не выдерживает резких колебаний температур* как в сторону повышения, так и в сторону понижения. *Поэтому при введении культуры в новую среду или при разбавлении культуры средой нужно строго следить за температурой.*

Начиная работать с посевным материалом, часть его необходимо оставить для хранения, а другую часть начать рассеивать. Если посевного материала мало, то рассеивать надо его по микроаквариумам и маленьким чашкам Петри.

Количество корма (сухих пекарских дрожжей), необходимое для питания парameций составляет 0,2 – 0,5 мг/мл. При разведении инфузорий нужно следить под микроскопом за развитием культуры и после увеличения количества клеток в несколько раз пересадить их в большие объёмы среды, внести корм. При получении достаточного количества посевного материала приступить к массовому размножению культуры (см. п. «Выращивание»).

При переводе культуры *Paramecium caudatum* с одной среды (по минеральному составу) на другую необходимо производить операцию постепенно, меняя состав среды не более чем на 0,1 часть каждый час, что позволит культуре адаптироваться к новым условиям.

Выполнение биотестирования

Организация хемотоксической реакции. Как указывалось выше, для реализации хемотаксиса необходимо создание градиента концентрации токсикантов, который должен быть воспроизводимым и стабильным в течение всего времени анализа. Для этого используют ПВС, который при добавлении во взвесь микроорганизмов, во-первых, не нарушает их жизнедеятельности, во-вторых, делает среду с парameциями более вязкой (плотной), чем вода, что позволяет пробы воды наслаивать на взвесь парameций.

Реакцию хемотаксиса проводят в фотометрических кюветах. Причем в контроле на взвесь микроорганизмов наслаивают среду Л-Л или любую заведомо нетоксичную воду, а в опыте – анализируемую пробу. *В контроле почти все парameции поднимаются в верхнюю зону кюветы (отрицательный геотаксис, положительный аэротаксис), а в опыте количество вышедших наверх (в анализируемую пробу) клеток зависит от токсичности пробы. Величину тест-реакции определяют по разности показаний прибора для контроля и опыта в условиях единицы.*

Заполнение кювет. В кювету вносят 2 мл взвеси тест-объекта с концентрацией около 500 – 1000 клеток/мл, добавляют 0,34 мл смеси ПВС с эозином, перемешивают и сразу сверху наслаивают 2 мл исследуемой пробы. Наслоения проводят с помощью пипетки. Первые порции жидкости осторожно сливают по стенке кюветы, причем конец пипетки должен касаться

как стенки кюветы, так и нижнего слоя жидкости. Заполнение контролируют визуально. Границу раздела жидкости слоев хорошо видно из-за разной окраски слоев жидкости. *Конец заполнения кюветы отмечают как начало тест-реакции. В качестве контроля используют среду Л-Л или заведомо нетоксичную воду.*

Одноразовая серия позволяет провести анализ 15 проб. Это ограничение связано со временем тест-реакции, которое составляет 30 мин. На подготовку одной кюветы (наслоение) требуется около 2 мин. Наслоение 15 кювет занимает около 30 мин, т.е. к моменту заполнения последней кюветы время тест-реакции в первой составит 30 мин. После этого начинают измерять величину тест-реакции. Само измерение занимает около 2 мин и, при последовательном измерении тест-реакции в 15 кюветах, последнюю измеряют через 30 мин от начала её заполнения. Таким образом, за 1 ч (30 мин наслоение и 30 мин измерение) проводят анализ 15 проб.

Количество повторений для опытных проб исследователь определяет поставленными перед собой задачами. Параллельные пробы можно ставить сразу, тогда одноразовое определение позволит проанализировать только 4 пробы, или, сняв показания с серии из 15 кювет с разными пробами, при необходимости можно повторить анализ.

Возможные ошибки и их устранение

При постановке тест-реакции могут возникать ошибки, т.к.:

- плохо перемешана культура, и в кюветы при их заполнении попадает разное количество тест-культуры;
- часть взвеси клеток остается в пипетках;
- температура исследуемых проб отличается от температуры взвеси;
- тест-реакция может существенно меняться из-за рН среды, поэтому химическая посуда и кюветы должны быть абсолютно чистыми. *Необходимо строго следить, чтобы на посуде не оставались следы кислот, щелочей и моющих средств, включая мыло. Грязная посуда может быть причиной гибели тест-объекта. Особенно требовательно необходимо относиться к чистоте кювет.*

Измерение тест-реакции на приборе «Биотестер». Подготовленные, как описано в п. «Заполнение кювет», кюветы последовательно помещают в кюветный модуль и снимают показания прибора. В приборе «Биотестер-2» предусмотрено 3 режима измерения концентрации микроорганизмов в кювете: 1) выдача отсчёта через 22 с; 2) выдача среднего из 5 отсчётов; 3) выдача среднего из 10 отсчётов.

Выдача отсчета через 22 с

При работе с прибором необходимо:

- 1) установить режим усреднения «I» (загорится светодиод над кнопкой, соседние светодиоды погашены);
- 2) вставить кювету в кюветное отделение, закрыть крышку и нажать кнопку «ПУСК»;
- 3) индикация гаснет, на 12 с загорается светодиод «ОТСЧЁТ» и через 22 с на индикацию выдается *значение концентрации в условных единицах*. Выдача отсчёта сопровождается световым и звуковым сигналами продолжительностью 2 с;
- 4) в течение 22 с значение предыдущего отсчёта сохраняется, за это время его нужно записать в табл. 4. Если значение концентрации в условных единицах 0 – 8, то начинает мигать светодиод «ТРЕВОГА».

