
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова

Биотестирование в экологическом контроле

Учебное пособие

Москва
2017



Биотестирование в экологическом контроле /под ред. В.А. Тереховой) /М.: ГЕОС, 2017 - 70 с

Авторы: В.А. Терехова, Д.М. Гершкович, М.М. Гладкова, В.И. Ипатова, Е.Ф. Исакова, О.В. Николаева, А.А. Рахлеева, Е.В. Федосеева

Учебное пособие знакомит с принципами биотестирования, дает представление о месте биотестирования в биодиагностике экологического качества природных сред и техногенных объектов. Издание подробно знакомит с видами тест-организмов и стандартными биотест-системами, наиболее востребованными в экологическом контроле водных и наземных экосистем, в оценке степени безопасности ксенобиотиков, продуктов и отходов современных технологий. Оно может служить основой практикума к экологическим дисциплинам, входящим в учебные планы многих специальностей биологической и экологической направленности.

Учебное пособие предназначено для студентов университетов, специализирующихся в области экологической токсикологии и рационального природопользования, а также для слушателей в системе дополнительного профессионального экологического образования.

Рецензенты :

С.В. Котелевцев, доктор биологических наук,
профессор биологического факультета МГУ
А.А. Бобров, доктор биологических наук,
профессор факультета почвоведения МГУ

Издание рекомендуется

учебно-методической комиссией факультета почвоведения
МГУ имени М.В. Ломоносова в качестве учебного пособия для бакалавров и магистрантов
по направлению подготовки 05.03.06, 05.04.06 "Экология и природопользование".

© Коллектив авторов, 2017
© ГЕОС, 2017

Содержание

	стр.
Предисловие	4
Краткий словарь терминов	6
Введение: Биотестирование в экологическом контроле	8
Биотестирование на гидробионтах: низшие ракообразные	11
<i>Daphnia magna</i>	
<i>Ceriodaphnia affinis</i>	20
<i>Artemia salina</i>	24
Биотестирование на микроводорослях	29
Биотестирование на простейших	40
Бактериальные биотесты - биолюминесцентные бактерии	45
Фитотестирование на проростках высших растений	51
Биотестирование на почвенных беспозвоночных: энхитреиды	59
Биотестирование на культуре клеток млекопитающих <i>in vitro</i>	62
Рекомендуемая литература	66
Приложение	67

Предисловие

Современный масштаб экологических проблем требует внедрения эффективных мер контроля и нормирования воздействий на природные комплексы. Биологические методы диагностики экологического качества водных и наземных экосистем рассматриваются в настоящее время уже не просто как дополнение к физико-химическим аналитическим исследованиям, а признаны важнейшим инструментом интегральной оценки, дающим представление о степени безопасности среды обитания и перспективах существования сообществ живых организмов.

Экологическая биодиагностика основывается на двух методологических подходах биоиндикации и биотестировании.

Биоиндикация представляет собой описание состояния живых систем (организмов, популяций, сообществ) в природных условиях (*in situ*) по широкому набору признаков (внутривидовое и видовое разнообразие, численность, популяционная плотность, частота встречаемости патогенных форм, возбудителей опасных заболеваний и т.п.).

Биотестирование - это оценка качества исследуемых объектов *ex situ* на основе реакций лабораторных тест-организмов по строго определенным поддающимся учету характеристикам - тест-функциям. Биотестирование применяется как для установления токсичности исследуемых проб по изменению признаков лабораторных тест-культур, сигнализирующих об опасности, так и для выявления стимулирующих эффектов, независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-организмов. Благодаря простоте, оперативности и доступности биотестирование получило широкое признание во всем мире.

Настоящее учебное пособие знакомит с наиболее востребованными методами биотестирования. Рассмотрены как элюатные методы биотестирования, предполагающие анализ водной вытяжки (экстрактов выщелачивания) из проб, так и аппликатные, в которых пробы исследуемых образцов (твердофазные фракции) находятся в непосредственном контакте с тест-культурами.

Основное внимание уделяется методам, распространенным в производственном и государственном контроле экотоксичности почв, вод, грунтов, для определения класса опасности отходов. В пособии дано описание видовых особенностей и условий содержания тест-культур гидробионтов и педобионтов (водорослей, простейших, ракообразных, бактерий, олигохет), используемых для экологического анализа объектов окружающей среды (почв, грунтов, донных отложений, поверхностных природных и сточных вод, химических отходов и др.), рассматриваются способы и условия проверки их чувствительности к модельным токсикантам сравнения.

Предисловие

Под термином токсичность понимают способность веществ вызывать нарушения физиологических функций живых организмов, что приводит к интоксикациям и гибели сначала отдельных клеток, а потом и особей в целом (всего организма, если это многоклеточное существо).

