

ИННОВАЦИОННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА



Проект 2: индивидуальная траектория обучения
и качество образования

Цель: ориентированное на требования рынка
образовательных услуг улучшение качества
подготовки и переподготовки специалистов

Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Владимирский государственный университет

С.М. ЧЕСНОКОВА, Н.В. ЧУГАЙ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Учебное пособие

В двух частях

Часть 2. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Владимир 2008

УДК 504.064.36:574

ББК 28.081.4:28.088

Ч-24

Рецензенты:

Кандидат биологических наук, доцент,
зав. кафедрой экологии и безопасности жизнедеятельности
Владимирского государственного педагогического университета
В.М. Усоев

Доктор биологических наук, зав. лабораторией
диагностики бактериальных инфекций животных
федерального государственного учреждения
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (г. Владимир)
О.В. Прунтова

Печатается по решению редакционного совета
Владимирского государственного университета

Чеснокова, С. М.

Ч-24 Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды : учеб. пособие. В 2 ч. Ч. 2. Методы биотестирования / С. М. Чеснокова, Н. В. Чугай ; Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2008. – 92 с.
ISBN 978-5-89368-829-0

Рассмотрены краткие теоретические основы методов биотестирования загрязнения сточных и поверхностных вод, снежного покрова, донных осадков, промышленных отходов, осадков сточных вод, кормов. Приведены конкретные методики биотестирования объектов окружающей среды.

Предназначено для студентов 2 – 4-го курсов всех форм обучения специальностей 020801 – экология и 280201 – охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов, изучающих дисциплины «Токсикология», «Экотоксикология», «Экологический мониторинг», а также может быть полезно широкому кругу читателей, интересующихся проблемами экологии и охраны окружающей среды.

Ил. 6. Табл. 10. Библиогр.: 11 назв.

УДК 504.064.36:574
ББК 28.081.4:28.088

ISBN 978-5-89368-829-0

© Владимирский государственный университет, 2008

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
1. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ СТОЧНЫХ, ПРИРОДНЫХ ВОД И СНЕЖНОГО ПОКРОВА	7
1.1. Острая и хроническая токсичность.....	7
1.2. Биотестирование сточных вод	8
1.3. Тест-организмы, используемые для биотестирования сточных, природных вод и снега	10
2. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПОЧВ	24
2.1. Особенности почв как объектов биотестирования	24
2.2. Методы определения фитотоксичности почв	25
2.3. Другие методы определения токсичности почв.....	28
3. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ОТХОДОВ	31
3.1. Цели биотестирования отходов.....	31
3.2. Тест-организмы, используемые для биотестирования отходов.....	31
4. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ И КОРМОВ	33
4.1. Цели биотестирования	33
4.2. Методики биотестирования	34

5. МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	36
5.1. Проведение биотестирования на дафниях	36
5.2. Определение токсичности почв с инфузорией <i>Tetrahymena pyriformis</i>	60
5.3. Оценка токсичности поллютантов, содержащихся в сточных водах, донных отложениях, твердых отходах, почвах, по прорастанию кресс-салата	63
5.4. Определение токсичности продуктов и кормов с помощью инфузории <i>Colpoda steinii</i>	70
5.5. Определение загрязнения природных водоемов с использованием рясковых.....	71
Ситуационные задачи к рейтинг-контролю	73
Выводы.....	78
Заключение.....	80
Приложение.....	82
Библиографический список.....	91

ПРЕДИСЛОВИЕ

Регулирование качества природной среды основано на определении экологически допустимого воздействия на нее, при котором не происходит нарушение процессов самоочищения воды, почв и воздуха.

Для определения качества объектов окружающей среды, степени деградации экосистем под влиянием антропогенных факторов в настоящее время широко используются биологические методы, позволяющие оценить состояние как биоценозов в целом, так и его отдельных компонентов.

Биологические методы позволяют установить степень общего загрязнения и общей токсичности объектов окружающей среды для живых организмов и целесообразность их дальнейшего детального анализа химическими, физико-химическими и физическими методами.

Для интегральной оценки степени токсичности окружающей природной среды используются методы биоиндикации и биотестирования. Методы биоиндикации качества окружающей природной среды рассмотрены в первой части представленного издания (Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды. Владимир, 2007 г.).

Во второй части пособия рассматриваются методы биотестирования. Они основаны на использовании биотестов – живых организмов, выделенных в лабораторную культуру. Критерием токсичности среды служит подавление основных жизненных функций тест-организмов: гибель, снижение темпов роста и размножения, изменение морфологии клетки, снижение активности ферментов и т.п.

Для применения методов биотестирования, как правило, не требуется больших площадей и дорогостоящего оборудования.

Токсические эффекты, регистрируемые методами биотестирования, включают комбинированное, сочетанное и комплексное воз-

действие всех химических, физических и биологических факторов, содержащихся в исследуемом объекте и неблагоприятно влияющих на физиологические, биохимические и генетические функции тест-объектов.

В экспериментах по биотестированию может быть иногда зарегистрирована стимуляция – положительная тест-реакция на воздействие токсикантов, содержащихся в природных объектах. Например, при подавлении токсикантами дыхательных ферментов у светящихся бактерий возникает усиление их свечения. Сложность интерпретации таких данных заключается в том, что эффект стимуляции может возникнуть и при исследовании вод определенного состава, например, при высоком содержании в них биогенных элементов могут увеличиться темпы роста водорослей.

Токсичность, устанавливаемая методами биотестирования, является интегральным показателем загрязнения природных сред. Как и все интегральные показатели, он имеет недостаток – не раскрывает загрязняющие вещества, присутствующие в пробе, поэтому результаты биотестирования не всегда совпадают с данными гидрохимического анализа. Это может объясняться очень многими причинами. Например, в исследуемой воде могут присутствовать загрязняющие вещества, которые невозможно определить используемыми методами или присутствие которых не предполагается и не измеряется.

В предлагаемом учебном пособии рассмотрены наиболее часто используемые в научно-исследовательских и заводских лабораториях методы биотестирования промышленных сточных вод, загрязненных природных вод, почв, донных осадков, промышленных отходов, а также пищевых продуктов и кормов.

Практические работы, описанные в пособии, могут быть использованы студентами в лабораторных практикумах по экологическому мониторингу, экотоксикологии, а также в токсикологии при оценке токсичности различных веществ и при выполнении дипломных и курсовых работ.

В приложении представлена методика определения токсичности воды по ферментативной активности бактерий.

1. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ СТОЧНЫХ, ПРИРОДНЫХ ВОД И СНЕЖНОГО ПОКРОВА

1.1. Острая и хроническая токсичность

При биотестировании определяют острую и хроническую токсичность контролируемых объектов для живых организмов.

Токсичность – это степень проявления ядовитого действия разнообразных соединений и их смесей, которые повреждают, ингибируют, стрессируют, вызывают генетические изменения или убивают организмы в воде, почве, воздухе.

За критерий токсичности принимается достоверное количественное изменение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности вещества, воды или почвы. Среди тест-параметров наиболее часто используются смертность, выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной активности и другие функции тест-организмов.

Тест-реакция – это изменение какого-либо морфологического, биохимического, поведенческого или функционального показателя у тест-объекта под воздействием токсических веществ, содержащихся в исследуемой среде.

При проведении биотестирования обычно устанавливается острая или хроническая токсичность исследуемой среды в экспериментах различной продолжительности.

Острый опыт – краткосрочная процедура биотестирования (с установленным в каждой методике временем экспозиции), определяющая острую токсичность по 50 % выживаемости (смертности) тест-объектов. Острая токсичность проявляется в том случае, если интенсивность воздействующих факторов (агентов) настолько велика, что компенсаторная и адаптационная реакции организма не успевают проявляться и он гибнет.

Хронический опыт – долговременная процедура биотести-

рования (с установленным в каждой методике временем экспозиции, которое составляет не менее 1/10 продолжительности жизни используемых тест-организмов). В каждом опыте устанавливается статистически достоверное отклонение от контроля в плодовитости либо другом параметре используемых тест-объектов. Хроническая токсичность определяется при менее интенсивном, но более продолжительном воздействии токсикантов (вредных факторов). При этом происходят нарушение равновесия между распадом и синтезом веществ в организме тест-объектов, разрушение генома и прекращение воспроизводства.

1.2. Биотестирование сточных вод

Биотестирование с середины XX в. широко используется в странах ЕЭС на всех промышленных предприятиях, имеющих сточные воды, сбрасываемые в водные объекты или поступающие на сооружения биологической очистки. В нашей стране долгое время широкое распространение метода сдерживалось отсутствием нормативно-правовых документов, регламентов токсикологического контроля и простых удобных методических руководств, пригодных для использования в условиях промышленных предприятий.

В настоящее время в «Правилах охраны поверхностных вод», изданных в 1991 г., биотестирование определяется как обязательный элемент контроля качества воды. Биотестирование снежного покрова проводится при комплексных экологических исследованиях территорий, оценке влияния вредных выбросов в атмосферу от различных источников на окружающую среду.

Биотестирование промышленных и городских сточных вод проводится с целью определения их токсичности, возможности и условий подачи на сооружения биологической очистки, для оценки эффективности работы очистных сооружений и установления возможности сброса очищенных сточных вод в водные объекты. Метод биотестирования позволяет решать многие практические задачи, связанные с очисткой, утилизацией и сбросом образующихся промышленных стоков. Основные области применения и практические задачи, решаемые с использованием этого метода, приведены на рис. 1.1.

При биотестировании устанавливаются летальная концентрация вещества или кратность разбавления исследуемой воды, при которой наступает 50%-ная гибель тест-организмов, и безвредная (недействующая) концентрация вещества, или безвредная кратность разбавления исследуемой воды, при которой гибель организмов не превышает таковую в контроле.

Термин «безвредное разбавление» отнюдь не означает, что сточную воду с установленной токсичностью следует разбавлять перед сбросом в водоем. Разбавление сточных вод до нормативного качества чистыми или другими водами категорически запрещается, так как такой прием ликвидации токсичности сточных вод экологически и экономически не оправдан и не может быть обеспечен водными ресурсами.

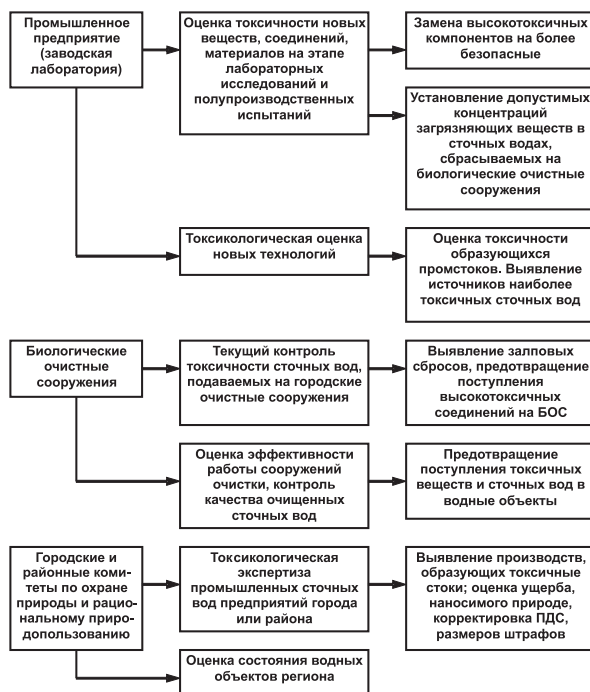


Рис. 1.1. Биотестирование промышленных сточных вод (области применения, решаемые задачи, получаемый эффект)

Органы государственного экологического контроля по результатам биотестирования сточных вод, сбрасываемых в водоем, рассчитывают плату за токсический сброс, принимают решение о пересчете ПДС с учетом выявленной токсичности и участвуют в разработке и утверждении мероприятий, направленных на улучшение качества водоемов, принимающих сточные воды.

Расчеты токсикогенной нагрузки, вносимой в природные водоемы, с учетом кратности разбавления сточных вод в створе смешения проводят по формуле

$$T = \frac{IQt}{K},$$

где T – объем токсикогенной нагрузки, м³;

I – индекс безвредного разбавления (степень разбавления сточной воды, не оказывающей токсического действия);

Q – объем сбрасываемых сточных вод, тыс. м³/сут;

t – продолжительность сброса, сут;

K – кратность разбавления сточных вод в водоеме.

1.3. Тест-организмы, используемые для биотестирования сточных, природных вод и снега

Тест-организмы и тест-операции

При биотестировании в качестве тест-объектов могут быть использованы либо целостные организмы (тест-организмы), либо изолированные органы, ткани или клетки. Наиболее широкое распространение при биотестировании сточных и природных вод получили методы с использованием в качестве тест-объектов гидробионтов: простейших (инфузории, жгутиконосцы), кишечнополостных (гидры), червей (планарии, пиявки), моллюсков (пластинчатожаберные, брюхоногие), ракообразных (дафнии, гаммариусы), рыб, а также представителей различных групп растений и водорослей.

Анализ основных закономерностей процесса адаптации живых организмов, физиологических, поведенческих и экологи-

ческих особенностей гидробионтов позволит сформулировать основные требования к тест-организмам и тест-операциям (тест-функциям, тест-параметрам).

Тест-организмы должны удовлетворять следующим требованиям:

– используемые для тестирования особи должны быть генетически однородными, что обеспечит сходство их чувствительности и резистентности, а также единообразие ответных реакций на воздействие токсикантов, гарантирующие высокую воспроизводимость результатов тестирования;

– функциональная активность тест-организма не должна иметь сезонной периодичности, что позволит получать одни и те же результаты независимо от времени года;

– виды, используемые как тест-организмы, должны иметь высокий уровень метаболизма, что обеспечит быстроту возникновения у них ответных реакций на действие токсикантов и, следовательно, экспрессность биотеста;

– тест-организмы должны быть стрессоустойчивы к связанным с процедурой тестирования действиям, т.е. помещение их в экспериментальные камеры и проведение необходимых наблюдений и замеров не должно само по себе вызывать у них отчетливо выраженных стрессовых реакций.

Выполнение всех этих требований можно обеспечить только в случае культивирования чистых линий тест-организмов в стандартных, по возможности «экологически чистых», оптимальных для данного вида условиях.

Методы с использованием простейших

Чаще всего в качестве тест-объектов используются инфузории *Tetrahymena pyriformis*, *Euplotes balteatus*, *Paramecium caudatum* и др.

Методы основаны на оценке степени их спонтанной двигательной активности, выживаемости в остром опыте или степени прироста их численности (изменения концентрации клеток в тестируемой воде по сравнению с контролем) в хроническом 96-часовом опыте. Исследуемую воду считают токсичной в случае снижения двигательной

активности, выживаемости или прироста численности инфузорий по сравнению с контролем. Достоинствами указанных методов являются их относительная экспрессность и надежность оценки, обусловленная однородностью указанных тест-организмов, поскольку последние, как правило, представляют собой разводимые в лабораториях культуры. Однако эти методы имеют ряд недостатков, так как в связи с физиологическими особенностями простейших одноклеточных организмов их чувствительность ко многим факторам внешней среды, в том числе и некоторым токсикантам, крайне специфична и в целом ряде случаев не сопоставима с чувствительностью многоклеточных животных. Например, величины критических концентраций тяжелых металлов для инфузорий на несколько порядков ниже, а нитратов, нитритов и солей аммония на несколько порядков выше ПДК, установленных для позвоночных животных. Исходя из этого указанные методы рекомендованы для выявления в воде малых концентраций тяжелых металлов, но не для оценки общей токсичности загрязненных вод в отношении высших животных и человека.

Tetrahymena pyriformis широко используется в Германии, Польше, России и других странах для определения токсичности сточных вод, поступающих на биологическую очистку, с целью выявления в них токсических веществ, представляющих опасность для биоценоза активного ила, и корректирования технологического режима с целью предупреждения массовой гибели микроорганизмов активного ила.

Биотестирование промышленных сточных вод должно обеспечить возможность прогнозирования совместимости их с функционированием биоты очистных сооружений. Среди методов биотестирования сточных вод указанной цели наиболее соответствуют те, которые основаны на использовании в качестве тест-объектов характерных представителей микрофауны активных илов и биопленок очистных сооружений, так как именно эта часть их биоценоза наиболее чувствительна к токсикантам. Она в первую очередь элиминируется при токсических стрессах, тогда как деструкторы химических загрязнений сточных вод (бактерии, актиномицеты, грибы) значительно более устойчивы к колебаниям токсичности.

Этим требованиям в наибольшей мере соответствуют монокультуры простейших активного ила *Tetrahymena pyriformis*, *Euplotes balteatus*, *Paramecium caudatum*.

Методы с использованием пиявок

Биотесты с применением пиявок (*Hirudo medicinalis*, *Hirudo lineate*, *Caspiobdella fadeivi*, *Protocleipsis tessulata*) основаны на регистрации изменения статических поз молодых животных после их 15-20-минутного пребывания в тестируемой воде. О токсичности исследуемой воды судят по уменьшению количества естественных статических поз у подопытных пиявок по сравнению с контрольными и по переходу их к динамическому состоянию (ползание, плавание, уход из токсической зоны).

При возникновении динамических реакций дальнейшее пребывание пиявок в загрязненной воде приводит к развитию у них интоксикации и гибели через несколько часов или суток. Методы с использованием пиявок характеризуются повышенной экспрессностью (20 мин) и простотой в исполнении, но, по существу, устанавливают только наличие или отсутствие острой токсичности исследуемой воды для определенных видов пиявок. Чувствительность методов невысокая, не превышает 10 – 20 ПДК, поэтому их в настоящее время используют редко, только в качестве сигнальных методов при плановом контроле сточных вод, загрязненных ограниченным кругом токсикантов и к тому же в достаточно высоких концентрациях.

Методы с использованием моллюсков

Моллюски широко используются для биотестирования сточных и природных вод. Острую токсичность оценивают по выживаемости и поведенческим реакциям, хроническую – по общебиологическим и морфофизиологическим показателям в сравнении с контрольными (чистая вода) данными.

Разработаны методы оценки токсичности вод, основанные на регистрации закрытия раковин двухстворчатых моллюсков (*Unio tumidus*) при пропускании загрязненной воды через резервуар с мол-

люсками. Показателем токсичности воды считают увеличение относительного числа моллюсков с закрытыми створками до 70 % и более. Некоторые данные методы автоматизированы. К их недостаткам относятся невысокая чувствительность и ненадежность, связанные с неоднозначностью реакций используемых тест-организмов на разные виды токсикантов и их смеси, что затрудняет трактовку полученных данных. Поэтому указанные методы целесообразно применять для индикации сточных вод на протоке и только в комплексе с другими методами.