Обычно снимают 5 показаний. Результаты усредняют и получают величину тест-реакции в условных единицах для каждой кюветы.

Пример представления результатов измерений приведен в табл. 4.

Степень токсического загрязнения водных объектов оценивается с помощью индекса токсичности (Т), который рассчитывается по формуле:

$$T = \frac{I_k - I_{on}}{I_k},$$

где I_k – величина тест-реакции для контрольной пробы (заведомо нетоксичной, например, среды Л-Л или дистиллированной воды);

I_{on} – величина тест-реакции для исследуемой пробы.

Метод биотестирования с использованием инфузорий *Paramecium caudatum* апробирован на модельных растворах с известным содержанием токсичных веществ и пробах реальных водных объектов [4].

Таблица 4

Результаты анализа проб воды с использованием тест-культуры *Paramecium caudatum*

Показания прибора, условные единицы					Среднее значение из 5-ти измере- ний	Среднее значение из 3-х па- раллель- ных проб	Индекс ток- сичности (Т), усл. ед.	Характери- стика уровня токсично- сти
126	120	106	136	116	121	114	Контрольная проба	
136	130	112	120	106	122			
106	73	128	82	100	98			
126	88	120	132	134	120	114	$\frac{114 - 114}{114} = 0$	Нетоксич- ная
108	128	136	130	90	118			
126	124	80	110	84	105			
60	58	74	48	60	60	61	$\frac{114 - 61}{114} = 0,46$	Мало- токсичная
54	46	50	78	62	58			
66	64	78	34	82	65			
2	4	8	6	5	5	5	$\frac{114 - 5}{114} = 0,96$	Высоко- токсичная
4	6	4	2	8	5			
10	8	2	8	4	6			

Диапазон реагирования (чувствительность метода) находится в пределах 0,05 – 0,1 величин ПДК_в (предельно допустимой концентрации вещества в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования) и ПДК_{с.р.в} (подпороговой концентрации вещества) [34]. Это позволяет ввести уровни (классы) токсичности исследуемой водной пробы в зависимости от экспериментального значения индекса токсичности (табл. 5) [35].

Таблица 5

Уровни (классы) токсичности исследуемых водных проб в зависимости от экспериментального значения индекса токсичности

Уровень (класс) токсичности	Индекс токсичности (Т), условные единицы	Характеристика уровня (класса) токсичности
I	0,76 – 1,00	Высокотоксичная
II	0,51 – 0,75	Токсичная
III	0,26 – 0,50	Малотоксичная
IV	0,00 – 0,25*	Нетоксичная

* – при значениях концентрации модельных токсикантов ниже ПДК_в и ПДК_{с.р.в}

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АЦП** – аналого-цифровой преобразователь;
- БИ** – блок индикации;
- БП** – блок питания;
- ВНИИВО** – Всесоюзный научно-исследовательский институт по охране вод;
- ЗВ** – загрязняющее вещество;
- ЗГ** – задающий генератор;
- ИИ** – источник излучения;
- ИК** – измерительная кювета;
- КН** – коэффициент биологического накопления;
- ЛК₅₀** – средняя летальная концентрация;
- Л-Л** – среда Лозина-Лозинского;
- ЛР₅₀** – среднее летальное разбавление;
- ЛТ₅₀** – среднее летальное время;
- ОПС** – окружающая природная среда;
- ОС** – окружающая среда;
- ПВС** – поливиниловый спирт;
- ПДК** – предельно допустимая концентрация;
- ПДК_в** – предельно допустимая концентрация вещества в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования;
- ПДК_{с.р.в}** – подпороговая концентрация вещества;
- ПДС** – предельно допустимый сброс;
- ПХБ** – полихлорированные бифенилы;
- СД** – синхронный детектор;
- СКО** – среднее квадратическое отклонение;
- ТМ** – тяжелые металлы;
- У** – усилитель;
- Ф** – фильтр;
- ФД** – фотодиоды;
- ФП** – фотометрический преобразователь;
- ЦОУ** – цифровое отсчетное устройство;
- ЭК₅₀** – средняя эффективная концентрация;
- ЭР₅₀** – среднее эффективное разбавление.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евгенийев, М.И. Тест-методы и экология / М.И. Евгенийев // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 11. – С. 29 – 34.
2. Брагинский, Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia Magna* Str. и других ветвистоусых ракообразных (критический отбор) / Л.П. Брагинский // Гидробиологический журнал. – 2000. – № 5. – С.50 – 57.
3. Розанцев, Э.Г. Биотестирование, или биологическая оценка безопасности / Э.Г. Розанцев, Е.Г. Черемных // Экология и промышленность России. – 2003. – № 10. – С. 44 – 46.
4. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / О. П. Мелеховой, Е. И. Егоровой, Т.И. Евстегнеева и др.; под ред. О. П. Мелеховой, Е. И. Егоровой. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 288 с.
5. Шуберт, Р. Биоиндикация загрязнителей наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. – М.: Мир, 1988. – 350 с.
6. Крайнюкова, А.Н. Биотестирование в охране вод от загрязнения / А.Н. Крайнюкова // Методы биотестирования вод. – Черноголовка, 1988. – С. 4 – 14.
7. Фомин, Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам: энциклопедический справочник / Г.С. Фомин. – М.: Протектор, 1995. – 624 с.
8. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИА, НИА – Природа, 2002. – 118 с.
9. РД 118-02-90. Методическое руководство по биотестированию воды. – М.: Госкомприроды СССР, 1991. – 48 с.
10. Хоружая, Т.А. Оценка экологической опасности / Т.А. Хоружая – М.: Книга-сервис, 2002. – 208 с.