Экотоксикология определяется как раздел токсикологии, изучающий эффекты воздействия токсичных веществ на экосистемы и их круговорот в биосфере.

Понятие экотоксичность (экологическая токсичность) определяют как способность веществ вызывать неблагоприятные эффекты в отношении функционирования биологических компонентов экосистем. Показателем токсического действия служит степень изменения определенных параметров живых систем, которая фиксируется различными методами: биохимическими, биофизическими, оптическими, визуальными и др.

Как известно, лабораторные методы биотестирования еще со времен знаменитого врача Парацельса (1493-1541) востребованы в медицине (гуманитарной и ветеринарной) для исследования свойств внутренних сред высших организмов и токсичности. В сельском хозяйстве проводится экспресс-тестирование качества кормов, остатков пестицидов, фитотоксических эффектов удобрений и мелиорантов. В химической отрасли издавна биотесты используются для первичной оценки и безопасности свойств новых веществ и препаратов. И лишь относительно недавно биотестирование стало внедряться в экотоксикологию для оценки качества природных сред и техногенных объектов.

Под экотоксичностью, или токсичностью среды, понимают токсичность воды, почв, донных отложений и других объектов окружающей среды, возникающую вследствие появления в ней веществ природного или антропогенного происхождения (загрязнения сточными водами, атмосферными осадками и др.). В данном издании изложены методологические подходы к определению степени токсичности, которая оценивается с помощью биотест-систем.

Учебное пособие основано на обновленных материалах лекций и практических занятий, которые используются авторами - преподавателями программы «Технологии биотестирования в экологическом контроле природных и техногенных объектов» с 2007 г в МГУ имени М.В. Ломоносова.

Будем признательны за комментарии и замечания, способствующие совершенствованию учебного курса и пособия. Адрес e-mail для контактов *letap.msu@gmail.com*.

Краткий словарь терминов

Биодиагностика [bios – жизнь и diagnosticos – способный распознавать] – процесс постановки диагноза, выявление причин или факторов изменения состояния среды, по специфичным реакциям отдельных организмов, популяций или экосистем. Включает биоиндикацию и биотестирование.

Биоиндикаторы – организмы, присутствие, количество или особенности развития которых служат показателями естественных процессов, условий или антропогенных изменений среды обитания.

Биоиндикация – метод оценки абиотических и биотических факторов местообитания при помощи биологических систем.

Биотестирование – лабораторный метод оценки качества объектов окружающей среды по определенным поддающимся учету характеристикам живых организмов в стандартных условиях.

Выживаемость - способность организмов сохранять свои характеристики в условиях воздействия неблагоприятных факторов.

Гормезис (hormesis) - улучшение ответных реакций (роста или выживаемости и др.) тест-организмов при малых концентрациях химических веществ в исследуемых объектах, но обладающих токсичностью при использовании в больших количествах.

Зона токсического действия (toxic effect limits) – диапазон токсических концентраций от LC_0 до абсолютно летальной концентрации LC_{100} .

Интегральная токсичность – токсичность сложных смесей, сточных вод, многокомпонентных факторов

Искусственно приготовленная почва (artificial soil)- смесь песка, каолинита, торфа и карбоната кальция для токсикологического тестирования (согласно ИСО 11268-1).

Критерий токсичности – значение характеристики отклика тест-организма на повреждающее действие среды, используемое в методиках биотестирования.

Максимальная наблюдаемая недействующая концентрация, МННК (по observed effect concentration, NOEC) -максимальная концентрация (массовая доля) исследуемого вещества, при которой не наблюдается статистически значимого воздействия по сравнению с контролем.

Медианная летальная (полулетальная) концентрация представляет собой частный случай EC_{50} (см.ниже), когда регистрируется летальный эффект– LC_{50}

Минимальная наблюдаемая действующая концентрация, МНДК (lowest observed effect concentration, LOEC) - наименьшая исследуемая концентрация (массовая доля) исследуемого вещества в исследуемых объектах (воде, почве), при которой наблюдается статистически значимое воздействие на тест-организмы по сравнению с контролем.

Минимально переносимая или пороговая концентрация (threshold concentration) – $LC_{0.}$ (или EC_{50}).

Полуэффективная концентрация, вызывающая 50 % угнетение тест-функции организмов за установленное методикой время (24, 48 или 96 ч) – EC_{50} .

Референтная почва (reference soil) - незагрязненная почва, отобранная поблизости от загрязненного участка, со свойствами (содержание питательных веществ, pH, содержание органического углерода и механический состав), близкими к свойствам исследуемой почвы.

Синхронизированная (синхронная) культура - культура, в которой клетки находятся на одной стадии развития и деление клеток происходит одновременно.