Из брюхоногих моллюсков чаще всего в качестве тест-объектов используются угнетенный прудовик (*Lymnea lagotis* Shrank), катушка роговидная (*Coretus corneus*), живородка речная (*Viviparus Viviparus* L).

Моллюсков обычно отлавливают из природных водоемов. Прудовиков собирают в летние месяцы на мелководьях эвтрофных водоемов, в зарослях высшей растительности. Для исследований отбирают половозрелых особей, интенсивно передвигающихся и потребляющих корм, имеющих одинаковые размер, вес и цвет раковин. Прудовиков обильно кормят капустой кочанной или сухими дафниями. Для акклиматизации к лабораторным условиям прудовиков по 3 – 5 штук помещают на две недели в кристаллизаторы, содержащие 1,5 – 2,5 л воды.

Оценку токсичности водной среды чаще всего проводят в хронических опытах (5 – 60 дней) по изменению двигательной активности моллюсков, интенсивности их питания и размножения, плодовитости или выживаемости. Методы требуют длительного, трудоемкого отбора подопытных животных, включающего 10 – 30-дневную адаптацию их к лабораторным условиям и предварительную колибровку степени устойчивости моллюсков к эталонному токсиканту.

Биотесты с использованием взятых из природных водоемов моллюсков учитывают при установлении ПДК рыбохозяйственных водоемов и при проведении комплексного экологического мониторинга. Распространенные в Европейской части Российской Федерации пресноводные моллюски представлены на рис. 1.2.

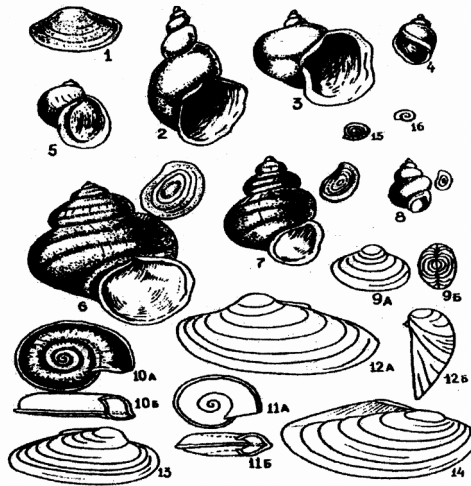


Рис. 1.2. Пресноводные моллюски Европейской части РФ:

- 1 – роговая шоровка; 2 – прудовик обыкновенный;
 3 – прудовик ушковый; 4 – физа ключевая;
 5 – прудовик яйцевидный; 6 – лужанка настоящая;
 7 – лужанка полосатая; 8 – битиния щупальцевая;
 9 А, Б – горошина; 10 А, Б – катушка обыкновенная;
 11 А, Б – катушка килевая; 12 А, Б – перловица вздутая;
 13 – перловица-живописец; 14 – беззубка утиная;
 15 – катушка завитая; 16 – катушка гладкая

Биотесты с использованием ветвистоусых рачков

В качестве тест-объектов чаще всего используются рачки *Daphnia magna*, *Daphnia longispina*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia affinis* и др. Оценку токсичности воды производят по изменению определенного набора таких форм поведения, как кувыркание, скручивание, равномерное распределение в заданном объеме или физиологического состояния (изменение дыхательных ритмов, сердцебиения, окраски тела, абортации яиц и зародышей, двигательной активности либо выживаемости и плодовитости). О токсичности воды судят по достоверному изменению по сравнению с контролем одного регистрируемого параметра. Биотесты с дафниями рекомендуется применять для контроля сточных вод и выявления потенциально опасных источников загрязнения водных объектов токсическими веществами. В настоящее время тесты с дафниями наиболее распространены, что обусловлено простотой культивирования этих рачков.

В странах ЕЭС принят стандарт на биотестирование сточных вод и определение токсичности отдельных химических соединений с помощью *Daphnia magna*. По существу этот метод сводится к установлению ЛС₅₀ (48 и 24 ч) тестируемого вещества для данного вида дафний. Методы с использованием дафний позволяют сравнить токсичность вод, содержащих разнообразные загрязнители, однако в связи с разведением в разных лабораториях неодинаковых клонов дафний они дают значительный разброс в результатах, достигающий 35 % и более.

Таким образом, несмотря на ряд достоинств, биотесты с дафниями не могут претендовать на универсальность и унифицированность. Желательно их использование в комплексе с другими биологическими и гидрохимическими методами. В международном стандарте на биотест с дафнией особо оговаривается применимость его результатов только в отношении *Daphnia magna*.

Воду для культивирования рачков отбирают из незагрязненных водоемов или используют отстаивную водопроводную воду, дехлорированную путем аэрации в течение 7 – 10 дней. В качестве корма используют протококковые зеленые водоросли (хлорелла) или сухие хлебопекарные дрожжи.

Маточные культуры дафний содержат в целностеклянных аквариумах с плотностью посадки 20 – 30 дафний на 1 л воды. Вода в аквариумах обновляется на половину один раз в 7 – 10 дней. Для экспериментов выращивают синхронизированную культуру рачков от одной особи. Дафнии при этом генетически однородные, одновозрастные и развиваются одновременно, что позволяет максимально исключить разброс результатов. С этой целью половозрелых дафний рассаживают по одной в стаканчики со 100 мл воды. У наиболее плодовой самки отбирают молодь одного помета (30 – 40 особей) и помещают в 2-литровый аквариум. Однопометную молодь второго поколения используют в опыте.

В кратковременных опытах основным показателем токсичности является выживаемость рачков. Время гибели рачков отмечают по наступлению неподвижности (иммобилизации): дафнии лежат на дне стакана, плавательные движения отсутствуют и не возобновляются при легком прикосновении струй воды или покачивании стаканчика. В качестве дополнительных показателей в остром опыте

можно учитывать изменение окраски тела, кишечника, жирового тела, а также поведенческие реакции.

В хронических опытах регистрируют выживаемость, плодовитость, рост (линьку, размеры) в ряду поколений.

При наблюдении за размножением рачков учитывают время наступления половозрелости, регистрируемое по моменту откладки яиц в выводковую камеру (дни); время первого помета с учетом выхода молоди из выводковой камеры (дни); число пометов, которое подсчитывают по частоте вымета молоди.

Методы с использованием рыб

Первые экспресс-методы оценки токсичности воды с помощью рыб (методы рыбной пробы) были разработаны и стали применяться на производствах с начала прошлого века. Они основаны на использовании поведенческих и физиологических реакций рыб.

Метод рыбной пробы заключается в том, что в резервуар с исследуемой проточной водой помещают 2–3 вида рыб, обладающих разной чувствительностью к токсикантам. По изменениям их поведенческих и физиологических реакций или гибели судят о наличии в воде токсикантов. В дальнейшем метод видоизменился и был усовершенствован А.Л. Бурковским, А.А. Сахаровым и др. Разработаны методы, устанавливающие токсичность воды по изменению дыхательного ритма и сердцебиения рыб. Биотесты проводятся с использованием таких рыб, как речной окунь *Perca fluviatilis*, голянь *Phoxinus phoxinus* и карп *Cyprinus carpio*. В США и Великобритании несколько методов с использованием рыб стандартизованы и широко применяются для контроля острой токсичности сточных вод и определения необходимого их разбавления. Однако в большинстве методов рыбной пробы, включая и стандартизованные, не оговаривается обязательное использование конкретных видов рыб, их размеры, возраст. Тест-организмы берут из разных водоемов, популяций, и поэтому всякий раз они обладают неизвестной до опытов чувствительностью и резистентностью к токсикантам. Все это существенно снижает точность и чувствительность биотестов и затрудняет интерпретацию полученных данных. В этой связи в стандарте США указано, что результаты биотестирования методом рыбной пробы корректны только в отношении непосредственно используемых в каждом конкретном опыте рыб.

Для оценки токсичности и мутагенных свойств сточных вод используются эмбрионы тилапий *Oreochromis mossambicus*. Биологическую активность воды оценивают по выживаемости рыб в эмбриональный и ранний постэмбриональный периоды. Развивающуюся икру тилапий помещают в отсадники за сутки до вылупления личинок. Токсический эффект загрязненных вод проявляется в снижении жизнеспособности эмбрионов тилапий, мутагенная активность – в индуцировании возрастания частоты хромосомных aberrаций в делющихся клетках эмбрионов тилапий.

Методы определения фитотоксичности сточных и природных вод

В связи с широким использованием для орошения сельскохозяйственных земель в той или иной мере загрязненных вод рекомендовано перед применением изучить их влияние на культурные растения. Для этого определяют фитотоксичность вод, которую оценивают по степени ингибирования прорастания семян, роста проростков, корешков или по снижению энергии прорастания семян. Обычно для биотестирования используют мелкие семена (кресс-салата, горчицы белой, укропа, редиса, гречихи, льна, одуванчика, пшеницы и других растений). Для достоверной оценки проводят не менее трех тестов с разными видами семян. Рекомендуется использовать свежие семена, так как на лежалых семенах развивается сапрофитная микрофлора и при прорастании в условиях повышенной влажности они могут загнить и покрыться плесенью.

Метод биотестирования с использованием семян различных растений может быть рекомендован также для оценки степени очистки сточных вод, загрязненных СПАВ, нефтепродуктами, хлорорганическими соединениями, тяжелыми металлами и другими веществами.

Для установления необходимой продолжительности проращивания семян рекомендуется проводить предварительные пробные опыты, так как на этот процесс влияет множество факторов: вид растения, температура и др. Кроме того, в процессе прорастания семян существует определенная генетически обусловленная периодичность. Так, семена почти всех растений, не требующих стратификации, дружно и быстро прорастают весной, хуже – осе-

ную и очень плохо – в период глубокого покоя (с половины ноября до половины января).

Степень токсичности тестируемых вод оценивается по величине коэффициента ингибирования прорастания или роста проростков (корешков) K_{ing} , который рассчитывается по формуле:

$$K_{ing} = \frac{N_K}{N_n} 100,$$

где N_K – число семян, проросших в контроле;

N_n – число семян, проросших в исследуемой пробе.

В.Н. Максимов, Х. Нагель и С.А. Остроумов предложили новый коэффициент ингибирования. Этот коэффициент предлагается рассчитывать по формуле

$$K_{ing} = \frac{M_n - M_K}{N_K - M_K} 100,$$

где M_n – число семян, не проросших в тестируемой воде;

M_K – число семян, не проросших в контроле;

N_K – число семян, взятых для тестирования в опытах.

Этими же авторами на семенах гречихи *Fagopyrum esculentum* и пшеницы *Triticum aestivum* было установлено, что при загрязнении вод СПАВ наряду с общим торможением роста проростков происходит нарушение морфогенеза клеток ризодермы, в норме образующих корневые волоски.

Опыт изучения роста корней и его торможения различными веществами в лаборатории В.Б. Иванова указывает на целесообразность расчета средней скорости удлинения проростков

$$V = \Delta A / \Delta t,$$

где ΔA – средний прирост за интервал времени Δt .

В работах В.Б. Иванова указывается также на полезность оценки воздействия различных загрязняющих веществ на проростки с помощью величины степени ингибирования

$$I = \frac{\Delta A_k - \Delta A_n}{\Delta A_k} 100,$$

где ΔA_k – средний прирост проростков в контроле;

ΔA_n – средний прирост проростков в исследуемой пробе за то же время;

I – степень ингибирования роста проростков.

Кроме наземных растений для биотестирования сточных и природных вод могут быть использованы водные растения (ряска малая *Lemna minor* L и элодея *Elodea canadensis* Rich). Степень токсичности вод оценивают по следующим параметрам: изменение окраски, потеря тургора, повреждение точек роста, выживаемость (в течение 5 – 10 сут), прирост и число боковых отростков, число корней и их длина, количество и размеры листочков, содержание хлорофилла, количество хлоропластов в эпистрофном (т.е. перпендикулярном к лучам света) положении после воздействия сильного света (подавление фототаксиса).

После интенсивного освещения через 10 мин в контроле число хлоропластов в эпистрофном положении уменьшалось до нуля в результате перехода большинства хлоропластов в парастрофное положение, т.е. они прижимались к краям клеточной стенки.

У листочков, поврежденных токсикантом, хлоропласты не отходят или частично отходят к краям клетки. Л.Г. Ломагин и Л.В. Ульянова (1993) предложили считать количество хлоропластов в эпистрофном положении после воздействия интенсивным светом в течение 10 мин показателем повреждения клеток.

Второй способ основан на определении количества погибших клеток методом витального окрашивания. Живые клетки ограничивают проницаемость внутрь органических веществ и, помещенные в раствор красителя, практически не окрашиваются. В мертвые клетки краска проникает свободно, благодаря чему их можно сразу обнаружить и учесть. В качестве красителя используется сафранин, который обладает способностью хорошо окрашивать стенки клеток (0,25 г сафранина растворяют в 100 мл 10%-ного этилового спирта). Количество окрашенных клеток в процентном отношении к площа-

ди листеца принимают за показатель токсичности сточной воды или различных поллютантов.

Методы биотестирования с использованием замедленной флуоресценции одноклеточных водорослей

Сущность метода заключается в следующем. По современным представлениям, первичные реакции живых систем на изменение условий среды локализованы в биомембранах, которые участвуют в транспорте растворенных веществ и служат местом первичного контакта с токсикантом. Поскольку сдвиги на мембранном уровне проявляются раньше, чем во всем организме, то можно утверждать, что функционирование мембранной системы является наиболее чувствительным индикатором стрессовой ситуации.

В случае использования водорослей такой системой служат хлоропласты, в которых локализован фотосинтетический аппарат, о состоянии и характере последнего можно судить по интенсивности замедленной флуоресценции или длительного послесвечения миллисекундного диапазона. Замедленная флуоресценция рассматривается как объективная количественная характеристика интенсивности фотосинтеза, а следовательно, и его продуктивности наряду с такими стандартными параметрами, как потребление CO_2 , выделение O_2 , прирост численности клеток.

Замедленная флуоресценция представляет собой индуцированную фотохемолуминесценцию, возникающую в результате предварительного освещения объекта. Регистрируемое послесвечение имеет низкий квантовый выход и поэтому не влияет на общую эффективность фотосинтеза и физиологическое состояние объекта.

В качестве тест-объектов используют одноклеточную морскую диатомовую водоросль *Phaeodactylum tricornutum*, микроводоросль сценедесмус *Scenedesmus quadricauda* Breb, *Chlorella vulgaris* и др.

В качестве критериев токсичности используют изменения уровня флуоресценции хлорофилла или численности клеток. Культивирование водорослей проводится при температуре 22 – 25 °С, 16-часовом световом дне и освещенности 4000 лк.

Биотестирование с микроводорослью сценедесмус вошло в

стандарт РФ.1.39.2001.00284 «Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей».

*Методики биотестирования, используемые для целей
государственного контроля в РФ*

В мировой практике для исследовательских целей используются более ста различных методик биотестирования. Для государственного контроля обычно применяют только те методики, которые внесены или пока еще не внесены в Госреестр, - РД 118-02-90.

Требования к внесенным в Госреестр методикам биотестирования изложены в ГОСТ 8.010-90 ГСИ «Методики выполнения измерений», с 1 июля 1997 г. – в ГОСТ Р.8.563-96 ГСИ «Методики выполнения измерений».

Методики, вносимые в Госреестр, относятся к категории федеральных природоохранных нормативных документов – ПНД Ф.

Предлагаемые методы биотестирования построены на одних и тех же принципах, стандартизованы процедуры биотестирования, культивирования тест-организмов.

Методики биотестирования для целей государственного контроля выбраны таким образом, чтобы использовать гидробионты не только из разных трофических уровней, важных для водных экосистем, но и обладающие различной чувствительностью к загрязнителям.

В России при осуществлении государственного контроля предложено при первичном исследовании токсичности вод обязательно использовать не менее двух стандартных методов биотестирования с тест-организмами из разных систематических групп. После экспериментальной проверки и выбора наиболее чувствительного к исследуемым водам тест-объекта для постоянного контроля используют тот метод биотестирования, который проявляет наибольшую чувствительность к данной воде. Методы биотестирования, рекомендованные для государственного экологического контроля, представлены в нижеследующей таблице.

Методы биотестирования, рекомендуемые для государственного экологического контроля

Метод биотестирования	Тест-организм	Критерий токсичности		Область применения
		острой	хронической	
1	2	3	4	5
По жизнедеятельности дафний	<i>Daphnia magna</i> Sr	Смертность 50 % особей за 96 ч	Достоверное снижение плодовитости за 30 сут в сравнении с контролем	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые, питьевые воды
По жизнедеятельности цериодафний	<i>Ceriodaphnia affinis</i>	Смертность 50 % особей за 48 ч	Достоверное снижение плодовитости за 7 сут в сравнении с контролем	То же
По ферментативной активности бактерий	Лиофилизированные мутантные бактерии <i>Escherichia coli</i>	Изменение интенсивности окрашивания исследуемой среды	–	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые воды, водные вытяжки из почв, донных осадков
По ингибированию роста водорослей	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scehedesmus guodricauda</i>	Изменение численности водорослей за 96 ч экспозиции	Изменение численности водорослей за 14 сут	Поверхностные, природные пресные сточные и очищенные сточные воды
По жизнедеятельности рыб	<i>Poecilia reticulata</i> Peters или <i>Brachydanio rerio</i> Hamilton Buchahan	Смертность 50 % особей за 96 ч	Достоверное снижение плодовитости за 30 сут экспозиции	То же
По хемотоксической реакции инфузорий	<i>Paramecium caudatum</i>	Хемотоксическая реакция	–	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые воды, водные вытяжки из почв, донных осадков

2. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПОЧВ

2.1. Особенности почв как объектов биотестирования

Почвы, депонируя значительную часть атмосферных загрязнений, служат индикаторами техногенной нагрузки на окружающую среду.

Основными экологическими функциями почв являются способность адсорбировать в толще загрязняющие вещества и удерживать их от проникновения в почвенно-грунтовые воды, продуктивность и пригодность для произрастания различных растений. Выполняя важные средообразующие функции, почва изменяет химический состав подземных вод и атмосферных осадков, регулирует содержание в воздухе O_2 , CO_2 , CH_4 и N_2 .