11. Розенберг, В.Г. Теория биоиндикации / В.Г. Розенберг. – М.: Высш. шк., 1994. – 141 с.
12. Кирюхин, В. А. Региональная гидрогеология / В.А. Кирюхин, Н.И. Толстихин. – М.: Недра, 1987. – 252 с.
13. Ланге, О. К. Гидрогеология / О.К. Ланге. – М.: Высш. шк., 1969. – 365 с.
14. Мировой водный баланс и водные ресурсы Земли. – Л.: Гидрометеиздат, 1974. – 638 с.
15. Толстой, М. П. Геология и гидрогеология / М.П. Толстой, В.А. Малыгин. – М.: Недра, 1988. – 317 с.
16. Шварцев, С. Л. Основы гидрогеологии. Гидрогеохимия / С.Л. Шварцев, Е.В. Пиннекер. – Новосибирск: Недра, 1982. – 284 с.
17. Унифицированные методы исследования качества вод: сб. Ч.3. – Методы биологического анализа вод. – 1983. – 356 с.
18. Моделирование и контроль качества вод: сб. науч. тр. – Харьков, 1988. – 167 с.
19. Черемных, Е.Г. Биотестирование, или биологическая оценка безопасности в настоящем и будущем / Е.Г. Черемных, Э.Г. Розанцев // Экология и промышленность России. – 2003. – № 10. – С. 44 – 46.
20. Фомин, Г.С. Контроль химической, бактериальной, радиационной безопасности по международным стандартам: справ. / Г.С. Фомин, А.Б. Ческес. – М.: Геликон, 1992. – 365 с.
21. Золотев, Ю.А. Тест-методы / Ю.А. Золотев // Журнал аналитической химии. – 1994. – Т. 49. – № 2. – С. 149.
22. РД 52.24.635-2002. Методические указания. Проведение наблюдений за токсическим загрязнением донных отложений в пресноводных экосистемах на основе биотестирования.
23. Осипов, Ю.Б. Управление природоохранной деятельностью в российской Федерации / Ю.Б. Осипов, Е.М. Львова. – М.: Варяг, 1996. – 268 с.

24. Муравьева, С.И. Руководство по контролю вредных веществ в воздухе рабочей зоны: справ. издание / С.И. Муравьева, М.И. Буковский, Е.К. Прохорова. – М.: Химия, 1991. – 368 с.
25. Дятлова, Е.С. Методы гидробиологических исследований. Сравнительная чувствительность ветвистоусых ракообразных к бихромату калия / Е.С. Дятлова // Экология моря. – 2001. – Вып. 58. – С. 79 – 83.
26. Лисичкин, Г.В. Химическое модифицирование поверхности минеральных веществ / Г.В. Лисичкин // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 4. – С. 52.
27. Биология: Большой энциклопедический словарь. – М.: Большая Российская энциклопедия, 1999. – 864 с.
28. Иллюстрированная энциклопедия животных. – Прага, 1988. – 612 с.
29. Раков, В.Н. Красавицы гуппи / В.Н. Раков // Наука и жизнь. – 2001. – № 9. – С.10 – 12.
30. Методы биологического анализа вод. – М., 1983. – 371 с.
31. Кокова, В.Е. Непропорционально – проточная культура простейших / В.Е. Кокова, Г.М. Лисовский. – Новосибирск: Наука, 1982. – 188 с.
32. Кокова, В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных / В.Е. Кокова. – Новосибирск: Наука, 1982. – 256 с.
33. Кокова, В.Е. Непрерывное культивирование простейших / В.Е. Кокова // Простейшие – новые объекты биотехнологии: сб. материалов конф. – Л.: Наука, 1989. – С. 113 – 139.
34. Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочно безопасные уровни воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение.
35. Невский, А.В. Анализ и синтез водных ресурсосберегающих химико-технологических систем / А.В. Невский, В.Л. Мешалкин, В.А. Шарнин. – М.: Наука, 2004. – 212 с.

Устройство и принцип работы прибора «Биотестер»

Назначение. Прибор «Биотестер-2» предназначен для реализации методик биологического тестирования, применяемых при контроле загрязненности токсическими веществами природных, сточных, питьевых вод, водных вытяжек из различных материалов и пищевых продуктов.

Прибор позволяет определять концентрацию (число) живых движущихся клеток микроорганизмов типа инфузорий, используемых в качестве тест-объектов.

Технические данные. Прибор представляет собой специализированный импульсный фотометр. Габаритные размеры 290 × 280 × 160 мм. Время непрерывной работы прибора при сохранении его технических характеристик составляет не менее 8 ч.

Рабочие условия эксплуатации:

- температура окружающего воздуха – 10 – 35 °С;
- атмосферное давление – 86 – 106 кПа;
- относительная влажность воздуха – 30 – 80 %;
- напряжение питающей сети – 220 ± 22 В;
- частота питающей сети – 50 ± 1 Гц;
- потребляемая мощность – не более 15 ВА;
- время прогрева прибора – не более 15 мин.

Показания цифрового индикатора в режиме «ТЕСТ» 28 ± 3 ед. Вместимость кюветы 3,5 мл. Используется кювета 45 x 13 x 13 мм, изготовленная из кварцевого стекла или оптического стекла типа К-8. Объем взвеси микроорганизмов для одного анализа составляет не более 2 мл. Объем пробы для одного анализа – не более 1,5 мл. Длина волны излучения – 660 нм. Длительность циклов измерений составляет от 35 до 350 с.