Стандартная почва (standard soil) - почва в токсикологических экспериментах, отобранная в поле или приготовленная искусственно, свойства которой (pH, механический состав, содержание органического углерода) находятся в известном диапазоне.

Тест-культура – лабораторная популяция особей, как правило, одного вида живых организмов (тест-организмов), искусственно поддерживаемая (культивируемая) на питательной среде в стандартных условиях и используемая при оценке токсичности при биотестировании.

Тест-объект – образцы природных или техногенных сред и объектов, которые исследуются методом биотестирования.

Тест-организм – чувствительный организм, используемый при оценке токсичности методом биотестирования.

Тест-реакция - ответная реакция тест-организмов на воздействие исследуемого объекта, выбранная для анализа в определенной тест-системе.

Тест-система – пространственно ограниченная среда, которая включает чувствительные организмы (тест-организмы) или их элементы и образцы исследуемых объектов (тест-объекты).

Тест-функция – исследуемая характеристика тест-культуры организмов (выживаемость, размножение, флуоресценция, биолюминесценция и др.).

Токсиканты – химические вещества, ядовитые для живых организмов.

Токсикометрия – совокупность приемов оценки токсичности вещества, техногенных объектов или природных сред (воды, почвы и т.п.)

Токсикорезистентность – сопротивляемость организмов к воздействию токсичных веществ или компонентов сточных вод

Токсикотолерантность – устойчивость организма к повреждающим воздействиям. Диапазон толерантности - пределы колебаний концентраций токсических веществ, при которых не происходит нарушений функций организма.

Токсический эффект – изменение любого показателя жизнедеятельности или функций организма под воздействием токсиканта в исследуемом объекте.

Введение

Биотестирование в экологическом контроле

В мировой экологической практике начало интенсивного использования методов биотестирования приходится на 1950 г. В России впервые законодательно биотесты внедрены в 1986 г. для контроля сточных и природных вод. В настоящее время биотестирование как способ оценки токсичности объектов окружающей среды включено в экологическое законодательство во многих странах, в том числе в России.

В практике экологического контроля применяются метрологически аттестованные методики, включенные в разнообразные перечни стандартов и реестры МВИ (методик выполнения измерений). Результаты исследований по таким методикам являются легитимными для принятия управленческих решений в соответствующей отрасли народного хозяйства.

Экотоксичность ксенобиотиков устанавливается в количественных токсикологических экспериментах на основе анализа зависимости «доза-эффект» (или «доза - реакция»). Острая токсичность загрязняющих веществ (экополлютантов) определяется на нескольких видах живых организмов, являющихся представителями различных уровней трофической организации в экосистеме (водоросли, растения, беспозвоночные, рыбы, птицы, млекопитающие).

В отдельных странах, например, в США, Агентство по защите окружающей среды требует при определении критериев качества воды, содержащей некий токсикант, определения его токсичности, по крайней мере, на 8 различных видах пресноводных и морских организмов (16 тестов). Нормативные документы в РФ, регулирующие обращение с отходами, предписывают использование не менее двух видов гидробионтов для анализа токсичности водной вытяжки в ходе биотестирования.

В любом случае дискуссионным остается вопрос о корректности выбора набора «стандартных видов» для оценки экотоксичности из большого количества представителей определенных уровней экологической организации. Известны неоднократные попытки ранжировать виды живых организмов по их чувствительности к ксенобиотикам. Однако для различных токсикантов чувствительность к ним живых существ различается. В этой связи существующие методики, рекомендованные для определения токсичности самых разнообразных объектов окружающей среды (почв, сточных, питьевых, поверхностных вод, донных отложений, отходов производства и потребления и т.д.) по реакциям гидробионтов и педобионтов, требуют доработок и совершенствования с целью повышения их эффективности в экологической оценке проб разного агрегатного состояния, загрязненных ксенобиотиками различной природы.

Введение: Биотестирование в экологическом контроле

На данном этапе внедрения биотестирования в оценку экологического риска и нормирования нежелательных воздействий необходимо владеть базовыми знаниями и навыками использования классических лабораторных биотестов (Мелехова и др., 2007).

Требования, предъявляемые к процедуре определения класса опасности отходов, являются одним из ярких примеров востребованности биотестирования в практической экологии.

Внедрение в 2001 г. в природоохранную деятельность «Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды», утвержденных Приказом № 511 Министерства природных ресурсов, привело к широкому практическому использованию биотестов в нашей стране. При характеристике опасности отходов, наряду с расчетом содержания определенных компонентов, анализируемых химическими методами, проводят экспериментальную оценку токсичности объектов на основе реакции живых организмов.