В условиях промышленных городов происходит техногенная трансформация свойств почв. По эффекту воздействия на городские почвы техногенные вещества могут быть объединены в две группы: педохимически активные вещества и биохимически активные вещества.

Педохимически активные, преобладающие в выбросах по массе изменяют кислотно-основные и окислительно-восстановительные условия в почвах. Это в основном нетоксичные или слаботоксичные элементы с высокими кларками – железо, кальций, магний, щелочные металлы и минеральные кислоты (H_2SO_4 , HNO_3 и др.). При достижении определенного предела подкисление или подщелачивание сказываются на видовом составе почвенной флоры и фауны.

Биохимически активные вещества, как правило, в больших концентрациях являются высокотоксичными для живых организмов (Hg, Cd, Pb, Ni, Cr, Cu и др.).

Особенностью загрязнения почв населенных мест химическими веществами является то, что загрязнения происходят одновременно от множества источников, в результате этого в почве накап-

ливается сложная многокомпонентная смесь химических веществ различной природы. Комбинированное и сочетанное воздействие различных факторов на педобионтов приводит к негативным изменениям в трофических цепях и деградации почв.

Накопление в почве вредных для живых организмов веществ вызывает изменение биологических свойств почв и появление токсических свойств. Под токсичностью почвы принято понимать снижение показателей тест-объекта в исследуемой почве или почвенной вытяжке по сравнению с контролем.

2.2. Методы определения фитотоксичности почв

По мнению М.А. Глазовской, предельно допустимый уровень загрязнения почв - это тот уровень, при котором начинают изменяться оптимальное количество и качество создаваемого вновь живого вещества, т.е. биологическая продуктивность.

Продуктивность почв прежде всего зависит от состава почвенного раствора (его кислотности, содержания тяжелых металлов, пестицидов, синтетических моющих средств, нефтепродуктов и элементов питания) и может быть оценена величиной фитотоксичности.

Фитотоксичность – свойство загрязненной почвы подавлять прорастание семян, рост и развитие проростков. Начало проявления фитотоксичности коррелируется с ПДК и ОДК. Уменьшение числа проростков в загрязненной почве по сравнению с контролем более чем в 2 раза свидетельствует о значительной деградации почв и снижении ее продуктивности, потере способности почвы к самоочищению, а также об изменении состава, численности и структуры микрофлоры и мезофауны.

При качественной оценке городских почв по химическим (рН) и биологическим показателям (фитотоксичность) выделяют следующие стадии деградации почв (см. таблицу).

В настоящее время наиболее полно изучено действие на растения тяжелых металлов. Токсическое действие тяжелых металлов на растения проявляется:

- 1) в изменении проницаемости клеточных мембран (Ag, Au, Cd, Cu, F, Hg, Pb);
- 2) реакции с тиольными группами (Ag, Hg, Pb);

3) конкуренции с жизненно важными метаболитами (As, Sb, Te, Se, W, F);

4) сродстве к фосфатным группам и активным центрам в АДФ и АТФ (Al, Be, Se, V);

5) замещении жизненно важных ионов, преимущественно макроэлементов (Cs, Li, Rb, Sr, Se);

6) захвате в молекулах позиций, занимаемых жизненно важными функциональными группами типа фосфата и нитрата (арсенат, фторид, борат, селенат, теллурат, вольфромат) (по А. Кобата-Пенднас, 1989).

Качественная оценка городских почв

Показатель	Степень деградации				
	Не деградирована	Слабо деградирована	Средне деградирована	Сильно деградирована	Очень сильно деградирована
Снижение продуктивности, %	Менее 5	25	25 – 50	50 – 75	75 и более
Величина pH	6,5 – 7,0	5,5 – 6,5	5,5 – 4,5	4,5 – 4,0	Более 4
Кратность уменьшения всхожести	1,1	1,1 – 1,3	1,3 – 1,6	1,6 – 2,0	Менее 2

Тяжелые металлы являются протоплазматическими ядами, токсичность которых увеличивается с возрастанием атомной массы.

Многие тяжелые металлы ингибируют активность ферментов, образуют комплексные соединения с органическими веществами, легко проникающие через клеточные мембраны, связывают сульфаты, фосфаты, обычные метаболиты, нарушая обмен веществ, усиливают деградацию некоторых важных соединений, например АТФ.

Фитотоксичность обычно определяют при мониторинге химически загрязненных почв, выявлении зон экологических бедствий и экологических катастроф, оценке возможности использования химически загрязненных почв для производства сельскохозяйственной продукции или при оценке возможности использования в качестве мелиорантов или удобрений различного рода отходов: осадков сточных вод, различного рода компостов, гидролизного лигнина.

В настоящее время используются различные методы опреде-

ления фитотоксичности почв: метод проростков, метод определения депрессии гуттации, или выделения влаги кончиками листьев растений при опережающем росте корней по сравнению с листьями, и др. Метод определения фитотоксичности, предложенный Реппо (1979), основан на торможении ростовых процессов в условиях избыточного содержания тяжелых металлов и снижении гуттации.

Фитотоксичность различных тяжелых металлов можно определять по формуле Удовенко:

$$K_m = [(P_k - P_o) C_k / (P_k C_o)],$$

где K_m – коэффициент токсичности;

P_k – сухая масса растения в контроле;

P_o – сухая масса растения в опыте (в присутствии токсиканта);

C_k – содержание металла в сухой массе растения в контроле;

C_o – содержание металла в сухой массе растения в опыте.

Более просты в использовании методы определения фитотоксичности по ингибированию прорастания семян и роста проростков. При выборе тест-культур желательно соблюдение следующих условий:

– иметь быстро прорастающие семена;

– в качестве тест-объектов выбирают семена тех растений, которые выращивают в хозяйствах изучаемого региона. Так, для изучения дерново-подзолистой почвы используют овес как представителя злаковых несимбиотических растений и горох как представителя бобовых, способных к азотфиксации;

– в опытах целесообразно одновременно использовать азотфиксирующие и не фиксирующие азот растения.

Для всесторонней оценки влияния загрязнения на токсичность почвы учитывают также ряд показателей, принятых в семеноводстве: всхожесть, энергию прорастания, дружность прорастания, скорость прорастания.

Всхожесть – число проросших семян, выраженное в процентах от общего количества семян.

Энергия прорастания – число семян, проросших за первые трое суток, выраженное в процентах от общего количества семян, взятых для проращивания.

Дружность прорастания – средний процент семян, проросших за первые сутки прорастания: $D = \Pi/A$, где D – дружность прорастания; Π – полная всхожесть; A – число дней прорастания.

Скорость прорастания – сумма средних чисел семян, прорастающих ежедневно: $C = a + б/2 + в/3 + г/4 + ..$, где C – скорость прорастания; a – число семян, проросших за первые сутки; $б$ – число семян, проросших за вторые сутки; $в$ – число семян, проросших за третьи сутки; $г$ – число семян, проросших за четвертые сутки.

Кроме показателей прорастания рекомендуется определять интенсивность начального роста проростков. Этот показатель наиболее полно характеризует жизнеспособность растений. Для определения интенсивности начального роста проростков определяют длину корней, зеленых проростков, массу проростков за определенный промежуток времени (3 – 4 дня).

2.3. Другие методы определения токсичности почв

При экологическом мониторинге почв в зависимости от целей применяется также целый ряд других методов определения токсичности.

В качестве тест-объектов в зависимости от методики определения токсичности могут использоваться различные живые организмы: микроскопические водоросли, ракообразные, простейшие (тетрахимена пириформис), микроорганизмы.

При биотестировании почв с этими тест-объектами необходимой процедурой является получение почвенных вытяжек (почвенных растворов). В эти растворы обычно помещают используемые тест-организмы.

Биотестирование почвенных растворов по угнетению размножения зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* и желто-зеленой *Heterotrix exilis* показало, что более чувствительной к загрязнению почв тяжелыми металлами является водоросль *Heterotrix exilis*.

Для изучения влияния кислотных осадков на свойства почв предложен метод, основанный на изучении зависимости коэффициента размножения одноклеточной пресноводной водоросли *Chlorella Sp.* от кислотности субстрата. Установлено, что закисление почвы ведет к резкому снижению коэффициента размножения этой водоросли.

В качестве стандартного при биотестировании почв рекомендован метод с использованием микроводоросли сценедесмус *Scenedesmus quadricauda* Breb. Уровень токсичности оценивается по изменению либо флуоресценции хлорофилла, либо численности клеток.

В настоящее время накоплен обширный материал, позволяющий рассматривать почву как биохимическую систему, функционирование которой определяется действием различных ферментов. Поэтому методы биотестирования почв, основанные на определении ферментативной активности, считаются наиболее перспективными.

Известен метод определения токсичности почв, основанный на получении из нее водных вытяжек и количественной оценки ее токсичности по степени ингибирования одной из ключевых ферментных систем – люциферазной.

Широкое использование для оценки степени токсичности почв в качестве тест-организма инфузории *Tetrahymena pyriformis* обусловлено тем, что, во-первых, будучи одновременно клеткой и организмом, тетрахимена позволяет оценивать разнообразные воздействия как на клеточном, так и на более высоком уровне организации. Во-вторых, накоплен значительный материал, подтверждающий высокую чувствительность тетрахимен к токсическому воздействию тяжелых металлов, пестицидов, ароматических углеводородов, спиртов. В третьих, положительной стороной инфузорий как тест-объекта является простота культивирования и работы с ними.

При проведении государственного экологического контроля почв рекомендованы в качестве тест-объектов лиофилизированные мутагенные бактерии *Escherichia coli*, инфузории *Paramecium caudatum* (см. таблицу на с. 23).

Токсичность почв можно оценить также по подавлению роста азотобактера, засеянного в агаровую среду Эшби (метод Красильникова).

Известны методы определения токсичности различных поллютантов и загрязненных почв с помощью коллембол *Folsomia candida*.

В качестве тест-параметров регистрировались реакции коллембол и их гибель (полная неподвижность или «боковое положение»). Установлено, что коллемболы высокочувствительны к пестицидам, нефтепродуктам, фенолу и другим органическим веществам-загрязнителям.

Результаты тестирования субстратов, содержащих тяжелые металлы, показали, что к ним коллемболы малочувствительны. Низкая чувствительность к металлам у коллембол может быть связана, по мнению некоторых авторов, с имеющимся у них эффективным экскреторным механизмом, позволяющим интенсивно выводить ионы металлов из организма.

Тесты с коллемболами позволяют в течение 24 ч дать оценку зоотоксичности почв, донных отложений и твердых промышленных отходов, загрязненных органическими соединениями антропогенного происхождения.

В качестве тест-объектов применяется чаще всего коллембола *Folsomia candida* Willem. Накопительную культуру выращивают в стеклянных колбах вместимостью 0,5 л на субстрате из листьев липы в защищенном от яркого света месте при комнатной температуре. Для тестирования из колб отбирают животных длиной не более 1 мм, что соответствует размерам особей первых десяти возрастов, когда, по данным многих исследователей, коллемболы наиболее чувствительны к токсическим воздействиям.

3. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ОТХОДОВ

3.1. Цели биотестирования отходов

В Российской Федерации ежегодно образуется около 7 млрд т отходов, при этом вторично используется только 2 млрд т, т.е. около 28 %. На территории страны в отвалах и хранилищах накоплено около 80 млрд т твердых отходов, при этом изымаются из хозяйственного оборота сотни тысяч гектаров земли. Сконцентрированные в отвалах, хвостохранилищах и свалках отходы являются источниками загрязнения поверхностных и подземных вод, атмосферного воздуха, почв и растений.

Биотестирования отходов проводится при оценке их гигиенической и экологической опасности, рассмотрении возможности их использовании в качестве вторичного сырья в различных отраслях промышленности, а также мелеорантов, удобрений и т.п.

3.2. Тест-организмы, используемые для биотестирования отходов

В зависимости от целей и задач исследования отходов используются различные методы биотестирования. При этом в качестве тест-объектов могут быть использованы простейшие, ракообразные, микроскопические водоросли, семена различных растений, микроорганизмы.

Определение токсичности отходов производится по действию на тест-организмы водных экстрактов, полученных после смешивания подготовленных отходов с дистиллированной водой в соотношении 1:10, механического встряхивания или перемешивания, отстаивания и фильтрации.

В качестве стандартных при биотестировании отходов в нашей стране рекомендованы методы с использованием в качестве тест-

объектов рачков *Daphnia magna*, водорослей *Scenedesmus quadricauda* Breb, *Scenedesmus capricornutus* Printz, *Scenedesmus subspicatus* Chodat или *Chlorella vulgaris* Beijer.

Методика с использованием рачков основана на определении выживаемости дафний при воздействии веществ, содержащихся в водной вытяжке, по сравнению с контролем. Острую токсичность определяют по выживаемости дафний за 48 ч экспонирования. Критерием токсичности является гибель 50 % и более дафний за период времени до 48 ч в тестируемой воде по сравнению с контролем при условии, что в контроле гибель не превышает 10 %.

Методика биотестирования с использованием водорослей основана на оценке изменения интенсивности размножения водорослей под воздействием веществ, содержащихся в тестируемом экстракте из отходов, по сравнению с контролем.

Кратковременное биотестирование до 72 ч позволяет определить наличие острого токсического действия на водоросли. Критерием токсичности является достоверное снижение численности клеток в тестируемой пробе по сравнению с контролем.

4. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ И КОРМОВ

4.1. Цели биотестирования

По оценкам немецких токсикологов, более 70 % вредных веществ в организм человека поступает с пищевыми продуктами.

Загрязнение окружающей природной среды привело к загрязнению продовольственного сырья и кормов для сельскохозяйственных животных тяжелыми металлами, радионуклидами, пестицидами, нитрозоаминами и другими опасными для здоровья человека и животных веществами, поэтому в настоящее время для оценки токсичности и биологической ценности сырья и кормов широко используются методы биотестирования.

Оценку токсичности кормов, продовольственного сырья и других объектов проводят с помощью инфузорий *Tetra hymena pyriformis*, *Paramecium caudatum*, *Stylonychia mytilus*, *Colpoda steinii* и других (рис. 4.1).

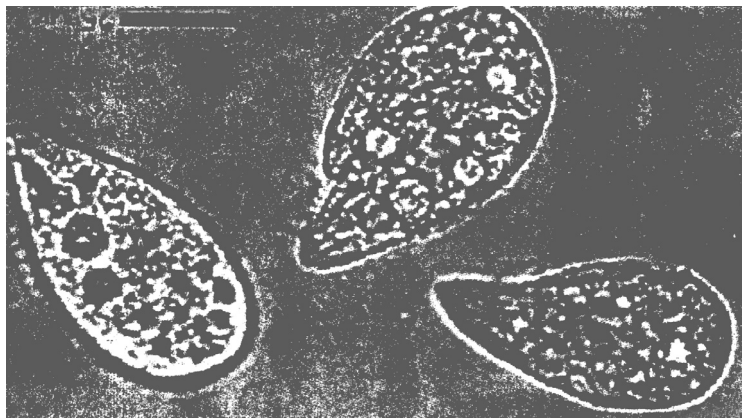


Рис. 4.1. Внешний вид инфузории *Tetrahymana pyriformis*

Инфузория *Tetrahymena pyriformis* имеет размеры около 25×50 мк. Она давно и достаточно успешно применяется для оценки токсичности и пищевой ценности продуктов питания человека и животных.

Также широко в токсикологической практике используются инфузории *Paramecium caudatum*, *Paramecium putrinum*, *Paramecium omrelii*, *Paramecium multinucleus*. Их применяют для определения фармакологических препаратов, косметических средств, кормовых и пищевых продуктов. Результаты биотестирования на *Paramecium* хорошо коррелируют с результатами, полученными в опытах *in vivo* на теплокровных животных.

4.2. Методики биотестирования

В ГОСТ 13496.7-79 описан способ получения экспрессной интегральной оценки кормов для животных на инфузориях *Stylonychia mytilus* (рис. 4.2).



Рис. 4.2. Инфузория *Stylonychia mytilus*:
1 – 3 – клетка в трех возрастных фазах роста;
4 – циста покоя

В практике токсикологических лабораторий для биотестирования кормов широко используют инфузорию *Colpoda steinii* (рис. 4.3).

Это широко распространенный вид, обитающий в почвах и пресных водоемах. Также инфузории применяют для эколого-токсикологического анализа объектов окружающей среды и кормов для крупного рогатого скота, свиней и птиц.

До исследования культуру *Colpoda steinii* хранят в лиофилизированном виде (в цистах покоя), за сутки до проведения анализов во флаконы вносят питательную среду и затем используют эти инфузории в соответствии с рекомендуемой методикой (см. п. 5.4).

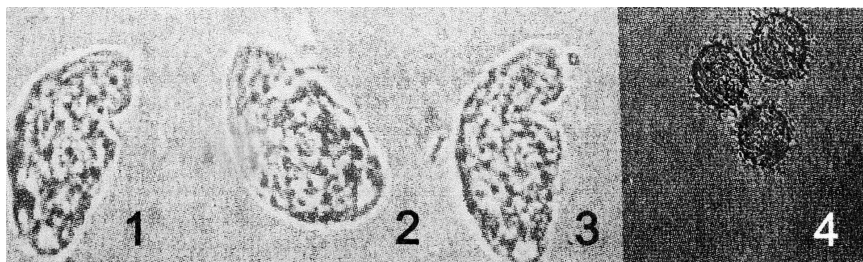


Рис. 4.3. Инфузории Colpoda steinii:
1 – 3 этапы процесса выделения с помощью сократительной вакуоли;
4 – цисты покоя

5. МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

5.1. Проведение биотестирования на дафниях

Пресноводные рачки *Daphnia magna* Straus в настоящие время считаются наиболее чувствительными и универсальными тест-объектами, поэтому применяются при биотестировании сточных и природных вод, донных осадков, почв и промышленных отходов. С помощью дафний определяют как острую, так и хроническую токсичность контролируемых объектов.

Характеристика тест-объекта

Дафнии обитают в стоячих и слабопроточных водоемах. На территории России они широко распространены, являются типичными мезосапробами, переносят осолонение до 6 ‰.