Прибор обеспечивает:

- индикацию на информационном табло цифрового отсчетного устройства (ЦОУ) текущего номера отсчета (от 0 до 9) и значений концентрации микроорганизмов, находящихся в зоне анализа, в условных единицах от 0 до 512;
- подачу звукового сигнала в момент появления показаний на информационном табло;
- индикацию сигнала «ТРЕВОГА» при уровне токсической загрязненности анализируемой пробы, представляющей опасность для жизнедеятельности используемых тест-объектов.

Коэффициент пропускания испытываемых проб водных объектов – от 70 до 100 %. Предел допускаемого значения относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала фотометрического преобразователя (ФП) – 3 %.

Устройство. Прибор состоит из блока питания и 6-ти плат. Конструктивно платы прибора с источником питания размещены внутри металлического корпуса, закрытого крышкой с жалюзи. Платы соединены между собой с помощью разъемов и многожильных кабелей. На лицевой панели прибора закреплен кюветный модуль с оптодатчиком, предусилитель в экране, плата индикации, стрелочный микроамперметр, динамик, кнопка включения питания и кнопка управления режимами.

На лицевую панель (рис. 1) вынесено информационное табло ЦОУ (а), стрелочный индикатор (б), кнопки управления (в) и кюветный модуль (г).

На задней стенке прибора размещены 2 сетевых предохранителя (220 В, 0,5 А) и сетевой шнур. Под съемной крышкой с надписью «Поверка» находится разъем, служащий для подключения приборов и средств измерений при контроле параметров и поверке прибора.

На верхней крышке прибора имеется ручка для переноски прибора.

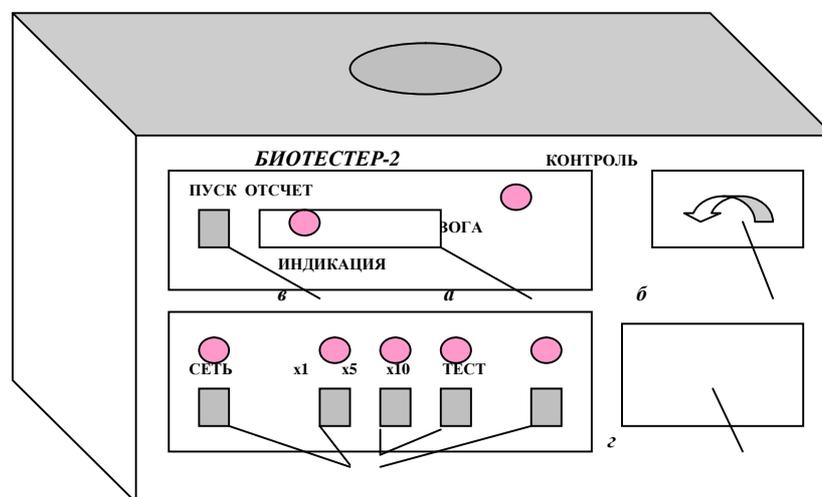


Рис. 1. Внешний вид и устройство прибора «Биотестер»

Принцип действия. Блок-схема прибора приведена на рис. 2.

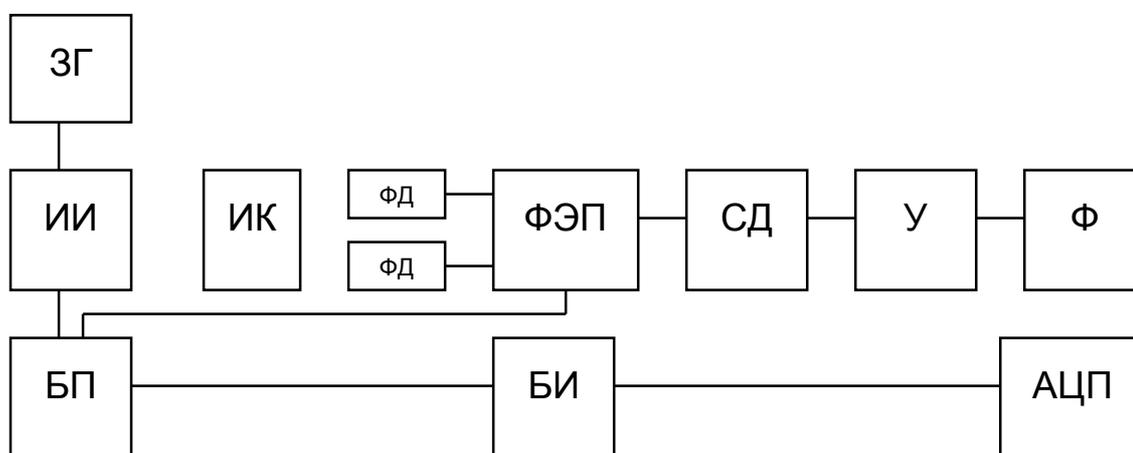


Рис. 2. Блок-схема прибора «Биотестер-2»:

- | | | | |
|-----|------------------------------------|-----|-------------------------------------|
| ЗГ | – задающий генератор; | Ф | – фильтр; |
| ИИ | – источник излучения; | БП | – блок питания; |
| ФД | – фотодиоды; | БИ | – блок индикации; |
| ФЭП | – фотометрический преобразователь; | АЦП | – аналого-цифровой преобразователь; |
| СД | – синхронный детектор; | ИК | – измерительная кювета |
| У | – усилитель; | | |

Импульсный монохроматический световой поток от источника излучения (ИИ) проходит через верхнюю часть кюветы с испытуемой пробой и преобразуется фотодиодами (ФД) и предусилителем с синхронным детектором в электрический выходной сигнал фотометрического преобразователя (ФЭП). При наличии в пробе движущихся клеток микроорганизмов изменяется коэффициент пропускания жидкой среды, находящейся в кювете, при этом изменение сигнала включает перемен-

ную составляющую. Данная составляющая выделяется усилителем (У) и подается через фильтр (Ф) на внутренний (или внешний) аналого-цифровой преобразователь (АЦП), который обеспечивает усреднение сигнала по заданному интервалу времени и индикацию показаний на информационном табло ЦОУ. Показания ЦОУ (в условных единицах) характеризуют среднюю концентрацию (число) движущихся клеток микроорганизмов, находящихся в пробе.