Тело дафний овальной формы сжато с боков, заключено в хитиновый прозрачный панцирь. Край панциря со спинной стороны вытянут в длинный шип. Створки на брюшной стороне не соединены, образуют щель. Тело дафний нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы, голова покрыта щитом, передний край которого клювообразно вытянут, образуя рострум. Под рострумом впереди прикреплены две передние маленькие антенны – антеннулы, «вооруженные» осязательными щетинками. Антеннулы сильнее развиты у самцов. В основании головы по бокам расположены две задние сильно развитые антенны, служащие для скачкообразного передвижения в толще воды.

Рост дафний в течение всей жизни неравномерный, с возрастом замедляется и связан с периодичными линьками. Выметанная молодь имеет 0,7 – 0,9 мм в длину, к моменту половозрелости самки достигают 2,2 – 2,4, самцы – 2,0 – 2,1 мм.

В природе летом, а в лаборатории при благоприятных условиях круглый год дафнии размножаются без оплодотворения – партеногенетически. При резком изменении условий существования

(недостаток пищи, перенаселенность, понижение температуры и т. д.) в популяции дафний появляются самцы и дафнии переходят к половому размножению. Длительность эмбрионального развития обычно 3 – 4 сут, а при повышении температуры до 25 °С – 46 ч. При истечении этого времени происходит вымет молоди. Партеногенетические поколения следуют одно за другим каждые 3 – 4 сут. В природе дафнии живут в среднем 20 – 25 сут, а в лаборатории при оптимальном режиме 3 – 4 месяца и более.

Источником питания дафний в природных водоемах являются бактерии, одноклеточные водоросли, детрит, растворенные органические вещества. Интенсивность потребления корма зависит от его характера, концентрации в среде, температуры, возраста рачков и т.д.

Оптимальное содержание растворенного кислорода для роста и размножения дафний 6 – 7 мг/л. Они устойчивы к ухудшению кислородного режима – выживают при уменьшении концентрации растворенного в воде кислорода до 2 мг/л, что связано с их способностью синтезировать гемоглобин. Повышение содержания гемоглобина в крови дафний отмечено при понижении концентрации растворенного кислорода. В этом случае рачки приобретают красноватый цвет вместо розово-желтого при благоприятных условиях.

Содержание культуры дафний в лабораторных условиях

Исходный материал для культивирования (водоросли, дафнии) можно получить в учреждениях, занимающихся биотестированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности, чувствительность которой к модельному токсиканту соответствует диапазону 0,9 – 2 мг/дм³ K₂Cr₂O₇. Измеряемые с помощью этой культуры тест-параметры соответствуют установленным нормам погрешности.

Культуру дафний выращивают в климостате, люминостате, боксе или помещении, не содержащем токсических паров или газов. Оптимальная температура для культивирования дафний и биотестирования 20 ± 2 °С, освещенность 400 – 600 лк при продолжительности светового дня 12 – 14 ч. Не допускают освещения дафний прямыми солнечными лучами. Стеклопосуду для содержания дафний моют питьевой содой, хромовой смесью или соляной кислотой. Нельзя использовать для мытья синтетические моющие средства и органические растворители. В помещении, где находятся дафнии, не проводят обработку инсектицидами, не хранят летучие вещества и не работают с ними. Для культивирования дафний используют

водопроводную воду, которую отстаивают и насыщают кислородом с помощью аквариумных компрессоров не менее 7 сут. Используют также природную воду из незагрязненных водоемов. Вода для культивирования должна удовлетворять следующим требованиям: рН 7,0 – 8,2; жесткость общая 3 – 4 ммоль/дм³; концентрация растворенного кислорода не менее 6,0 мг/л.

Оптимальная плотность культуры – 25 половозрелых самок в 1 л воды. Раз в 7 – 10 сут половину объема воды в сосуде с культурой дафний заменяют на свежую; удаляют сифоном скопившийся на дне осадок и при большой плотности культуры ее прореживают. Не рекомендуется аэрировать воду в сосудах с дафниями.

Кормом для дафний служат зеленые водоросли (хлорелла или сценедесмус) и хлебопекарные дрожжи. Культуру зеленых водорослей выращивают на одной из искусственных питательных сред (табл. 5.1).

Водоросли вносят в культуру дафний из расчета 1 мл суспензии (600 – 1000 млн кал/мл) на 1 л воды.

После того как окраска питательной среды становится интенсивно зеленой, водоросли отделяют от культивационной среды центрифугированием или отстаиванием в холодильнике при температуре от +2 до +2,5 °С в течение 7 – 14 дней с последующим отделением супернатанта. Для использования в качестве корма суспензия хранится до 30 сут.

Таблица 5.1
Состав питательных сред для культивирования водорослей

Реактив	Содержание в среде, г/л		
	Тамия	Успенского № 1	Прага
KNO ₃	5,00	0,025	0,100
K ₂ HPO ₄	–	–	0,010
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	–	0,100	–
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,50	0,025	0,010
KH ₂ PO ₄	1,25	0,025	–
K ₂ CO ₃	–	0,0345	–
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,003	–	–
FeCl ₃ · 6H ₂ O	–	–	0,001
Микроэлементы*	1 мл/л	1 мл/л	1 мл/л

* Раствор готовят отдельно:

A₃BO₃ – 2,86 г/л; MgCl₂ · 4H₂O – 1,81 г/л; ZnSO₄ · 7H₂O – 0,222 г/л; MgO₃ – 17,61 мг/л; NH₄VO₃ – 22,96 мг/л.

Дафний кормят 1 – 2 раза в неделю хлебопекарными дрожжами.

Для приготовления дрожжевой суспензии 1 г свежих или 0,5 г сухих хлебопекарных дрожжей заливают 100 см³ дистиллированной воды и оставляют на 30 мин для набухания.

Хранят суспензию в холодильнике сутки. Перед кормлением дрожжевую суспензию тщательно перемешивают.

Дрожжевую суспензию вносят в культуру дафний из расчета 3 мл суспензии на 1 л воды.

Подготовка посуды для биотестирования

Обычно используют посуду из пластика, а при наличии в пробе нефти, углеводов, моющих средств и пестицидов – в банке из темного стекла.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Её промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью), затем тщательно водопроводной водой, затем 3 – 4 раза дистиллированной водой. Посуду сушат в сушильном шкафу при 160 °С в течение часа. Не разрешается пользоваться для мытья посуды синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями.

Химически чистую посуду для биотестирования с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками хранят в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или закрытых полках, стеллажах и т.п.

Подготовка культивационной воды

Культивационную воду используют для культивирования дафний и в качестве контрольной при биотестировании.

Для подготовки культивационной воды питьевую воду отстаивают и аэрируют аквариумным компрессором в течение 3 сут в бутылках из бесцветного стекла в присутствии высшей водной растительности (2 – 3 г по воздушно-сухому весу любой аквариумной растительности на 1 л питьевой воды).

При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества допускается использование поверхностной пресной или грунтовой воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм.

Культивационная вода должна удовлетворять следующим требованиям:

- отсутствие органических загрязняющих веществ, хлора, токсических веществ и антагонистических для дафний организмов;
- рН 6,5 – 8,5;
- концентрация растворенного кислорода не менее 5 мг/дм³ (если концентрация растворенного кислорода в контрольной и разбавляющей воде ниже 5 мг/дм³, последняя аэрируется при помощи аквариумного компрессора до начала биотестирования);
- температура 25 ± 1 °С.

При использовании в силу необходимости культивационной воды, не отвечающей требованиям установленного качества, все отклонения отмечаются в протоколе испытаний.

Оценка чувствительности дафний

Контроль качества оценки токсичности воды проводят один раз в квартал по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту – двуххромово-кислороду калию ($K_2Cr_2O_7$). Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 24 ч гибнет 50 % дафний, составляет 0,9 – 2,0 мг/дм³.

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования организмов на другие токсиканты и тем более их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, нарушения, допускаемые в процессе культивирования организмов и в условиях проведения опытов.

Процедура определения диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант

Определяют ту концентрацию модельного токсиканта, при которой за 24 ч гибнет 50 % подопытных организмов. Для этого на основании стандарт-титра методом последовательных разбавлений готовят серии растворов двуххромовокислого калия в разбавляющей (культивационной) воде с концентрациями 0,5; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/дм³.

Испытания на дафниях проводят в соответствии с методикой в трех независимых опытах.

Если концентрация двухромовокислого калия, вызвавшая острую токсичность, находится в интервале 0,9 – 2,0 мг/дм³, то чувствительность культуры дафний соответствует необходимым требованиям, она может быть использована при биотестировании.

Если концентрация модельного токсиканта, вызвавшая острую токсичность, не находится в данном интервале, то следует проверить точность приготовления исследуемых растворов, условия проведения опытов. Если ошибки при проведении опытов исключены, необходимо сменить культуру тест-организмов, т.е. взять исходный материал в учреждениях, где он имеется.

Условия биотестирования

Чтобы получить исходный материал для биотестирования, 30 – 40 самок дафний с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей, за 1 – 3 сут до биотестирования пересаживают в 0,5 – 1,0 л емкости (стаканы, кристаллизаторы) с водой для культивирования, в которую перед посадкой дафний вносят корм. После появления молоди (каждая самка может выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослые особи удаляют. Односуточных дафний используют при кратковременном биотестировании, а двухсуточных самок – при длительном биотестировании.

Перед началом биотестирования в исследуемом растворе определяют концентрацию растворенного кислорода, которая должна быть не менее 6,0 мг/л. Если она ниже 6,0 мг/л, то перед биотестированием раствор аэрируют с помощью микрокомпрессора. В процессе биотестирования раствор аэрировать не рекомендуется. Биотестирование проводят в климостате, люминостате, боксе или помещении, в котором отсутствуют токсичные пары или газы, при оптимальном температурном и световом режимах. Результаты биотестирования считают правильными, если гибель дафний в контроле не превышает 10 %, концентрация растворенного в тестируемом растворе кислорода в конце биотестирования составляет не менее 2 мг/л.

Для приготовления разбавлений исследуемых вод используется культивационная вода. Поверхностные, пресные, грунтовые воды

с неизвестной степенью токсичности анализируются в 100-, 50-, 25- и 10%-ной концентрациях.

Сточные воды с неизвестной степенью токсичности разбавляются с коэффициентом 0,3 и анализируют в 100-, 30-, 10-, и 1%-ной концентрациях. При необходимости исследования большего набора разведений вод их разбавляют с коэффициентом 0,5 и анализируют в 100-, 50-, 25-, 12,5-, 6,25-, 3,12-, 1,5- и 0,78%-ной концентрациях. При заведомо ожидаемой высокой токсичности исследуемые воды анализируют в 10-, 3-, 1-, 0,3- и 0,1%-ной концентрациях.

После получения предварительных или окончательных результатов биотестирования при необходимости готовят дополнительные разбавления.

Отбор проб для биотестирования

Оценка токсичности сточных вод должна проводиться ежеквартально. Отбор проб проводится не ранее чем через 3 – 6 ч после начала работы предприятий, биотестирование – в день отбора проб.

Биотестирование снега проводится в марте перед началом его таяния. Отбор проб снега для биотестирования производится специальными полихлорвиниловыми пробоотборниками с участков нетронутого снежного покрова на всю его мощность, не доходя 5 см до почвы во избежание загрязнения пробы грунтом.

Для получения достоверных результатов рекомендуется брать одну пробу на 1 км² на открытых площадях, удаленных на 150 – 200 м от воздействия автотранспорта или других локальных источников. Пробы снега растворяют при комнатной температуре и полученную воду фильтруют с использованием фильтровальной бумаги «белая лента».

Так как токсичными для тест-объектов являются лишь растворимые формы тяжелых металлов и других загрязнителей, то для биотестирования используется лишь жидкая фаза.

Отбор проб почвы для анализа и подготовку их для биотестирования проводят в соответствии с действующими методическими рекомендациями. Оценка токсичности почв проводится в весенне-летний и осенний сезоны.

Отбор проб поверхностных вод, донных отложений и подго-

товку их к анализу проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 15.1.5.05.-85 и ГОСТ 17.1.5.10.-88.

Экотоксикологическая оценка поверхностных вод и донных отложений проводится во все сезоны года.

Отбор проб при биотестировании отходов производится в соответствии с установленными рекомендациями по отбору проб отходов в разных отраслях промышленности. Обычно требуется не менее 2 л проб жидкости/шламов или не менее 1 кг твердых отходов. Хранят пробы при температуре менее 50 °С и анализируют не позднее чем через 7 дней.

Оборудование, материалы, реактивы

Кроме обычного лабораторного оборудования потребуются:

– люминостат (для культивирования дафний) или эквивалентное приспособление, позволяющее поддерживать искусственное освещение 500 – 1000 лк, температуру окружающего воздуха $(20 - 25) \pm 1$ °С;

– культиватор (для культивирования водорослей) или климостат, или эквивалентное приспособление, позволяющее поддерживать освещение лампами дневного света 3000 – 4000 лк, температуру окружающего воздуха $(22 - 28) \pm 2$ °С;

– мешалка лабораторная;

– весы лабораторные общего назначения;

– рНметр или аналоги;

– термометр лабораторный, цена наименьшего деления шкалы – 0,10 °С;

– микроскоп стереоскопический биологический универсальный типа МБС-1, МБС-2, увеличение 3,3-88х;

– подставка для стаканов вместимостью 30 см³;

– центрифуга лабораторная медицинская;

– сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения;

– холодильник бытовой для хранения проб $(2 - 4) \pm 10$ °С;

– автоматические пипетки-дозаторы вместимостью 0,1 – 0,2 см³;

– камера для счета элементов крови по Горяеву;

– аквариумный микрокомпрессор АЭН;

- лупа складная;
 - оксиметр с ошибкой измерения не более 0,5 мг O₂/л;
 - чашки кристаллизационные толстостенные вместимостью 2, 5, 10 дм³;
 - стекла предметные для микропрепаратов;
 - стекла покровные для микропрепаратов;
 - цилиндры вместимостью 25, 50, 100, 1000 см³ второго класса точности;
 - мензурки вместимостью 0,5 дм³;
 - колбы стеклянные лабораторные вместимостью 0,25, 1 и 2 дм³;
 - пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 см³;
 - воронки лабораторные;
 - стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм;
 - пипетки вместимостью 2 см³ с отрезанным и оплавленным концом для пересадки рачков;
 - фильтры стеклянные класса ПОР-40;
 - микропипетки 0,1, 0,2 см³;
 - сачки из шелковой ткани диаметром 2 см (изготавливают кустарно);
 - ткани шелковые (для муки и крахмала – мельничный газ)
- № 25 – 43 (число отверстий, приходящихся на 1 см соответствует номеру);

– вода дистиллированная;

Реактивы:

- магний сернокислый;
- калий двуххромовокислый;
- калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный;
- калий фосфорнокислый однозамещенный 3-водный;
- калий углекислый;
- кальций азотнокислый 4-водный;
- железо треххлористое 6-водное;
- марганец хлористый 4-водный;
- сульфат цинка 7-водный;
- аммоний ванадиевокислый мета;
- кислота соляная;
- кислота борная;

- натрий едкий;
- молибдена оксид;
- дрожжи хлебопекарные.

Тест-системы:

- культура зеленых водорослей (хлорелла или сценедесмус);
- культура тест-организмов (дафний) с характеристиками по «Определителю пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР (планктон и бентос)».

*Определение острой токсичности сточных вод с *Daphnia magna**

Для определения острого токсического действия сточной воды на сбросе в водный объект ее тестируют без разбавления. Объем пробы воды для биотестирования без разбавления 500 мл, с учетом разбавлений 1 л.

Стеклянной пипеткой вместимостью 2 см³ с отрезанным и оплавленным концом пересаживают в стакан по десять суточных дафний и переносят в химические стаканы с анализируемой и культивационной водой с помощью сачка из планктонной сетки или пастеровской пипеткой, отсасывают жидкость из стакана и осторожно, чтобы не повредить дафний, приливают отмеренный объем тестируемой воды.

Для тестирования отбирают по 100 мл анализируемой и культивационной воды в стаканчики на 150 мл. Каждую пробу исследуемой воды анализируют в трех повторностях. Повторность для контрольных проб также трехкратная. В каждый стакан помещают по 10 односуточных дафний и экспонируют их при температуре 22 ± 20 °С 96 ч. В течение всего времени биотестирования рачков не кормят. Результаты биотестирования считают правильными, если гибель дафний в контроле не превышает 10 % за весь период наблюдений и концентрация кислорода в тестируемой воде в конце опыта составляет не менее 2 мг/л.

Учет выживших дафний проводят через 1, 6, 12, 24, 48, 72 и 96 ч. Рачков считают выжившими, если они свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна не позднее 15 с после легкого покачивания стакана.

Расчет погибших дафний в тестируемой воде по сравнению с контролем рассчитывают по формуле

$$A = (X_k - X_m) 100/X_k, \%,$$

где X_k – среднеарифметическое количество дафний, выживших в контроле;

X_m – среднеарифметическое количество дафний, выживших в тестируемой воде.

Для определения степени острого токсического действия воды графическим методом рассчитывают:

ЛКР₅₀₍₉₆₎ – среднюю летальную кратность разбавления тестируемой воды, при которой гибнет 50 % рачков за 96-часовую экспозицию;

ЛКР₀₍₉₆₎ – минимальную кратность разбавления, при которой дафнии не гибнут за 96 ч.

Для этого на оси абсцисс откладывают логарифмы величин кратности разбавлений тестируемой воды, а на оси ординат – среднеарифметические величины выживаемости дафний в процентах к контролю. Полученные точки соединяют прямой. От точек на оси ординат, соответствующих 50- или 100%-ной выживаемости, проводят линии, параллельные оси абсцисс. Из точек пересечения этих линий с экспериментальной прямой опускают перпендикуляр на ось абсцисс и находят логарифмы величин кратности разбавлений, которые будут соответствовать искомым величинам ЛКР₅₀₍₉₆₎ и ЛКР₀₍₉₆₎.

Чем больше величины ЛКР₅₀₍₉₆₎ и ЛКР₀₍₉₆₎, тем токсичнее тестируемая вода. Степень токсичности можно также установить, рассчитав ЛТ₅₀ – среднее время гибели 50 % дафний в тестируемой воде. Для этого строят график в координатах: Т (продолжительность экспонирования, ч); А (выживаемость в процентах к контролю). От точки на оси ординат, соответствующей 50%-ной выживаемости, проводят линию, параллельную оси абсцисс. Из точки пересечения этой линии с экспериментальной прямой опускают перпендикуляр на ось абсцисс и находят искомую величину. Чем меньше ЛТ₅₀, тем токсичнее вода.

Определение хронической токсичности сточных и поверхностных вод с Daphnia magna

Для определения хронической токсичности сточных и поверхностных вод необходимо отобрать 1 л, а с учетом разбавлений – 2 л.

В химические стаканы переносят по 300 мл контрольной и тестируемой воды и по 10 двухсуточных рачков. Предварительно в каждый сосуд вносят одинаковое количество корма. Наблюдения за дафниями проводят от 20 до 30 дней. Содержат рачков при оптимальных условиях, кормят ежесуточно. Три раза в неделю в сосудах с дафниями производят смену контрольной и тестируемой воды на свежееотобранную. При смене воды дафний кормят за 3 ч до смены.

С момента появления молоди, в те дни, когда меняют воду, производят учет выживших исходных самок и выметанной молоди. Для этого самок с помощью стеклянной трубки с оплавленным концом или сачком пересаживают в заранее приготовленные сосуды с контрольной и тестируемой водой и подсчитывают их количество и количество появившейся молоди, которую удаляют.

После того как в контроле все исходные самки дадут по четыре помета, биотестирование заканчивают.

Для оценки хронической токсичности воды рассчитывают:

- процент погибших дафний в тестируемой воде для каждой серии разведений;
- среднее количество родившейся молоди на одну самку делением общего числа молоди, родившейся за время тестирования, на 10;
- достоверное отклонение в количестве родившейся молоди на одну самку по отношению к контролю.

Определение острого токсического действия с Ceriodaphnia

Для определения острого токсического действия проводится биотестирование исходной исследуемой воды и нескольких ее разбавлений.

Определение токсичности каждой пробы и каждого разбавления проводится в десяти параллельных сериях. В качестве контроля используют 10 параллельных серий с культивационной водой.

Биотестирование проводится с соблюдением всех требований к температуре, продолжительности фотопериода и качеству культивационной воды.

Биотестирование проводится в химических стаканчиках вместимостью 30 см³, которые заполняют 15 см³ исследуемой воды, в них помещают по одной цериодафнии не более 24-часового возраста (разница между возрастом рачков не более 8 ч). Цериодафний отлавливают из химических стаканчиков, в которых выращивается синхронизированная культура, пипеткой объемом 2 см³ (с резиновой грушей, отпиленным и оплавленным концом), помещают их по одной на сачок, через который вода сливается в отдельный химический стакан, после чего цериодафний сачком вносят в стаканчики с исследуемой водой. Посадку рачков начинают с контрольной серии; в исследуемые растворы цериодафний помещают, начиная с больших разбавлений (меньших концентраций) к меньшим разбавлениям. После каждой посадки в исследуемые растворы сачок тщательно промывается в сосуде вместимостью 2 дм³ с культивационной водой. Для работы с серией контроля должен использоваться отдельный сачок.

Для каждой серии исследуемой воды применяют 10 химических стаканчиков. Общее количество стаканчиков, используемых в опытах, равно удесятеренной сумме всех разбавлений плюс 10 для исходной воды, плюс 10 для контроля.

В экспериментах по определению острой токсичности цериодафний кормят перед началом эксперимента, а в последующие сутки – ежедневно.

В экспериментах по определению острой токсичности растворы не меняют.

Учет смертности цериодафний в опыте и контроле проводят через каждый час до конца первого дня опыта, а затем 2 раза в сутки ежедневно до истечения 48 ч.

Неподвижные особи считаются погибшими, если они не начинают двигаться в течение 15 с после легкого покачивания стакана.

Результаты наблюдений заносят в рабочий журнал

Если гибель цериодафний в контроле превышает 10 %, результаты опыта не учитываются, и он должен быть повторен.

После того как результаты эксперимента учтены, все цериодафнии из стаканчиков выбрасывают, каждую серию разбавлений из 10 стаканчиков сливают в химический стакан вместимостью 200 см³ и проводят измерения рН, температуры, содержания растворенного кислорода титриметрическим методом. Эти данные по каждой серии

разбавлений исходной воды и контролю также заносят в протокол результатов эксперимента.

Определение хронического токсического действия с Ceriodaphnia

Для определения хронического токсического действия продолжают острый эксперимент с использованием контроля и серии разбавлений, в которых острое токсическое действие не проявилось, или готовят новую серию разбавлений с учетом результатов острых опытов. За исходную воду принимается разбавление исследуемых вод, не вызвавшее острого токсического действия.

Определение токсичности каждой пробы и каждого разбавления проводится в 10 параллельных сериях и сопровождается 10 параллельными сериями контроля.

Биотестирование по определению хронического токсического действия проводится с соблюдением требований к температуре, продолжительности фотопериода и качеству культивационной воды. При несоблюдении этих условий продолжительность хронического эксперимента может увеличиться или его результаты будут сомнительны. Вынужденное нарушение требуемых условий следует отмечать в протоколе.

В экспериментах по определению хронического токсического действия кормят цериодафний перед началом эксперимента и в последующие сутки.

Смену растворов на новые осуществляют ежедневно из свежееотобранных проб или из проб, хранящихся в холодильнике при температуре от +2,5 до +4 °С.

Для смены растворов готовят 10 параллельных рядов испытуемых разбавлений (и контроль), аналогичных исходным, куда из старых растворов выжившие цериодафнии переносят при помощи сачка, на который их помещают пипеткой объемом 2 см³. При очередной смене среды исходных самок пересаживают в свежеприготовленные растворы, а старые растворы профильтровывают через сито из мельничного газа и на нем производят подсчеты родившейся молодежи и измерения физико-химических параметров.

Учет смертности и родившейся молодежи в опыте и контроле проводят два раза в день до конца хронического опыта.

Хронический опыт считается законченным, если в контро-

ле выжило 80 % испытуемых цериодафний, а 60 % и более из них дали три поколения молоди (первый помет при удовлетворительных условиях на 3 – 4 день и каждый следующий через 36 – 48 ч; при соблюдении удовлетворительных условий обычно это три помета за 7 сут эксперимента). Считают погибших цериодафний и прекращают эксперимент в стаканчиках с погибшей самкой. Родившуюся молодь подсчитывают (при помощи лупы или стереоскопического микроскопа) и выбрасывают.

Результаты экспериментов заносят в рабочий журнал.

Обработка экспериментальных данных по установлению острого токсического действия

При определении острой токсичности сточных, поверхностных пресных, грунтовых вод, смеси различных веществ, а также их разбавлений устанавливают:

– среднюю летальную кратность разбавления вод, вызывающую гибель 50 % тест-объектов за 48-часовую экспозицию – $LKP_{50(48)}$;

– безвредное разбавление вод, вызывающее гибель не более 10 % тест-объектов за 48-часовую экспозицию – $LKP_{10(48)}$;

Для определения острой токсичности исследуемой воды рассчитывается процент погибших цериодафний в тестируемой воде по сравнению с контролем (А):

– при $A \leq 10$ % тестируемая вода не оказывает острого токсического действия (безвредное разбавление);

– при $A \geq 50$ % тестируемая вода оказывает острое токсическое действие (средняя летальная кратность разбавления).

Если экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления, вызывающей 50%-ную гибель цериодафний за 48 ч экспозиции, то для получения точного значения $LKP_{50(48)}$ без выполнения дополнительных экспериментов используют графический или неграфический методы определения.

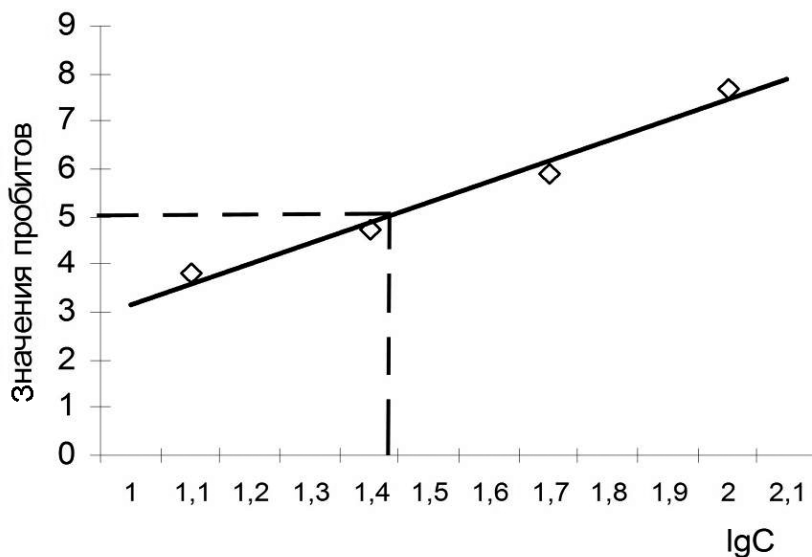
Графический метод определения $LKP_{50(48)}$

Чтобы получить на графике линейную зависимость, используется пробит-анализ. Результаты выполненных экспериментов вносят в табл. 5.2.

Значения пробитов устанавливаются по табл. 5.3.

По значениям пробитов и логарифмов чисел, взятых из табл. 5.2, строят график (см. рисунок). По оси абсцисс откладывают значения логарифмов процентных концентраций исследуемых вод, по оси ординат – пробиты от значений процента гибели цериодафний. Экспериментально полученные значения вносят в систему координат и через точки проводят прямую. Пробитное значение 5 соответствует 50%-ной гибели цериодафний (см. табл. 5.3). Из точки пересечения координаты пробитного значения 5 и проведенной прямой опускают перпендикуляр на ось абсцисс, точка пересечения, равная 1,44, является логарифмом концентрации сточной воды, вызвавшей гибель 50 % цериодафний за 48 ч экспозиции. Логарифм процентной концентрации исследуемой воды переводится в процентную концентрацию: $\lg C_{50} = 1,44$ соответствует процентной концентрации 27,54 %.

Таким образом устанавливается, что 27,44%-ная концентрация исследуемой сточной воды вызывает 50%-ную гибель тест-объектов за 48 ч, $\text{ЛКР}_{50(48)} = 27,54 \%$.



Линейная зависимость пробитного значения гибели цериодафний от логарифма концентраций исследуемых вод

Таблица 5.2

Экспериментальные данные

Концентрация сточных вод С, %	Десятичный логарифм концентрации lgC	Количество погибших цериодафний, %	Значение пробитов для гибели, %
3,12	0,494	0	–
6,25	0,796	0	–
12,50	1,097	10	3,72
25,00	1,398	40	4,75
50,00	1,699	80	5,84
100,00	2,000	100	7,33

Таблица 5.3

Значения пробитов

Гибель, %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,83	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,4	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

Неграфический метод определения ЛКР₅₀₍₄₈₎

Десятичный логарифм концентрации исследуемых сточных вод (lgC) обозначим x , а численные значения пробитов гибели церио-

дафний – у. Учитываются только те значения lgC, при которых наблюдается смертность. В результате испытаний получено n пар чисел

$$(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n),$$

по которым определяется линейная зависимость

$$y = kx + b.$$

Численные значения коэффициентов k и b вычисляют по формулам

$$k = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2},$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 \cdot \sum_{i=1}^n y_i - \sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}.$$

Для вычисления k и b используют расчетную табл. 5.4. В первом столбце таблицы помещают отобранные значения x_i (десятичный логарифм концентрации lgC), во втором - соответствующие им значения пробитов y_i , два других столбца рассчитывают.

Таблица 5.4

Данные для расчета коэффициентов k и b

x_i	y_i	x_{i^2}	$x_i y_i$
1,097	3,72	1,203	4,081
1,398	4,75	1,954	6,641
1,699	5,84	2,887	9,922
2,000	7,33	4,000	14,660
$\sum_{i=1}^4 x_i = 6,194$	$\sum_{i=1}^4 y_i = 21,64$	$\sum_{i=1}^4 x_i^2 = 10,044$	$\sum_{i=1}^4 x_i y_i = 35,304$

Вычисляют искомые параметры k и b по формулам при $n = 4$:

$$k = \frac{4 \cdot 35,304 - 6,194 \cdot 21,64}{4 \cdot 10,0444 - (6,194)^2} = 3,966,$$

$$b = \frac{10,044 \cdot 21,64 - 6,194 \cdot 35,304}{4 \cdot 10,044 - (6,194)^2} = -0,730.$$

Искомое уравнение регрессии

$$y = 3,966x - 0,730.$$

Определяют значение x , соответствующее 50%-ной гибели це-риодафний ($y = 5$):

$$x = \frac{y + b}{k},$$

$$x = \frac{5 + 0,730}{3,966} = 1,44.$$

Полученный логарифм процентной концентрации исследуемой воды переводят в процентную концентрацию $\lg C_{50} = 1,44$, что соответствует процентной концентрации 27,54 %, ЛКР₅₀₍₄₈₎ = 27,54 %.

Все полученные значения и расчеты по результатам острого эксперимента вносят в рабочий журнал и составляют сводную таблицу.

Оценка результатов эксперимента по установлению хронического токсического действия

Хроническую токсичность устанавливают при оценке эколого-токсикологических свойств веществ и препаратов, ПДК отдельных веществ. При этом определяют:

– концентрацию вещества, вызывающую хроническую токсичность за 7 сут и более экспозиции, если гибель це-риодафний составит не более 20 %, а в их плодовитости будет установлено досто-верное отклонение от контроля;

– безвредную концентрацию вещества, не вызывающую хроническую токсичность за 7 сут и более экспозиции, если гибель цериодафний составит не менее 20 %, а в их плодовитости не будет установлено достоверное отклонение от контроля.

При определении хронической токсичности вод, содержащих смеси различных веществ, а также их разбавлений устанавливают:

– кратность разбавления вод, вызывающую хроническую токсичность за 7 сут и более экспозиции, если гибель цериодафний составит более 20 %, а в их плодовитости не будет установлено достоверное отклонение от контроля;

– безвредную кратность разбавления вод, не вызывающую хроническую токсичность за 7 сут и более экспозиции, если гибель цериодафний составит менее 20 %, а в их плодовитости не установлено достоверное отклонение от контроля.

Для определения хронической токсичности воды рассчитывают:

– процент погибших цериодафний в тестируемой воде для каждой серии разведений;

– среднее количество родившейся молоди на одну самку делением общего числа молоди, родившейся за 7 дней и более, на 10 (или выживших из 10) самок для каждой серии разведений;

– достоверное отклонение в количестве родившейся молоди на одну самку по отношению к контролю.

Для расчета достоверного отклонения в количестве родившейся молоди на одну самку по отношению к контролю составляют таблицы результатов эксперимента.

Для статистической обработки результатов необходимо провести расчеты для каждой серии разбавлений и контроля и сопоставить полученные результаты. Проводят следующие расчеты:

А) определение среднеарифметического (\bar{x}) показателя плодовитости в контрольной и тестируемой воде:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

где x_i – количество молоди в i -м стаканчике;

n – количество параллельных серий (стаканчиков); определение среднеквадратичного отклонения σ :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}};$$

Б) определение ошибки среднего арифметического показателя плодovitости

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}};$$

В) определение показателя достоверности t_g разности двух сравниваемых величин:

$$t_g = \frac{\bar{x}_k - \bar{x}_t}{\sqrt{m_k^2 + m_t^2}},$$

где \bar{x}_k и \bar{x}_t – среднеарифметическое показателя плодovitости в контроле и тестируемой воде;

m_k^2 и m_t^2 – квадраты ошибок среднеарифметического в контроле и тестируемой воде.

Рассчитанный показатель достоверности сравнивают с критерием Стьюдента, для определения которого принимается уровень значимости $P = 0,05$ и определяется число степеней свободы f как

$$f = n_k + n_t - 2,$$

где n_k и n_t – число наблюдений (число стаканчиков) в контроле и тестируемой воде.

Поскольку при биотестировании на цеериодафниях серия каждого разведения и контроля состоит из 10 стаканчиков, $n_k = n_t = 10$, следовательно, $f = 18$.

Критерий достоверности Стьюдента для уровня значимости

$P = 0,05$ и степени свободы $n_k + n_t - 2$ определяется по табл. 5.5.

Таблица 5.5

Значения критерия Стьюдента t_{st}

f	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
t_{st}	12,7	4,30	3,18	2,78	2,57	2,45	2,36	2,31	2,26	2,23	2,20

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
2,18	2,16	2,14	2,13	2,12	2,11	2,10	2,09	2,09	2,08	2,07	2,07

24	25	26	27	28	29	30
2,06	2,06	2,06	2,05	2,05	2,05	2,04

Если рассчитанное $t_g \geq t_{st}$, то изменения в плодovitости цериодафний достоверны, а неслучайны.

В этом случае принимают, что исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие. Если $t_g \leq t_{st}$, то выявленные различия в плодovitости цериодафний в тестируемой воде и контроле недостоверны, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хронического токсического действия.

Форма регистрации условий и результатов биотестирования в рабочем журнале приведена в табл. 5.6 – 5.8.