Задающий генератор (ЗГ) формирует импульсы для работы ФП, У и АЦП. Блок питания (БП) обеспечивает напряжение 220 ± 22 В и ± 5 В – для питания аналоговых и цифровых схем прибора.

Указание мер безопасности. ЗАПРЕЩАЕТСЯ ставить прибор на мокрую поверхность и размещать заполненные пробамы кюветы на верхней крышке прибора.

Подготовка прибора к работе. Не следует располагать прибор около мощных трансформаторов, рентгеновских установок и других устройств, создающих сильные электромагнитные поля, а также вблизи отопительных устройств.

Перед работой прибор необходимо заземлить, включить в сеть 220 В (50 Гц) кнопкой «СЕТЬ», при этом должен загореться светодиод «ВКЛ» на лицевой панели. *При первоначальном включении прибора на трехразрядном информационном табло могут появиться произвольные цифры, при этом может мигать светодиод «ТРЕВОГА». Это не является признаком неисправности прибора.*

Затем необходимо прогреть прибор во включенном состоянии в течение 15 мин и установить режим работы. В приборе «Биотестер-2» предусмотрено 3 режима измерения концентрации (числа) микроорганизмов в кювете: 1) выдача одного отсчета через 35 с; 2) выдача среднего из 5 отсчетов; 3) выдача среднего из 10 отсчетов. Режим работы прибора выбирается с помощью кнопочного переключателя, имеющего соответствующее цифровое обозначение: x1, x5, x10.

Обращаем внимание на то, что в данной модификации прибора используется переключатель с независимой фиксацией кнопок, поэтому при выборе режима работы необходимо привести кнопки в исходное – не нажатое состояние. Затем нажатием нужной кнопки установить требуемый режим работы. При этом загорается соответствующий светодиод.

После выбора и установки требуемого режима работы нужно проверить ра-

ботоспособность прибора. Для этого, не устанавливая кювету, необходимо: а) установить режим работы; б) нажать кнопку «ТЕСТ», затем кнопку «ПУСК». Таким образом, прибор будет реагировать не на реальный, а на специально синтезированный сигнал. При этом на информационном табло ЦОУ должны появиться показания параметра «ТЕСТ».

Порядок работы. Вставить кювету с пробой в кюветный модуль, закрыть крышку, выбрать режим работы и нажать кнопку «ПУСК». индикация на табло ЦОУ гаснет, разряд «N» обнуляется, на 12 с загорается светодиод «ОТСЧЕТ», индицирующий паузу, необходимую для подготовки к измерению. Через 35 с завершается цикл измерения (для режима x1) и в сопровождении звукового сигнала на табло ЦОУ высвечивается измеренное значение, номер измерения увеличивается на 1. Затем автоматически запускается следующий цикл измерения. Для режимов x5, x10 временной интервал (22 с) появления показаний на отсчетном устройстве увеличивается, соответственно, в 5 и 10 раз.

ВНИМАНИЕ! Во время работы прибора на его лицевой панели должен гореть только один светодиод над кнопкой выбранного режима и не должен гореть светодиод «ТЕСТ».

При нормальном процессе измерения стрелка индикатора находится в движении в пределах первой трети шкалы. Неподвижность стрелки или ее зашкаливание является признаком отклонений от нормального хода процесса измерения. Причиной этого может являться плохая подготовка прибора, загрязнённость кюветы и пр.

Правила хранения. При непродолжительном хранении прибор может находиться на стеллажах в лабораторных условиях. При хранении свыше 6 месяцев прибор должен находиться в закрытом помещении при температуре от 10 до 35 °С и относительной влажности воздуха не более 60 %. В воздухе не должно присутствовать примесей, вызывающих коррозию.

В случае невозможности создания вышеуказанных условий прибор должен быть помещен в чехол из полиэтиленовой пленки с силикагелем осушителем в количестве 0,2 кг. Чехол заваривается тепловым швом.

Алгоритм установления характеристик погрешности методик биотестирования

Метрологические характеристики методик биотестирования устанавливаются в ходе экспериментальных исследований в соответствии с требованиями методики на растворах эталонных веществ с известными токсическими свойствами.

Для установления метрологических характеристик методик биотестирования в условиях межлабораторного эксперимента в каждой из лабораторий-участниц (K – количество лабораторий-участниц) каждым из исполнителей (L_k – количество исполнителей в k -й лаборатории) получают серии из N_{kl} результатов X_{kln} в условиях сходимости на каждом из эталонных веществ.