Таблица 5.6

Форма регистрации условий и результатов биотестирования в рабочем журнале

1	Дата, время отбора проб	11.30, 10 марта 2007 г.
2	Место отбора	Очистные сооружения г. Троицка. Очищенная сточная вода, выходящая из вторичного отстойника
3	Используемые тест-организмы, возраст	Цериодафнии. Возраст менее 24 ч, разница между особями не более 8 ч
4	Место биотестирования и условия	Люминостаг, $t = 25 \pm 1$ °С, фотопериод: 16 ч световой, 8 ч ночной, освещенность искусственная (550 лк)

Окончание табл. 5.6

5	Режим кормления	0,1 см ³ суспензии дрожжей и 0,1 см ³ суспензии водорослей <i>Chlorella</i> на 15 см ³ исследуемой воды ежедневно
6	Повторности для каждой концентрации	10
7	Смена растворов	В остром опыте растворы не менялись. В хроническом смена раствора проводилась ежедневно
8	Исследуемые концентрации сточных вод	100, 25, 12,5, 6,25, 3,12 %
9	Соответствующая степень разбавления сточных вод	Без разбавления; разбавления в 3, 7, 15, 31 раз
10	t , pH, O ₂ в исследуемой воде	Измерения перед началом биотестирования, при смене растворов и при завершении экспериментов. Все показатели в пределах установленных в методике оптимальных значений
11	Средняя летальная кратность разбавления в остром опыте ЛКР ₅₀₍₄₈₎	Кратность разбавления в 2,6 раза
12	Безвредное разбавление в остром опыте ЛКР ₁₀₍₄₈₎	Кратность разбавления в 7 раз
13	Кратность разбавления, вызывающая хроническую токсичность за 7 сут эксперимента	Кратность разбавления в 15 раз
14	Безвредная кратность разбавления, не вызывающая хроническую токсичность за 7 сут эксперимента	Кратность разбавления в 31 раз
15	Данные гидрохимических анализов исследуемой воды	В приложении к акту проверки

Таблица 5.7

*Результаты биотестирования по смертности и плодовитости
цериодафний в 7-дневном эксперименте*

Концентрация исследуемой воды, %	Время от начала биотестирования, сут						
	Гибель цериодафний, %, за время от начала биотестирования, сут						
	1	2	3	4	5	6	7
100,00	70	100	100	100	100	100	100
50,00	10	60	70	70	70	70	80
25,00	10	10	30	30	40	40	40
12,50	0	0	0	0	10	10	10
6,25	0	0	0	0	0	0	0
3,12	0	0	0	0	0	0	0
Контроль	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 5.8

Общее количество родившейся молоди в 7-дневном эксперименте

Номер стаканчика	Общее количество родившейся молоди по истечении 7 сут при концентрации сточной воды, %			
	12,5	6,25	3,12	Контроль
1	2	0	12	12
2	0	0	8	16
3	0	6	10	8
4	0	0	6	8
5	0	0	14	10
6	0	0	10	6
7	0	0	6	11
8	0	0	12	8
9	0	0	13	12
10	0	0	8	8

5.2. Определение токсичности почв с инфузорией *Tetrahymena pyriformis*

Принцип метода

Метод основан на приготовлении из проб почв стерильных водных вытяжек, внесении их в среду с безбактериальной культурой инфузории *Tetrahymena pyriformis* штамм GL, инкубировании при температуре 28 °С в течение 24 ч и подсчете плотности культуры в камере Горяева или Фукса-Розенталя. Критерием токсичности почвы является степень задержки роста культуры инфузорий под действием почвенной вытяжки по сравнению с контролем.

Подготовка почвенных вытяжек

Отобранные пробы почвы, подлежащей исследованию на токсичность, растирают в фарфоровой чашке, просеивают через сито Кноппа № 4, доводят до воздушно-сухого состояния. Параллельно подготавливают пробу из контрольной, заведомо чистой почвы (почвенного эталона). Навеску из приготовленной пробы почвы массой 50 г переносят в колбу вместимостью 500 мл, приливают 250 мл дистиллированной воды, закрывают колбу каучуковой пробкой и взбалтывают в течение 3 мин. Полученную вытяжку фильтруют сначала через крупнопористый бумажный фильтр, а затем для достижения стерильности – через мембранный фильтр № 3 под вакуумом в стерильную колбу вместимостью 250 мл.

Для оценки токсичности почвы вытяжки стерильно вносят в среду с безбактериальной культурой инфузорий *Tetrahymena pyriformis* штамм GL.

Проведение биотестирования

В пробирку с 5 мл суточной культуры плотностью 4 тыс. особей в 1 мл среды стерильно вносят 5 мл почвенной вытяжки. Для создания необходимой исходной плотности культуры (4 тыс. особей в 1 мл среды) сначала определяют плотность суточной культуры инфузорий, в которой содержится 20 тыс. инфузорий; этот объем вносят в стерильную пробирку и доводят стерильной гидролизиновой средой до 5 мл. После внесения почвенной вытяжки и культивирования тетрахимен при 28 °С в течение 24 ч оценивают состояние культуры

по изменению показателя ее плотности. Исследование почвенной вытяжки проводят двукратно.

Для определения плотности культуру фиксируют 5%-ным раствором формалина, после тщательного перемешивания вносят в камеру Горяева или Фукса-Розенталя и подсчитывают тетрахимен во всей камере. Плотность культуры рассчитывают по формулам:

– для камеры Горяева:

$$P = \frac{1000N}{0,9};$$

– для камеры Фукса-Розенталя:

$$P = \frac{1000N}{3,2},$$

где N – число тетрахимен в камере.

Отбор культуры из одной пробирки и заполнение ею камеры проводят шесть раз. Подсчет плотности культуры в камере принимается за единицу наблюдения. При исследовании почвенной вытяжки с двукратным повторением и шестикратным подсчетом инфузорий в камере общее число наблюдений для каждой пробы почвы равно 12.

Влияние экстрагированных из почвы загрязняющих веществ оценивают по степени задержки культуры в сравнении с контролем (контроль – плотность культуры, выросшей в среде с добавлением водной вытяжки из эталонной почвы).

Если плотность культуры под действием исследуемой почвенной вытяжки уменьшается вдвое по сравнению с контролем (наблюдается протозооцидный эффект), то почва высокотоксичная, сильно загрязнена водорастворимыми поллютантами и опасна для биоты. Если плотность культуры после инкубации осталась на исходном уровне (2 тыс. особей в 1 мл) или увеличилась, но в меньшей степени, чем в контроле, то почвенная вытяжка дает протозоостатический эффект. Если он составляет от 15 до 50 %, то вытяжка малотоксична, а почва слабо загрязнена токсическими веществами и относительно безопасна. Если протозооцидный эффект составля-

ет от 50 до 100 %, то почву можно считать сильно загрязненной и опасной для педобионтов.

Подготовка тест-объекта к биотестированию

При изучении токсичности почвы непосредственно в опыте используют суточную культуру тетрахимен, так как через 24 ч культивирования культура в своем развитии проходит лог-фазу и тетрахимены приобретают наибольшую способность к размножению.

Для своевременного получения суточной культуры в лаборатории, выполняющей экотоксикологические исследования почвы с использованием тетрахимен, должна поддерживаться музейная линия *Tetrahymena pyriformis* штамм GL (линия А) и рабочая линия инфузорий (линия В). Кроме того, непосредственно перед началом биотестирования необходимо накопление больших масс тетрахимен, для чего выращивается трехсуточная культура – линия С.

Музейную линию А ведут на среде печень с фосфатным буфером в термостате при 28 °С. Для приготовления указанной среды стерильно берут печень белой беспородной мыши или крысы отмывают стерильным фосфатным буфером с рН 7,3 – 7,4, нарезают на необходимые кусочки, которые стерильно переносят в пробирки и заливают 10 мл фосфатного буфера. Среду стерилизуют автоклавированием в течение 30 мин при 1,5 атм. Линию А пересеивают через 2 мес.

Культивирование линии В и выращивание больших масс тетрахимен осуществляют на гидролизованной среде с дрожжевым экстрактом (рН 7,25). Для приготовления среды 100 мл гидролизата казеина и 1,6 мл 10%-ного дрожжевого экстракта растворяют в 800 мл стерильной дистиллированной воды, разливают в стерильные круглодонные колбы по 200 мл и автоклавируют 30 мин при 1,0 атм. Для получения линии В на гидролизиновую среду, разлитую по 10 мл в пробирки, пересеивают линию А. Линию В ведут на указанной среде при температуре 28 °С и пересеивают через месяц.

При изучении токсичности почвы линию В пересеивают в пробирки с гидролизиновой средой для накопления 3-суточной культуры (линия С). Используемую непосредственно в опыте суточную культуру тетрахимен получают в колбах накопления (плоскодонные колбочки со слоем среды не выше 1 см, так как тетрахимена – аэроб) путем посева линии С на гидролизиновую среду в соотношении 1:10.

Оборудование и реактивы:

1. Автоклав.
2. Термостат.
3. Весы лабораторные технические.
4. Мембранные фильтры № 3.
5. Бумажные фильтры.
6. Сито Кноппа № 4.
7. Фарфоровые чашки.
8. Воронки диаметром 10 – 15 см.
9. Камера Горяева или Фукса-Розенталя.
10. Пробирки вместимостью 10 мл.
11. Колбы круглодонные вместимостью 300 – 400 мл.
12. Колбы конические вместимостью 250, 500 и 1000 мл.
13. Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 мл.
14. Цилиндры стеклянные вместимостью 10, 200 и 1000 мл.
15. Фосфатный буфер с рН 7,3 – 7,4.
16. Гидролизат казеина.
17. 10%-ный – дрожжевой экстракт.
18. Музейная линия инфузорий *Tetrahymena pyriformis* штамм GL.
19. Печень беспородной белой мыши или крысы.

5.3. Оценка токсичности поллютантов, содержащихся в сточных водах, донных отложениях, твердых отходах, почвах, по прорастанию семян кресс-салата

Характеристика тест-объекта

Тест на прорастание семян кресс-салата хорошо разработан и в настоящее время широко используется для оценки токсичности различных поллютантов в объектах окружающей среды.

Кресс-салат – однолетнее овощное растение, обладающие повышенной чувствительностью к загрязнению природных объектов, сточных вод и твердых промышленных отходов тяжелыми металлами, пестицидами, а также к загрязнению воздуха газообразными выбросами автотранспорта. Этот тест-организм отличается быстрым прорастанием семян и почти стопроцентной всхожестью, которая заметно уменьшается в присутствии загрязнителей.

Кроме того, побеги и корни этого растения под действием загрязнителей подвергаются заметным морфологическим изменениям (задержка роста и искривление побегов, уменьшение длины и массы корней, а также общей массы растения).

Кресс-салат как тест-объект удобен еще и тем, что действие стрессоров можно изучать одновременно на большом числе растений при небольшой площади исследуемой почвы (чашки Петри, кюветы, поддон и т.п.). Семена кресс-салата прорастают уже на третий – четвертый день, и на большинство поставленных вопросов исследования можно получить ответ в течение 15 – 20 дней (например при изучении хронического действия).

Подготовка семян к биотестированию

Для биотестирования рекомендуют использовать свежие семена, так как при длительном хранении семян на их поверхности развивается сапрофитная микрофлора и при прорастании в условиях влажных камер они могут загнить и выбыть из опыта. Во избежание этого рекомендуется перед закладкой опытов провести протравливание семян. Для этого сухие семена погружают в 1%-ный раствор перманганата калия ($KMnO_4$) на 30 мин, затем промывают их дистиллированной водой, используя два слоя марли или фильтровальную бумагу. После этого семена переносят на сухую фильтровальную бумагу и обсушивают на воздухе.

Каждую партию семян, предназначенных для биотестирования, предварительно проверяют на всхожесть. Для этого семена проращивают в чашках Петри, в которые насыпают промытый речной песок слоем в 1 см. Сверху песок накрывают фильтровальной бумагой. Песок и бумагу увлажняют отстоянной водопроводной или дистиллированной водой до полного насыщения. На фильтровальную бумагу раскладывают определенное количество семян (20 или 50) на одинаковом расстоянии друг от друга. Проращивание ведут в лаборатории или в термостате при температуре 23 – 25 °С в течение 3 – 4 сут. Нормой считается прорастание 90 – 95 % семян. Процент проросших семян от числа посеянных называют всхожестью.

Определение фитотоксичности почв

Перед биотестированием почвы высушивают до воздушно-сухого состояния, удаляют из нее посторонние включения и остатки растений, растирают в фарфоровой чашке и просеивают через сито с отверстиями размером 2 мм. В каждую чашку Петри переносят одинаковые массы подготовленной контролируемой почвы. Предварительно массу почвы устанавливают экспериментально. Толщина слоя почвы в чашках Петри должна быть равна 1 см. Почву в чашках накрывают фильтровальной бумагой. Перед раскладкой семян почву и бумагу увлажняют дистиллированной или отстоянной водопроводной водой до полного насыщения. Объем воды определяется в предварительных опытах, и добавляют воду в одинаковых количествах во все пробы. Семена кресс-салата по 20 – 50 штук раскладывают в чашках на одинаковом расстоянии друг от друга. Чашки Петри помещают в термостат и выдерживают при температуре 23 – 25 °С в течение 3 – 4 сут. Каждый опыт проводят в трех повторностях. Параллельно в трех повторностях проводят опыт с чистым субстратом (либо с дистиллированной или отстоянной водопроводной водой).

При длительных экспериментах чашки Петри из термостата переносят в лабораторию либо климатостат и продолжают наблюдения за ростом и развитием проростков. При длительных опытах в чашки Петри помещают не более 20 семян. При этом следует учитывать, что большое влияние на всхожесть семян, рост и качество проростков оказывают водно-воздушный и световой режимы и плодородие субстрата. В гумусированной, хорошо аэрированной почве (черноземе, верхнем горизонте серой лесной почвы) всхожесть и качество проростков всегда лучше, чем в тяжелой глинистой почве. Поэтому в качестве субстрата для контроля следует брать почву того же типа, что и для опытов.

Кроме загрязнения почвы, на кресс-салат оказывает влияние состояние воздушной среды, поэтому нельзя проводить опыты в химических лабораториях, воздух которых загрязнен парами кислот, аммиака, оксидами азота, серы и другими токсическими веществами.

Для обработки результатов биотестирования можно выбрать любой параметр, описанный в п. 2.2.

Для качественной оценки токсичности почв по всхожести используются следующие уровни загрязнения.

1. Загрязнение отсутствует

Всхожесть семян достигает 90 – 100 %, всходы дружные, проростки крепкие, ровные. Эти признаки, как правило, характерны для контроля, с которым следует сравнивать результаты, полученные с тестируемыми почвами.

2. Слабое загрязнение

Всхожесть 60 – 90 %. Проростки ровные, почти нормальной длины.

3. Среднее загрязнение

Всхожесть 30 – 60 %. Проростки по сравнению с контролем короче и тоньше. Некоторые проростки имеют уродства.

4. Сильное загрязнение

Всхожесть семян менее 20 %. Проростки мелкие и уродливые.

Исследование фитотоксичности сточных и загрязненных природных вод, снега и промышленных отходов

При изучении фитотоксичности сточных и загрязненных природных вод и снега рекомендуется проводить длительные опыты с проростками двух или трех видов растений из различных семейств (злаковые, крестоцветные, бобовые). С семенами каждого растения опыты проводят в трех повторностях.

Для проведения исследований получают проростки, средний размер которых не превышает 1,0 – 1,5 см. Необходимое время проращивания устанавливается при проведении предварительных пробных опытов. Выращивание проростков проводят в прямоугольных пластиковых емкостях (в дальнейшем называемых кюветами) из-под творога, сыра или других продуктов. Перед использованием их моют с питьевой содой или хозяйственным мылом и тщательно ополаскивают дистиллированной водой.

В качестве субстрата для выращивания проростков целесообразно использовать одинаковое количество промытого и прокаленного речного песка или чистую почву с известными агрохимическими показателями (кислотность, гумусированность, фракционный состав и т.п.).

В подготовленные кюветы насыпают одинаковые количества

соответствующего субстрата и увлажняют его исследуемой водой (в контроле дистиллированной или отстоянной водопроводной водой) до полной влагоемкости и высаживают в каждую кювету по десять одинаковых по размерам проростков тест-растения. Субстрат в каждой кювете поливают по мере необходимости равными объемами воды. Наблюдения проводят три недели, регистрируя скорость роста надземной части через каждые 2 – 3 дня. В конце опыта осторожно выкапывают проростки, промывают, обсушивают фильтровальной бумагой, измеряют и взвешивают отдельно надземную часть и корни. Данные обрабатывают статистически и выражают в процентах к контролю. По полученным данным строят гистограммы, оценивают токсичность исследованных вод и делают выводы о чувствительности использованных тест-объектов.

При оценке токсичности неочищенных сточных вод проводят краткосрочные тесты на всхожесть.

Подготовленные к опытам семена тест-растений замачивают в течение суток в исследуемой воде, затем переносят в чашки Петри на слой ваты и два слоя фильтровальной бумаги, смоченных тестируемой водой. Чашки Петри помещают в термостат, где их выдерживают при температуре 23 °С в течение 3 – 5 сут. Оценку токсичности проводят по проценту всхожести семян или средней длине проростков по сравнению с контролем. Каждый вариант опыта проводят в трех повторностях.

Определение фитотоксичности снежного покрова

Основная территория Российской Федерации находится в северных широтах и в осенне-зимний период на несколько месяцев покрывается постоянным снежным покровом, который играет роль планшета – накопителя загрязняющих веществ – и является индикатором загрязнения атмосферы. Токсичность снежного покрова позволяет оценить антропогенную нагрузку на окружающую среду в этот сезон и последующие загрязнения вод и почв.

При образовании и выпадении снега в результате процессов сухого и влажного вымывания концентрация загрязняющих веществ в нем оказывается обычно на 2 – 3 порядка выше, чем в атмосферном воздухе.

Отбор проб снега для анализа проводят перед началом его

таяния специальными полихлорированными пробоотборниками с участков нетронутого снежного покрова на всю его толщину, неходя 5 см до почвы во избежание загрязнения пробы грунтом. Каждую пробу снега отбирают из пяти выемок (метод «конверта») на площади 1 м². Частота отбора – одна проба приблизительно на 1 км². Отобранные пробы снега помещают в полиэтиленовые пакетики для пищевых продуктов, они могут длительное время храниться в морозильнике. Снег анализируют на фитотоксичность в зонах влияния стационарных источников загрязнения и основных автомагистралей города, а также в фоновых участках. Пробы снега перед биотестированием оттаивают при комнатной температуре в химических стаканах вместимостью 500 мл. Температура талой воды перед тестированием не должна быть ниже комнатной.

Определение фитотоксичности снеговой воды проводят по одному из вариантов биотестирования, используемых для оценки токсичности сточных и природных вод.

Определение фитотоксичности промышленных отходов

В целях реализации статьи 14 Федерального закона «Об отходах производства и потребления» Министерство природных ресурсов утвердило критерии отнесения отходов к классу опасности для окружающей природной среды (ОПС), издав приказ № 511 от 15.06.01.

В соответствии с этим приказом отнесение отходов к классу опасности для ОПС может осуществляться расчетными (по концентрациям) или экспериментальными методами (по биотестированию). При использовании расчетного метода необходимо экспериментальное подтверждение методом биотестирования.

Приказ № 511 предписывает применять не менее двух методов биотестирования и устанавливает, какие методы должны применяться. Так, если в данной лаборатории используется метод, основанный на смертности цериодафний, то парным к нему должен быть метод, основанный на подавлении роста микроводорослей.

При проведении исследований различных отходов и их гигиенической оценки в качестве дополнительного часто используется метод определения фитотоксичности. Применение этого метода особенно целесообразно при использовании отходов в сельском хозяйстве в качестве мелиорантов, удобрений и т.п.

В соответствии с рекомендуемой методикой биотестирования получают водные вытяжки из отходов. Для этого 10 г пробы измельченной и просеянной золы смешивают в химическом стакане в соотношении 1:10. После суточного отстаивания и механического встряхивания на ротаторе в течение 2 ч жидкую фазу отделяют путем фильтрования через обеззоленный фильтр в коническую колбу вместимостью 250 мл, колбу закрывают каучуковой пробкой и водную вытяжку используют для биотестирования.

Определение фитотоксичности проводят по одной из вышеописанных методик для сточных и природных вод.

В первую очередь целесообразно оценить фитотоксичность водных вытяжек по ингибированию прорастания семян тест-растений. При обнаружении сильной токсичности опыты продолжают при разбавлении полученных водных вытяжек дистиллированной или отстоянной водопроводной водой в соотношениях 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и 1:10.

По результатам биотестирования и информации о химическом составе отходов делают выводы о потенциальной опасности отходов для ОПС и возможности их использования в сельском хозяйстве, в качестве сырья для получения строительных материалов, в дорожном строительстве и т.п.

Оборудование и реактивы

1. Термостат.
2. Весы теххимические.
3. Фарфоровые чашки или ступки.
4. Чашки Петри.
5. Почвенное сито с отверстиями диаметром 2 мм.
6. Пинцеты.
7. Трубочки для полива.
8. Пластиковые кюветы для выращивания проростков.
9. Линейка или штангенциркуль.
10. Градуированные пипетки вместимостью 10 и 25 мл.
11. Бумага фильтровальная.
12. Калька.
13. Воронка стеклянная диаметром 7 – 10 см.
14. Химические стаканы вместимостью 500 мл.

15. Конические колбы вместимостью 250 мл.
16. Образец эталонной почвы или речной песок.
17. Семена различных растений.
18. Полихлорвиниловые пробоотборники снега.
19. Пакеты полиэтиленовые.
20. Ротатор.
21. Магнитная мешалка.
22. Раствор перманганата калия 1%-ный.

5.4. Определение токсичности продуктов и кормов с помощью инфузии *Colpoda steinii*

Сущность метода

Метод основан на извлечении из исследуемых продуктов различных фракций токсических веществ водой и последующем воздействии этих экстрактов на культуру инфузии колподы.

Для проведения одного исследования не ранее чем за 12 – 24 ч до использования вскрывают два флакона с культурой колподы и один с питательной средой. В каждый флакон с культурой колподы наливают по 2 мл питательной среды.

Непосредственно перед применением необходимо убедиться в активности культуры колподы. Для этого культуру исследуют методом висячей капли под микроскопом. Колподы в количестве не менее 6 клеток в поле зрения должны активно двигаться.

Приготовление водного экстракта исследуемого продукта

Навеску массой 20 г вносят в колбу вместимостью 250 мл и заливают 100 мл дистиллированной воды. Колбы с содержимым встряхивают на аппарате в течение 20 мин после этого смесь фильтруют через бумажный фильтр.

Проведение испытания

2 мл экстракта вносят во флакон с активной культурой колподы и перемешивают. В контрольный флакон с активной культурой колподы вносят 2 мл питательной среды. Через 10 мин, а потом через 3 ч из опытного и контрольного флаконов отбирают по одной капле смеси и просматривают их под микроскопом, используя метод ви-

сячей капли. В исследуемых пробах учитывают наличие живых и погибших инфузорий. Просматривают весь объем капли.

Обработка результатов

Критерием наличия токсичности служит время от начала воздействия испытуемого экстракта до гибели большинства (более 90 %) колпод, факт которой констатируют на основании полного прекращения их движения и наличия распада.

В контрольной пробе все колподы должны оставаться подвижными. Исследуемый продукт токсичный, если гибель колпод наступила через 10 мин после внесения экстракта в живую культуру колпод.

Исследуемый продукт слаботоксичный, если гибель колпод наступила в интервале до 3 ч исследований.

Исследуемый продукт нетоксичный, если через 3 ч исследований все колподы остаются подвижными.

5.5. Определение загрязнения природных водоемов с использованием рясковых

Представители семейства рясковых являются самыми маленькими водными цветковыми растениями, диаметр которых редко превышает 1 см. Размножение преимущественно вегетативное, при благоприятных условиях ряска удваивает массу за 5 – 6 сут. Благодаря неприхотливости, быстрому росту, небольшим размерам, преобладанию вегетативного размножения рясковые легко культивируются в лабораторных условиях и служат удобными тест-объектами. Рясковые чувствительны к пестицидам, тяжелым металлам и закислению водоемов. В водоемах средних широт встречаются три вида рясковых: многокоренник обыкновенный *Spirodella polyrhiza* L., ряска тройчатая *Lemna trisulca* L., ряска маленькая *Lemna minor* L. Последняя чаще всего используется для целей биотестирования.

Для биотестирования растения ряски отбирают из естественных популяций условно чистых водоемов в начале июня, когда много молодых наиболее жизнеспособных растений, в сосуды, на дно которых налито немного чистой воды.

В лабораторных условиях их можно содержать в аквариумах

с использованием воды из чистых водоемов или дехлорированной водопроводной воды.

В качестве тест-параметров используют изменение скорости размножения, число боковых отростков, число корней и их длину, выживаемость, массу надводной и подводной частей, наличие или отсутствие гиалиновых нитей, изменение окраски листецов, потерю тургора и т.п.

Критерием оценки скорости размножения служит коэффициент роста (прирост/число суток). Время проведения опыта 7 – 8 сут.

Рясковые связываются между собой при помощи гиалиновой нити – выроста мембраны, которая позволяет им образовывать группы, чтобы легче удерживаться на поверхности воды. Специфическая реакция – потеря связи между листецами – возникает при загрязнении природных вод тяжелыми металлами (Cu, Zn).

При проведении биотестирования одинаковые особи ряски малой по 10 штук помещают в стаканы на 50 мл с водой, токсичность которой необходимо оценить. В качестве контроля используют культуривационную или дистиллированную воду. Опыты проводят трехкратно. Сосуды с тестируемой водой выставляют на рассеянный свет. Ежедневно учитывают следующие параметры: выживаемость, изменение окраски листецов, образование и количество гиалиновых нитей, количество корней и их длина.

В случае малой токсичности воды и относительно хорошей сохранности растений в конце опыта их вынимают из воды, обсушивают фильтровальной бумагой, отделяют бритвой надводную и подводную части и взвешивают на торзионных весах. Полученные измерения выражают по отношению к контролю, взятому за 100 %, и обрабатывают статистически.

Оборудование и материалы

1. Сачки для отбора проб.
2. Сосуды для сбора ряски.
3. Химические стаканы вместимостью 500 мл.
4. Линейки.
5. Весы торзионные.
6. Бритвы.
7. Аквариум.

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ К РЕЙТИНГ-КОНТРОЛЮ

1. Мезотрофное озеро после ливневого дождя, прошедшего вскоре после обработки ядохимикатами сельхозугодий, было загрязнено пестицидами. Предельно допустимая концентрация пестицидов в воде была превышена в три раза. Опишите изменения, которые произойдут с растениями семейства рясковых (например *Lemna minor* L.) через семь дней после загрязнения водоема. Какие тест-системы (тест-организмы) целесообразно использовать ещё в данном случае для оценки степени токсичности воды?

2. В малую реку, протекающую по территории района с развитым сельскохозяйственным производством, в течение 5 лет систематически поступали сточные воды, загрязненные органическими веществами. Какие результаты будут получены, если для оценки степени токсичности воды водоема будет использовано биотестирование с одноклеточной зеленой водорослью *Chlorella vulgaris*? Предложите различные биологические методы оценки качества воды в данном водоеме.

3. В воду реки Рпень, протекающей по территории г. Владимира, поступают сточные воды предприятий, содержащие тяжелые металлы. Вода на этом участке реки классифицируется как очень грязная. Какие изменения произошли в биоценозе реки данного участка? Предложите биологические методы оценки степени токсичности воды на этом участке реки и опишите возможные результаты.

4. Сточные воды ОАО «Точмаш», содержащие токсичные тяжелые металлы, поступают на сооружения биологической очистки г. Владимира. Какие методы биотестирования целесообразно использовать для оценки токсичности этих вод? Опишите рекомендуемые Вами тест-организмы и тест-параметры.

5. В токсикологическую лабораторию для анализа поступили пищевые продукты, предположительно загрязненные пестицидами.

Какие тест-организмы Вы использовали бы для оценки токсичности этих продуктов, если бы работали в этой лаборатории в качестве лаборанта-токсиколога? Опишите порядок проведения биотестирования с одним из выбранных тест-организмов.

6. В результате аварии на нефтепроводе в реку попала сырая нефть, концентрация которой в воде реки после аварии равнялась 2,5 мг/л. Какие изменения произойдут в экосистеме реки? Какие биологические методы оценки качества воды Вы предложили бы использовать работникам природоохранных организаций при проведении экологического мониторинга? Во сколько раз превышены в воде санитарно-гигиенические нормативы по нефтепродуктам?

7. Какие методы биотестирования Вы рекомендовали бы для оценки токсичности и возможности фиторемидации почв, загрязненных тяжелыми металлами? Опишите порядок работ при биотестировании этих почв и возможные варианты решения проблемы по полученным результатам.

8. При обсуждении вопроса о целесообразности использования шлаков металлургического завода для мелиорации почв сельскохозяйственного назначения решили определить их токсичность. Какие методы биотестирования Вы рекомендуете для этих целей? Опишите, как Вы будете проводить биотестирование: подготовку проб, выбор тест-организмов, тест-параметров, а также возможные варианты решения проблемы по результатам биотестирования.

9. В α -мезотропное озеро, расположенное в центре рабочего поселка, в окрестностях которого находятся крупная теплоэлектростанция, работающая на буром угле, и завод по переработке пластмасс, решили запустить мольков ценных рыб. Какие методы биотестирования Вы могли бы предложить для оценки степени токсичности воды водоема и решения вопроса о пригодности этого водоема для выращивания рыб? Опишите порядок проведения работы и обработки результатов.

10. Для решения вопроса о возможности использования рекультивированных почв для сельскохозяйственного использования было предложено исследовать их методами биотестирования. Какие методы биотестирования, с Вашей точки зрения, целесообразно применять в данном случае? Опишите порядок проведения работы и возможные варианты решения проблемы по полученным результатам.

11. В олиготрофное озеро с поверхностным стоком попали нефтепродукты, гуминовые кислоты и тяжелые металлы в концентрациях, в несколько раз превышающих гигиенические нормативы (ПДК). Какие изменения могут произойти в биоценозе этого водоема? Какие биологические методы оценки качества воды целесообразно использовать в данном случае? Опишите порядок выполнения работ, дайте характеристику тест-организмов. Какие природоохранные мероприятия Вы могли бы предложить для уменьшения загрязнения водоема за счет поверхностного стока?

12. В токсикологическую лабораторию поступили твердые бытовые отходы предприятий черной металлургии для оценки степени их токсичности и решения вопроса о возможности использования их в качестве вторичного сырья в строительстве, материалов для дорожного покрытия или мелиорантов в сельском хозяйстве. Какие методы биотестирования целесообразно использовать для оценки их токсичности и решения вопроса о путях дальнейшего использования? Опишите порядок проведения работ. Дайте характеристику примененных тест-организмов.

13. Для решения вопроса о возможностях дальнейшего использования рекультивированных почв после их загрязнения нефтью (рекреация, сельскохозяйственное производство, строительство торгового центра) решено было провести их биотестирование. Какие методы биотестирования целесообразно использовать в данном случае и какое решение нужно принять в зависимости от полученных результатов?

14. В старицу реки Клязьмы в районе г. Коврова попали сточные воды, содержащие Cr(VI), Ni²⁺, Cu²⁺ и нефтепродукты. Какие методы биотестирования целесообразно использовать в данном случае для оценки токсичности воды, если концентрация загрязнителей в воде водоема превышала гигиенические нормативы в пять раз? Опишите порядок проведения работ и возможные изменения в экосистеме водоема. Какие природоохранные мероприятия могут ускорить восстановление экосистемы водоема?

15. В результате аварии на очистных сооружениях крупного машиностроительного завода в α-мезотрофное озеро попали сточные воды, содержащие тяжелые металлы. В результате этого концентрация кадмия, меди, никеля и цинка в воде водоема достигла не-

скольких десятков ПДК. Какие изменения произойдут в экосистеме водоема через неделю, месяц, год? Какие методы биотестирования целесообразно использовать в данном случае для оценки степени токсичности воды озера?

16. При воздушной обработке леса стойкими хлорорганическими пестицидами для уничтожения опасных насекомых-вредителей в крупное олиготрофное лесное озеро попали пестициды в концентрациях, в несколько раз превышающих ПДК. Какие изменения произойдут в экосистеме озера через неделю, месяц, год? Какие биологические методы целесообразно использовать для оценки степени токсичности воды этого озера? Опишите порядок проведения работ.

17. В малую реку, протекающую по сельской местности, систематически поступали неочищенные хозяйственно-бытовые стоки с населенных мест, стоки с летних стоянок крупного рогатого скота и полей. Дайте характеристику биоценоза данного водоема. Какие биологические методы оценки качества объектов окружающей среды Вы использовали бы при мониторинге этой реки?

18. В результате выхода из строя очистных сооружений крупного металлургического комбината в умеренно загрязненную малую реку в течение 6 лет поступали неочищенные сточные воды, содержащие хром(VI), медь(II), цинк(II), железо(III), кадмий(II) в концентрациях, превышающих ПДК в 5 – 10 раз. Опишите подробно изменения, которые произошли в биоценозе водного объекта в результате загрязнения тяжелыми металлами. Какие методы биотестирования целесообразно использовать для оценки степени токсичности воды этой реки? Охарактеризуйте тест-организмы и тест-параметры.

19. При решении вопроса о возможности использования осадков сточных вод в качестве органических удобрений в сельском хозяйстве было предложено провести оценку их токсичности. Какие методы биотестирования целесообразно использовать в данном случае? Опишите порядок проведения работ, дайте характеристику тест-организмов и тест-параметров. Какое заключение необходимо дать в зависимости от полученных результатов о целесообразности использования этих осадков сточных вод?

20. В результате систематического сброса в реку неочищенных сточных вод, содержащих фенол и его производные, концентрация фенола в воде достигла 10 – 11 ПДК. Какие изменения произойдут в

биоценозе этой реки через год, пять лет? Какие методы биотестирования целесообразно использовать для оценки степени токсичности воды данного водоема? Дайте характеристику тест-организмов, опишите порядок проведения работ. Какое заключение необходимо дать о возможности использования этого водного объекта (рыбохозяйственный, питьевого, культурно-бытового назначения)?

21. В мезотрофное озеро, расположенное в средних широтах РФ, в результате аварии на нефтепроводе попала сырая нефть, концентрация которой в воде озера после аварии достигла 20 мг/л. Какие изменения произойдут в биоценозе озера через неделю, месяц, год, четыре года, если в водоем в указанные сроки не будут поступать никакие загрязняющие вещества? Какие биологические методы оценки качества объектов окружающей среды Вы могли бы рекомендовать при проведении экологического мониторинга данного озера? Опишите порядок проведения работ.

22. В токсикологическую лабораторию поступили образцы кормов, предположительно загрязненных тяжелыми металлами. Какие методы биотестирования целесообразно использовать для оценки степени токсичности этих кормов? Опишите порядок проведения биотестирования с одним из выбранных тест-организмов.

23. В пойме реки расположено крупное мезотрофное озеро. Пригородный совхоз решил распахать луга вокруг озера и использовать для выращивания ранних овощей. Какие изменения произойдут в биоценозе этого озера через пять лет? Какие биологические методы Вы рекомендовали бы для систематических наблюдений за изменениями экосистемы данного озера? Опишите эти методы и дайте прогноз изменениям экосистемы озера через 20 – 30 лет.

ВЫВОДЫ

1. Для получения достоверных результатов при оценке токсичности различных объектов окружающей среды необходимо культивирование чистых линий тест-организмов в стандартных, по возможности «экологически чистых», оптимальных для данного вида условиях.

2. При биотестировании обычно выбирают несколько тест-объектов из трофических уровней, обладающих различной чувствительностью к загрязнителям различной природы (тяжелые металлы, пестициды, нефтепродукты, СПАВ и др.).

3. При применении нескольких биотестов за окончательный результат определения степени токсичности исследуемой среды берут данные, которые получены при использовании тест-организмов, проявивших наибольшую чувствительность, в соответствии с принципом учета наиболее слабого звена экологической системы.

4. Наиболее универсальными тест-объектами по чувствительности, адекватности реагирования на различные токсиканты считаются дафнии и цериодафнии. Поэтому при появлении трудностей интерпретации плохо согласующихся между собой результатов биотестирования, полученных на разных тест-объектах, в первую очередь рассматривается вопрос о результатах дафниевых тестов.

5. При оценке степени токсичности сточных вод, направляемых на сооружения биологической очистки, целесообразно в качестве тест-объектов использовать простейших, входящих в состав активного ила (парамеции, тетрахимена и т.д.).

6. При биотестировании загрязненных вод, используемых для орошения сельскохозяйственных угодий, необходимо в первую очередь определить фитотоксичность вод с использованием нескольких тест-культур (семян сельскохозяйственных растений).

7. Результаты биотестирования, какой бы методикой они ни

были получены, должны сопровождаться результатами химических анализов исследуемых объектов. При биотестировании вод обязательно представляются данные о температуре, содержании растворенного кислорода и рН, измеряемых в процессе биотестирования.

8. Для обеспечения гарантий качества, сопоставимости и законности результатов измерений на токсичность процедура биотестирования должна быть строго стандартизирована.

При разработке и стандартизации методик биотестирования следует определить все условия, которые могут повлиять на результаты определения, поскольку тест-организмы, как и все живые существа, чутко реагируют не только на содержание токсических веществ, но также на факторы окружающей среды – рН, температуру, содержание растворенного кислорода, жесткость, мутность раствора (вытяжки), которые оказывают существенное влияние на проявление токсических эффектов загрязняющих веществ, присутствующих в исследуемом объекте.

9. При биотестировании промышленных отходов и почв с использованием в качестве тест-организмов водорослей, рачков, простейших и микроорганизмов необходимой процедурой является получение соответствующей водной вытяжки, так как ее качество влияет на результаты биотестирования.