1. Сходимость устанавливают по N_{kl} результатам каждой из KL серий самостоятельных экспериментов, проведенных в каждой из K лабораторий каждым из L исполнителей, для чего эти результаты проверяют на наличие грубой погрешности по одному из известных критериев. Результаты с грубой погрешностью отбрасывают и по оставшимся данным вычисляют значение среднего результата X_{kl} и его СКО по формулам:

$$\bar{X}_{kl} = \frac{\sum_{n=1}^{N_{kl}} X_{kln}}{N_{kl}}, (1) \quad S_{kl} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_{kl}} (X_{kln} - \bar{X}_{kl})^2}{N_{kl} - 1}}, (2) \quad f_{kl} = N_{kl} - 1, (3)$$

где k – номер лаборатории-участницы межлабораторного эксперимента, $k = 1, \dots, K$;

l – номер исполнителя (серии), $l = 1, \dots, L_k$ ($L > 2$);

n – номер эксперимента в серии, $n = 1, \dots, N_{kl}$;

X_{kln} – результат эксперимента n в серии l лаборатории k ;

f_{kl} – число степеней свободы, по которым вычисляют значение S_{kl} .

Полученные значения выборочных СКО проверяют на соответствие одной генеральной совокупности с помощью критерия Фишера. Для чего рассчитывают величину F_{kl} по формуле:

$$F_{kl} = \frac{(S_{kl})_{\max}^2}{(S_{kl})_{\min}^2}, \quad (4)$$

и сравнивают её с табличным значением критерия Фишера для соответствующего числа степеней свободы. Значения $F_{табл}$ приведены в табл.1.

Таблица 1

Значения F в зависимости от степеней свободы f_1 и f_2 для P = 0,95

f_2	$f_1=2$	4	8	12	16	20	24	50	∞
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	19,0	19,2	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5
4	6,9	6,4	6,0	5,9	5,8	5,8	5,8	5,7	5,6
6	5,1	4,5	4,2	4,0	3,9	3,9	3,8	3,8	3,7
8	4,5	3,8	3,4	3,3	3,2	3,2	3,1	3,0	2,9
10	4,1	3,5	3,1	2,9	2,8	2,8	2,7	2,6	2,5
12	3,9	3,3	2,8	2,7	2,6	2,5	2,5	2,4	2,3
14	3,7	3,1	2,7	2,5	2,4	2,4	2,4	2,2	2,1
16	3,6	3,0	2,6	2,4	2,3	2,3	2,2	2,1	2,0
18	3,6	2,9	2,5	2,3	2,2	2,2	2,2	2,0	1,9
20	3,5	2,9	2,4	2,3	2,2	2,1	2,1	2,0	1,8
30	3,3	2,7	2,3	2,1	2,0	1,9	1,9	1,8	1,6
60	3,2	2,5	2,1	1,9	1,8	1,8	1,7	1,6	1,4
120	3,1	2,4	2,0	1,8	1,7	1,6	1,6	1,4	1,2
	3,0	2,4	1,9	1,8	1,6	1,6	1,5	1,4	1,0

Если $F_{kl} > F_{табл}$, то соответствующее СКО $(S_{kl})_{\max}$ или $(S_{kl})_{\min}$, которое приводит к превышению F_{kl} над $F_{табл}$, из дальнейших расчетов исключают. Процедуру сравнения $(S_{kl})_{\max}$ и $(S_{kl})_{\min}$ осуществляют до тех пор, пока не будет справедливым $F_{kl} < F_{табл}$. Причем общее количество результатов (после отбрасывания результатов с грубой погрешностью) должно удовлетворять условию:

$$\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} \geq 16.$$

Далее все не исключенные по критерию Фишера выборки результатов полагают однородными и по ним вычисляют СКО, которое характеризует сходимость результатов, по формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl} \bar{X}_{kl}}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl}}, \quad (5) \quad S_{cx} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl} S_{kl}^2}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl}}}, \quad (6) \quad f = \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} (N_{kl} - 1). \quad (7)$$

Для равного количества экспериментов N в каждой из L серий формулы (5-7) соответственно переходят в следующие:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} \bar{X}_{kl}}{KL}, \quad S_{cx} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} S_{kl}^2}{KL}}, \quad f = KL(N - 1).$$

Сходимость $s_{cx} \left(\overset{\circ}{\Delta} \right)$ или $s_{cx} \left(\overset{\circ}{d} \right) S_{cx}$ методики биотестирования на данном эталонном веществе рассчитывают по формулам:

$$s_{cx} \left(\overset{\circ}{\Delta} \right) = S_{cx} g(f), \quad s_{cx} \left(\overset{\circ}{d} \right) = \frac{S_{cx} g(f)}{\bar{X}} 100, \quad (8)$$

где $g(f)$ – коэффициент, учитывающий смещённость оценки СКО.

Значения коэффициента $g(f)$ приведены в табл. 2.

Таблица 2

Значения $\gamma(f)$ в зависимости от числа степеней свободы

f	$g(f)$	f	$g(f)$
1	1,253	15	1,017
2	1,128	16	1,016
3	1,085	17	1,015
4	1,064	18	1,014
5	1,051	19	1,013
6	1,042	20	1,013
7	1,037	25	1,010
8	1,032	30	1,008
9	1,028	35	1,007
10	1,025	40	1,006
11	1,023	45	1,006
12	1,021	50	1,005
13	1,019	60	1,004
14	1,018		

Подобные вычисления выполняют для каждого эталонного вещества. По вычисленным значениям сходимости (в процентах) на разных эталонных веществах устанавливают сходимость методики биотестирования $s_{cx}^* \left(\overset{\circ}{d} \right)$. Причем,

если проверка по критерию Фишера показала однородность соответствующих СКО, то сходимость методики биотестирования вычисляют как средневзвешенное значений сходимости на эталонных веществах по формуле:

$$S_{cx}^*(\overset{\circ}{d}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I f_i S_{cx}^2(\overset{\circ}{d})}{\sum_{i=1}^I f_i}}, \quad (9)$$

где i – номер эталонного вещества, $i = 1, \dots, I$; I – количество эталонных веществ.

Если проверка по критерию Фишера показала неоднородность соответствующих СКО, то за сходимость методики биотестирования принимают наибольшее из вычисленных значений сходимости на эталонных веществах.

2. Для оценивания внутрилабораторной воспроизводимости вычисляют средние значения для каждой из K лабораторий и соответствующие СКО по формулам:

$$\bar{X}_k = \frac{\sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} X_{kln}}{\sum_{l=1}^{L_k} N_{kl}}, \quad (10) \quad S_k = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} (X_{kln} - \bar{X}_k)^2}{\sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1}}, \quad (11) \quad f_k = \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1. \quad (12)$$

Полученные значения выборочных СКО проверяют на соответствие одной генеральной выборке по критерию Фишера и по неисключенным данным вычисляют СКО, которое характеризует внутрилабораторную воспроизводимость, по формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K f_k \bar{X}_k}{\sum_{k=1}^K f_k}, \quad (13) \quad S_{вн.} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K f_k S_k^2}{\sum_{k=1}^K f_k}}, \quad (14) \quad f = \sum_{k=1}^K f_k = \sum_{k=1}^K \left(\sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1 \right). \quad (15)$$

При условии равного количества данных в сериях формулы (13–15) трансформируются в следующие:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \bar{X}_k}{K}, \quad S_{вн.} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K S_k^2}{K}}, \quad f = KL(N - 1).$$

Внутрилабораторную воспроизводимость $s_{\text{вл}}\left(\overset{\circ}{\Delta}\right)$ или $s_{\text{вл}}\left(\overset{\circ}{d}\right)$ методики биотестирования на данном эталонном веществе рассчитывают по формулам:

$$s_{\text{вл}}\left(\overset{\circ}{\Delta}\right) = S_{\text{вл}}g(f), \quad s_{\text{вл}}\left(\overset{\circ}{d}\right) = \frac{S_{\text{вл}}g(f)}{\bar{X}}100, \quad (16).$$

Подобные вычисления выполняют для каждого из эталонных веществ. По вычисленным значениям внутрилабораторной воспроизводимости (в процентах) на разных эталонных веществах устанавливают внутрилабораторную воспроизводимость методики биотестирования $s_{\text{сх}}^*\left(\overset{\circ}{d}\right)$. Причем, если проверка по критерию Фишера показала однородность соответствующих СКО, то внутрилабораторную воспроизводимость методики биотестирования вычисляют как средневзвешенное значений внутрилабораторной воспроизводимости на эталонных веществах по формуле:

$$s_{\text{вл}}^* = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I f_i s_{\text{вл}}^2\left(\overset{\circ}{d}\right)}{\sum_{i=1}^I f_i}}, \quad (17)$$

где i – номер эталонного вещества, $i = 1, \dots, I$;

I – количество эталонных веществ.

Если проверка по критерию Фишера показала неоднородность соответствующих СКО, то за внутрилабораторную воспроизводимость методики биотестирования принимают наибольшее из вычисленных значений внутрилабораторной воспроизводимости на эталонных веществах.

3. Для оценивания межлабораторной воспроизводимости вычисляют среднее значение \bar{X} по всем лабораториям и соответствующее СКО по формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} X_{kln}}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl}}, \quad (18) \quad S_{\text{мл}} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} (X_{kln} - \bar{X})^2}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1}}, \quad (19) \quad f = \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1 \quad (20).$$

Межлабораторную воспроизводимость $s_{мл}(\overset{\circ}{\Delta})$ или $s_{мл}(\overset{\circ}{d})$ методики биотестирования на данном эталонном веществе вычисляют по формулам:

$$s_{мл}(\overset{\circ}{\Delta}) = S_{мл}g(f), \quad s_{мл}(\overset{\circ}{d}) = \frac{S_{мл}g(f)}{X} 100. \quad (21)$$

Погрешность определения токсичности по методике биотестирования вычисляют по формуле

$$d = 1,96 s_{мл}(\overset{\circ}{d}). \quad (22)$$

Подобные вычисления выполняют для каждого из эталонных веществ. По вычисленным значениям межлабораторной воспроизводимости (в процентах) на разных эталонных веществах устанавливают межлабораторную воспроизводимость методики биотестирования $s_{мл}^*(\overset{\circ}{d})$. Причем, если проверка по критерию Фишера показала однородность соответствующих СКО, то межлабораторную воспроизводимость методики биотестирования вычисляют как средневзвешенное значений межлабораторной воспроизводимости на эталонных веществах по формуле:

$$s_{мл}^*(\overset{\circ}{d}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I f_i s_{млi}^2}{\sum_{i=1}^I f_i}}, \quad (23)$$

где i – номер эталонного вещества, $i = 1, \dots, I$; I – количество эталонных веществ.