10. При оценке качества почв важнейшим параметром считается ее фитотоксичность, которая оценивается по ингибированию прорастания семян и роста проростков, снижению энергии прорастания, скорости роста проростков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одна из главных причин негативных последствий антропогенного загрязнения природных сред – токсичность загрязняющих веществ для биоты. Именно присутствие токсикантов в окружающей среде приводит к гибели всего живого, выпадению из состава сообществ организмов-обитателей чистых зон и замене их эврибионтными видами.

Мониторинг токсического загрязнения на основе действующей системы, основанной на оценке соответствия концентрации поллютантов в среде гигиеническим нормативам (ПДК, ОДК, ПДУ и др.), не позволяет адекватно оценить качество среды обитания для живых организмов.

Кроме того, определение всех загрязняющих веществ, циркулирующих в объектах окружающей среды, представляет немалые трудности. Прежде всего они связаны с большим перечнем загрязняющих веществ, попадающих в экосистемы, и невозможностью их контроля. Поэтому в настоящее время, по оценкам специалистов, контролируются лишь около 0,3 % поступающих в окружающую среду веществ. Очень трудно также учесть вещества, образующиеся в результате метаболизма поллютантов. Но даже измерение концентраций всех контролируемых загрязняющих веществ не позволяет с высокой степенью достоверности судить об их совместных комбинированных эффектах и о влиянии других факторов окружающей среды на биоту.

Среда может быть слабозагрязненной, но сильно токсичной для биоты.

Биотестирование – один из приемов исследования в области токсикологии, широко используемый в настоящее время для оценки степени токсичности различных экосистем. Биотестирование не отменяет систему аналитического контроля, а лишь дополняет ее качественно новыми биологическими показателями, так как с эко-

логической точки зрения сами по себе результаты определения концентрации загрязняющих веществ имеют относительную ценность. Важно знать не уровни загрязнения, а вызываемые ими биологические эффекты.

Биотестирование является основным приемом при установлении ПДК химических веществ и в конечном итоге в оценке их опасности для окружающей среды и здоровья населения. Биотестирование на гидробионтах проводят в случае разработки рыбохозяйственных ПДК, когда оценивают опасность загрязнения водных экосистем.

Биотестирование используют для оценки токсичности промышленных сточных вод на разных этапах их очистки, чаще всего при внедрении новых технологий, а также для определения предельно допустимого сброса (ПДС) предприятий. ПДС включены в экологический паспорт предприятия.

В 1991 г. биотестирование введено как обязательный элемент контроля качества поверхностных вод, что предусмотрено «Правилами охраны поверхностных вод» (1991). Показатели биотестирования природных вод включены в перечень показателей для выявления зон чрезвычайной экологической ситуации и зон экологического бедствия.

Все перечисленные выше факты доказывают необходимость и важность овладения студентами экологических специальностей методами биотестирования для интегральной оценки состояния объектов окружающей среды и степени деградации окружающей природной среды под влиянием антропогенных факторов при возрастающей техногенной нагрузке на биосферу.

ПРИЛОЖЕНИЕ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ ПО ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ*

1. Назначение и область применения

Методика предназначена для оперативного (определение пяти проб в шести разбавлениях занимает не более 2 ч) контроля острой токсичности проб сточной и природной воды в лабораторных и полевых условиях с использованием в качестве тест-объекта препарата лиофилизированных мутантных бактерий *E. coli* и стандартного промышленно изготавливаемого комплекта токси-хромотест.

2. Принцип метода

2.1. Метод определения токсичности основан на способности токсикантов подавлять синтез фермента β -галактозидазы у мутантных бактерий *E. coli*. Подавление синтеза сопровождается цветовой реакцией.

Оценка токсичности основана на определении величины изменения интенсивности окрашивания тестируемой воды при действии токсических веществ.

2.2. Критерием токсического действия является изменение интенсивности окрашивания тестируемой воды в исследуемой пробе по сравнению с таковой для пробы с раствором, не содержащим токсических веществ, а также для пробы, содержащей стандартный токсикант. Уменьшение интенсивности окрашивания пропорционально токсическому эффекту.

2.3. Оценка токсичности определяется визуально или количественно с использованием фотокolorиметра и выражается в послед-

* Методика допущена для целей государственного экологического контроля.

нем случае в виде безразмерной величины – индекса токсичности T по формуле

$$T = [1 - (ОП_{\text{мес}} / ОП_{\text{конт}})] 100,$$

где T – индекс токсичности, выраженный в процентах;

$ОП_{\text{мес}}$ – оптическая плотность тестируемой воды;

$ОП_{\text{конт}}$ – оптическая плотность в контроле через определенный интервал времени экспозиции исследуемой воды с тест-объектом.

В качестве критериев токсичности принимаются следующие величины: расчетный процент токсичности меньше 20 % – вода не токсична, более 20 % – исследуемая вода токсична.

3. Нормы погрешности

3.1. Качество оценки токсичности воды определяется свойствами бактериального препарата, которые подтверждаются на модельном токсиканте в каждом опыте. Диапазон реагирования на модельный токсикант находится в пределах 0,06 – 4 мг/дм³.

3.2. Метрологические характеристики биотеста: сходимость результатов определения тест-параметра 5 %; воспроизводимость результатов определения тест-параметра 5 %.

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, растворы

4.1. Средства измерений

Спектрометр или фотоэлектроколориметр, позволяющий измерять оптическую плотность при λ 615 нм.

4.2. Все реактивы, растворы, основная посуда и лиофилизированная культура бактерий находятся в стандартном, промышленно изготавливаемом наборе токси-хромтест, который включает в себя:

- 3 пластиковых модуля с углублениями – сосудами, используемые для процедуры биотестирования;
- 6 флаконов с необходимыми растворами;
- А – флакон, включающий активатор для энзима β -галакто-

сидазы и КО-факторы, необходимые для восстановления бактерий после стрессового состояния;

– В – флакон с лиофилизированными бактериями токси-хромотест, проницаемый мутант *E. coli.*;

– С – флакон с регидрирующим раствором для гидратирования бактерий;

– Д – флакон со стандартным токсикантом, 4%-ным водным раствором хлорида ртути;

– F – флакон с хромогенным субстратом;

– G – флакон с разбавителем для стандартного токсиканта и исследуемой воды.

Набор изготавливается канадской фирмой «ЕВр» (биотесты для исследования окружающей среды).

4.3. Вспомогательные устройства:

– пипетки вместимостью 1, 2, 4 мл;

– автоматические дозаторы на 0,1 – 0,2 см³;

– посуда мерная лабораторная стеклянная на 1,0; 10,0; 100,0 см³;

– фильтры;

– бутылки из стекла с притертыми пробками вместимостью 10 – 150 см³ для отбора и хранения проб и реактивов.

5. Условия безопасного проведения работ

5.1. При проведении работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами.

5.2. Электробезопасность (при работе с фотоэлектроколориметром).

5.3. Организация обучения работающих безопасности труда.

5.4. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности и иметь средства пожаротушения.

5.5. Используемые в качестве биотестов лиофилизированные бактерии не патогенны, однако после каждого анализа необходимо стерилизовать всю используемую посуду, остатки растворов, упаковав предварительно в пакеты, прикладываемые к набору токси-хромотест, в жаровом шкафу при 105 °С в течение часа.

5.6. Хранить готовый комплект токси-хроматест в промежутках между определениями следует в холодильнике при температуре 2 – 8 °С, следует беречь культуру лиофилизированных бактерий от нагревания и резкой смены температуры.

6. Требования к квалификации оператора

Определение токсичности по настоящей методике выполняется оператором с квалификацией лаборанта.

7. Условия выполнения измерений

7.1. Измерения производятся в нормальных лабораторных условиях.

7.2. Температура окружающего воздуха 18 – 25 °С.

7.3. Относительная влажность воздуха 80 ± 5 %.

7.4. Атмосферное давление 84 – 106 кПа.

7.5. При использовании фотоэлектроколориметра частота переменного тока 50 ± 1 Гц. Напряжение в сети 220 ± 10 В.

8. Подготовка к выполнению измерений

8.1. Подготовка посуды для отбора проб и биотестирования. Отбор проб.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть абсолютно чистой. Ее очищают пищевой содой и тщательно промывают водопроводной водой, затем 3 – 4 раза дистиллированной водой. При сушке в стеклянные бутылки не должна попадать пыль, поэтому для этой цели используют сушильный шкаф. Сушат посуду при 160 °С в течение часа. Не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями.

8.2. Отбор проб, их хранение и транспортировку осуществляют в соответствии с руководящими документами, действующими в системе Государственного экологического контроля.

Общие процедуры отбора проб определены в следующих документах:

ГОСТ 17.1.5.05-85 ОПГ. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и осадков.

ГОСТ 17.1.5.04-31 ОПГ. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия.

НВН 33-5.3.01-85. Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод.

8.3. На очистных сооружениях отбирать пробы для анализа на токсичность следует до системы хлорирования, так как активный хлор является токсическим веществом. Если необходимо проанализировать пробу после хлорирования, следует удалить из исследуемой воды свободный хлор отстаиванием.

8.4. Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 ч после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают (2 – 4 °С). Хранить пробы следует не более 24 ч после отбора. В исключительных случаях допускается замораживание проб (–18 °С) и их хранение до двух недель, однако следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться.

Не допускается консервирование проб с помощью химических веществ.

8.5. Необходимый для выполнения анализа объем водной пробы составляет 50 – 100 см³.

8.6. При проведении биотестирования температура исследуемой пробы должна соответствовать комнатной температуре.

8.7. При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений необходима фильтрация пробы через фильтры обеззоленные самые пористые («белая», «розовая» лента); недопустимо использовать «синюю» ленту, так как она задерживает коллоидные вещества, что занижает результаты биотестирования. Фильтры по ТУ 6-09-1678.

8.8. Природные воды фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 – 0,5 мкм.

9. Проведение анализов

9.1. Вся процедура подготовки разбавлений исследуемой воды и анализа проводится в пластиковых модулях, 3 таких модуля прилагаются к комплекту.

9.2. Каждый модуль состоит из углублений – сосудов, размеченных на 12 колонок по вертикали (обозначены от 1 до 12) и восьми рядов по горизонтали, обозначенные буквами: А, В, С, D, E, F, G, H (см. таблицу).

9.3. Первая вертикальная колонка сосудов используется для опыта без внесения бактерий (отсутствие биотеста), чтобы исключить ошибки за счет возможной колориметрической реакции химических веществ, входящих в состав исследуемой пробы.

9.4. Вторая вертикальная колонка сосудов используется для контроля чувствительности культуры бактерий к стандартному токсиканту хлориду ртути (HgCl_2). Контроль со стандартным токсикантом проводится при каждом исследовании.

9.5. Остальные десять вертикальных колонок могут быть использованы для пяти проб исследуемой воды различных разбавлений в двух повторностях.

9.6. Восемь рядов углублений – сосудов в пластиковом модуле, обозначенных буквами от А до H, используются для различных разбавлений исследуемой воды:

А – неразбавленная вода; В – разбавленная исследуемая вода, разбавление 1:2; С – разбавление 1:4; D – разбавление 1:8; E – разбавление 1:16; F – разбавление 1:32; G – разбавление 1:64; H – разбавляющая вода без исследуемой.

9.7. Из бутылки G (входящей в комплект) разливать разбавитель микропипеткой по $0,1 \text{ см}^3$ кроме ряда А (где исследуемая вода анализируется без разбавления).

Если исследуют 5 проб одновременно, то заполнять все углубления – сосуды пластикового модуля, если одну пробу – то все сосуды до колонки 5.

9.8. Из бутылки D (входящей в комплект) налить $0,2 \text{ см}^3$ стандартного токсиканта в первый сосуд колонки 2 (A_2). Далее используя восходящий ряд разведений 1:2, внести микропипеткой по $0,1 \text{ см}^3$ предыдущего разведения, тщательно предварительно перемешивая приготавливаемые растворы.

Из сосуда A_2 отобрать $0,1 \text{ см}^3$ раствора и перенести в сосуд B_2 , тщательно перемешать и перенести $0,1 \text{ см}^3$ в сосуд C_2 . Повторить эту процедуру для всех сосудов, выбросив из последнего G $0,1 \text{ см}^3$.

9.9. Налить по 0,2 см³ первой исследуемой пробы в первые сосуды 3 и 4 колонки (сосуды А₃ и А₄) и, используя процедуру восходящего ряда разбавлений 1:2, разбавить пробу так же, как в п. 9.8.

9.10. Если необходимо проконтролировать несколько проб, то готовятся их разбавления в колонках 5 – 12 по п. 9.9.

9.11. Из бутылки А (входящей в комплект) разлить раствор для реакции бактерий в сосуды колонки 1 для опыта без внесения бактерий (отсутствие биотеста).

9.12. Процедура регидрирования лиофилизированных бактерий. С бутылкой В и С (входящих в комплект) удалить пломбы и крышки и немедленно перенести раствор из бутылки С в бутылку В. Хорошо перемешать, осторожно встряхивая.

Оставить бутылку В с суспензией бактерий на 15 мин при комнатной температуре для регидрирования бактерий. Затем 1 см³ полученной суспензии бактерий перенести в среду реагирования (бутылку А).

9.13. Полученную среду реагирования, включающую бактерии, разлить из бутылки А по 0,1 см³ в каждый сосуд колонок 2 (со стандартным токсикантом) и 3 – 4 (для первой пробы), 5 – 6 для второй и т.д.

9.14. Инкубировать полученные растворы в пластиковом модуле при 37 °С в термостате 90 мин.

9.15. Вынуть модуль из термостата и добавить 0,1 см³ хромогенного субстрата из бутылки F (входящей в комплект) во все заполненные сосуды.

9.16. Инкубировать полученные растворы в пластиковом модуле при 37 °С 90 мин. Если за время инкубации цвет в контрольных сосудах ряда Н не разовьется до достаточно интенсивно синего, инкубировать еще 20 мин.

10. Учет, обработка и оформление результатов

10.1. Результаты можно регистрировать визуально или количественно с использованием фотоколориметра.

10.2. При измерении оптической плотности с использованием ФЭК светопоглощение растворов измеряют при λ 615 нм.

10.3. Оценку токсичности пробы проводят по относительному

различию в интенсивности окрашивания контрольной и опытной проб или ее разведений. Проба считается токсичной, если интенсивность окрашивания в ней ниже, чем в контроле.

10.4. Результаты контроля чувствительности к стандартному токсиканту регистрируются по интенсивности цвета в сосудах с разной концентрацией токсиканта. Интенсивность синего цвета возрастает при снижении концентрации хлорида ртути. В контрольном сосуде (Н₂) без добавки токсиканта цвет должен быть интенсивно синий.

Концентрации токсиканта 4 и 2 мг/см³ не должны давать окрашивания. Если в колонке 2 не появилось окрашивание, значит, бактерии не функционируют и результаты опытов не учитываются. Культуру бактерий следует заменить.

10.5. При визуальном определении интенсивность цвета обозначается:

- = нет окрашивания;
- очень слабое окрашивание;
- ± голубое окрашивание;
- + синее окрашивание;
- ++ интенсивно-синее окрашивание.

Проба считается токсичной, если интенсивность окрашивания обозначенная (±), ниже, чем в контроле.

10.6. При инструментальной регистрации результатов необходимо записать оптическую плотность для всех заполненных сосудов.

За токсичные принимают все неокрашенные, а также окрашенные образцы с оптической плотностью на 20 % ниже оптической плотности в контрольных образцах.

Токсичность рассчитывается по формуле

$$T = [1 - (ОП_{\text{иссл}} / ОП_{\text{конт}})] 100.$$

К токсичным относят все исследуемые разведения пробы, вызывающие 20%-ную токсичность.

Результаты измерений оформляют протоколом, в котором указывают предприятие, место и дату отбора пробы, дату проведенного исследования, используемый биотест, выявленную токсичность

в максимальном разбавлении пробы. Условия проведения анализа должны соответствовать требованиям настоящей методики.

План проведения биотестирования в пластиковом модуле набора токси-хроматест

Колонка												
Ряд	Без внесения бактерий	HgCl ₂ , мг/л		Проба 1		Проба 2		Проба 3		Проба 4		Проба 5
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A*	4											
B	2	1:2		1:2								
C	1	1:4		1:4								
D	0,5	1:8		1:8								
E	0,25	1:16		1:16								
F	0,125	1:32		1:32								
G	0,06	1:64		1:64								
H**												

* – без разбавления; ** – контроль токсиканта (без исследуемой воды).

Библиографический список

1. *Жмур, Н. С.* Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России / Н. С. Жмур. – М. : Междунар. дом сотрудничества, 1997. – 117 с. – ISBN 5-86986-043-1.
2. *Бурдин, К. С.* Основы биологического мониторинга / К. С. Бурдин. – М. : Изд-во МГУ, 1985. – 158 с.
3. *Иванов, В. Б.* Клеточные основы роста растений / В. Б. Иванов. – М. : Наука, 1974. – 222 с.
4. РД 118-02-90. Методическое руководство по биотестированию воды / Госкомитет СССР по охране природы. – М., 1990. – 39 с.
5. *Глазовская, М. А.* Геохимия природных и техногенных ландшафтов / М. А. Глазовская. – М. : Высш. шк., 1988. – 328 с.
6. *Звягинцев, Д. Г.* Биология почв : учебник / Д. Г. Звягинцев, И. П. Бабьева, Г. М. Зенова. – М. : Изд-во МГУ, 2005. – 445 с. – ISBN 5-211-04983-7.
7. *Федорова, А. И.* Практикум по экологии и охране окружающей среды : учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / А. И. Федорова, А. Н. Никольская. – М. : Владос, 2001. – 288 с. – ISBN 5-691-00309-7.
8. *Орлов, Д. С.* Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении / Д. С. Орлов [и др.]. – М. : Высш. шк., 2002. – 334 с. – ISBN 5-06-004099-2.
9. ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.
10. ГОСТ 17.4.5.03-85. Охрана природы. Почвы. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ.
11. *Паушева, З. П.* Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М. : Колос, 1980. – 304 с.

Учебное издание

ЧЕСНОКОВА Светлана Михайловна
ЧУГАЙ Наталья Валерьевна

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ч. 2. Методы биотестирования

Подписано в печать 27.02.08

Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 5,35. Тираж 100 экз.

Заказ

Издательство

Владимирского государственного университета.
600000, Владимир, ул. Горького, 87.