Если проверка по критерию Фишера показала неоднородность соответствующих СКО, то за внутрилабораторную воспроизводимость методики биотестирования принимают наибольшее из вычисленных значений внутрилабораторной воспроизводимости на эталонных веществах.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Установление средней эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки), бурового раствора

Среднюю эффективную (летальную) концентрацию ЭК₅₀ (ЛК₅₀) или среднее эффективное (летальное) разбавление ЭР₅₀ (ЛР₅₀) устанавливают графическим способом (рис. 3). На оси абсцисс откладывают десятичные логарифмы величин концентраций вещества (разбавлений пробы воды или водной вытяжки, бурового раствора), а на оси ординат – проценты изменения тест-реакции (гибели тест-объектов) по отношению к контролю, которые переводят в пробиты (табл. 3). Через полученные точки проводят прямую. Потом из точки на оси ординат, которая соответствует 5 пробитам (50 %), проводят линию, параллельную оси абсцисс, до пересечения с линией графика. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точке пересечения перпендикуляра и оси абсцисс соответствует десятичный логарифм ЭК₅₀ (ЛК₅₀) или ЭР₅₀ (ЛР₅₀). По логарифму находят значение ЭК₅₀ (ЛК₅₀) в миллиграммах в литре или ЭР₅₀ (ЛР₅₀) в процентах или безразмерных величинах (в кратности разбавления, долях и др.).

Таблица 3

Пробитные величины

Процент изменения тест-реакции	Пробиты	Процент изменения тест-реакции	Пробиты
1	2	3	4
1	2,67	32	4,53
2	2,95	33	4,56
3	3,12	34	4,59
4	3,25	35	4,61
5	3,35	36	4,64
6	3,45	37	4,67
7	3,52	38	4,69
8	3,59	39	4,72
9	3,66	40	4,75
10	3,72	41	4,77
11	3,77	42	4,80
12	3,83	43	4,82
13	3,87	44	4,84
14	3,92	45	4,87
15	3,96	46	4,90
16	4,01	47	4,92
17	4,05	48	4,95
18	4,08	49	4,97

окончание табл. 3

1	2	3	4
19	4,12	50	5,00
20	4,16	51	5,03
21	4,19	52	5,05
22	4,22	53	5,08
23	4,26	54	5,10
24	4,29	55	5,13
25	4,33	56	5,15
26	4,36	57	5,18
27	4,39	58	5,20
28	4,42	59	5,23
29	4,45	60	5,25
30	4,48	61	5,28
31	4,50	62	5,31
63	5,33	82	5,92
64	5,36	83	5,95
65	5,39	84	5,99
66	5,41	85	6,04
67	5,44	86	6,08
68	5,47	87	6,13
69	5,50	88	6,18
70	5,52	89	6,23
71	5,55	90	6,28
72	5,58	91	6,34
73	5,61	92	6,41
74	5,64	93	6,48
75	5,67	94	6,55
76	5,71	95	6,64
77	5,74	96	6,75
78	5,77	97	6,88
79	5,81	98	7,05
80	5,84	99	7,32
81	5,88		

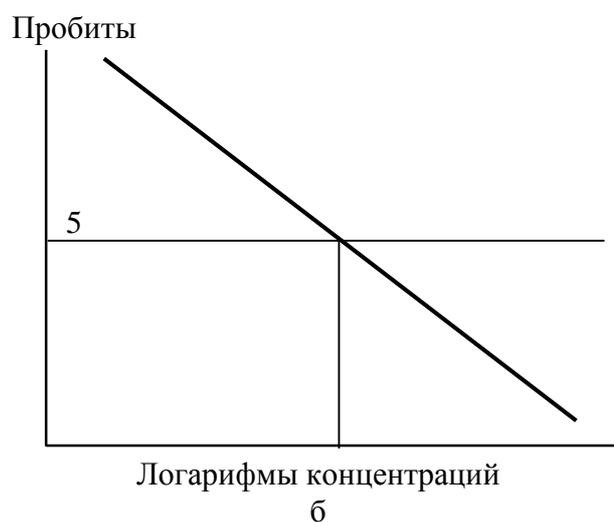
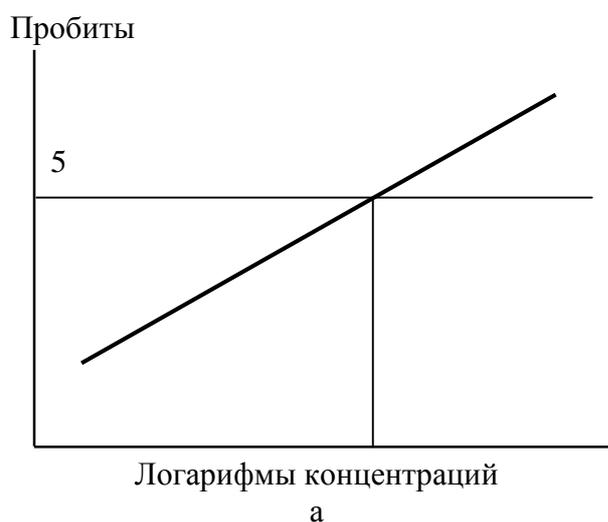


Рис. 3. Установление графическим способом (а) эффективной (летальной) концентрации вещества (смеси веществ) и (б) среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки), бурового раствора

Бубнов Андрей Германович
Буймова Светлана Александровна
Гущин Андрей Андреевич
Извекова Татьяна Валерьевна

**БИОТЕСТОВЫЙ АНАЛИЗ – ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТОД
ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Учебно-методическое пособие

Редактор О.А. Соловьева

Подписано в печать 27.11.2007. Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага писчая. Усл. печ. л. 6,51. Уч.-изд. л. 7,22. Тираж 80 экз. Заказ

ГОУ ВПО Ивановский государственный химико-технологический университет

Отпечатано на полиграфическом оборудовании
кафедры экономики и финансов ГОУ ВПО «ИГХТУ».

153000, г. Иваново, пр. Ф.Энгельса, 7.