Документ под названием «Критерии отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды», утвержденный Приказом Минприроды России в 2001 г (№ 511), явился важным нормативным актом, регламентирующим применение биологических тест-систем для оценки экотоксичности отходов. Согласно нормативным требованиям, оценка токсичности отходов проводится:

- а) при необходимости подтвердить отсутствие токсичности при установлении расчетным методом V класс опасности пробы;
- б) если невозможно определить качественный и количественный состав отходов и определить класс опасности расчетным методом;
- в) по желанию заинтересованной стороны или при необходимости уточнить полученный расчетным методом класс опасности отходов.

Практическое использование биологических методов оценки отражает современные тенденции в прикладной экологии, которые связаны с развитием биотической концепции нормирования вредных воздействий на природные комплексы. По истечении 14 лет существования Приказа № 511 у пользователей методиками биотестирования накопилось немало «претензий» и корректировок к регламентированной процедуре установления класса опасности отходов. В настоящее время внедрены обновленные критерии в соответствии с Приказом № 536 МПР от 04.12.2014 "Об утверждении Критериев отнесения отходов к I - V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду".

Введение: Биотестирование в экологическом контроле

Процедура биотестирования отходов предполагает исследование водной вытяжки (при массовом соотношении отхода и воды 1:10) на острую токсичность,

т.е. относительно кратковременный эксперимент (от нескольких минут до 4 сут.) не менее чем в 2-х тест-системах, основанных на использовании видов гидробионтов разной таксономической принадлежности (ракообразные и простейшие, водоросли и бактерии и т.п.). Устанавливают пороговые значения, при которых констатируют, что вредное воздействие на гидробионты отсутствует. Этот показатель называют безвредной кратностью разведения (БКР). Например, при определении безвредной кратности разведения водного экстракта из отхода по реакции *Ceriodaphnia affinis* выявляют БКР₁₀₋₄₈, которая означает, что за 48 часов погибает не более 10 %. По смертности рачков *Ceriodaphnia dubia* не более 10% за 24 часов выявляют БКР₁₀₋₂₄, а по смертности рачков *Daphnia magna* не более 10 % за 96 часов выявляют БКР₁₀₋₉₆. При альготестировании выявляют БКР₂₀₋₇₂ либо по снижению уровня флуоресценции хлорофилла, либо по снижению численности клеток водорослей *Scenedesmus quadricauda* - на 20 % за 72 часа

При исследовании водных вытяжек из отходов с повышенным содержанием (содержание сухого остатка в исследуемой водной вытяжке более 6 г/дм³) применяют не менее двух тест-видов, устойчивых к повышенному содержанию из разных систематических групп. Например, по смертности рачков *Artemia salina* не более 10% за 48 часов (БКР₁₀₋₄₈) и по снижению уровня флуоресценции хлорофилла и снижению численности клеток водорослей *Phaeodactylum tricornutum* на 20 % за 72 часа (БКР₂₀₋₇₂). За окончательный результат принимается класс опасности, выявленный в биотесте, проявившем более высокую чувствительность к анализируемому отходу.

Класс опасности устанавливается по разведению водного экстракта, при котором не выявлено вредного воздействия на живые организмы. Безопасными (относящимся к V классу опасности) считают образцы, у которых не выявлено вредного воздействия без разведения исходного экстракта. Для определения других классов опасности оценивается воздействие на тест-культуры раствора с соответствующей кратностью разведения.

Соответствие кратности разведения водной вытяжки из опасного отхода определенному классу опасности

Класс опасности отхода	Кратность (Кр) разведения водного экстракта из отхода, при которой вредное воздействие отсутствует
I	$Kp > 10000$
II	$1000 < Kp \leq 10000$
III	$100 < Kp \leq 1000$
IV	$1 < Kp \leq 100$
V	$Kp = 1$

Биотестирование на гидробионтах: низшие ракообразные

Планктонные виды ветвистоусых рачков используются в мировой практике биотестирования с начала XX века. Они легко культивируются и имеют непродолжительный цикл развития, что делает их весьма привлекательными для использования в биотест-системах.

Самым распространенным видом, используемым для токсикологических исследований в РФ и других странах мира, является *Daphnia magna* Straus. С конца 70-х годов XX века в токсикологической практике широко используют вид *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (в странах ЕС, а также в США в качестве объекта для биотестирования рекомендуется близкородственный вид *Ceriodaphnia dubia*). Метод с использованием цериодафний при строгом соблюдении условий опыта вдвое короче, чем с использованием дафний. Эксперименты с более мелкой цериодафнией компактны - требуются меньшие объемы растворов и посуды. Однако на более крупных дафниях удобнее вести наблюдения за показателями размножения (четче выявляются патологические отклонения - абортирование яиц, эмбрионов, уродства), производить измерения.

Рачок *D. magna* служит не только "датчиком", позволяющим непосредственно выявлять присутствие токсических агентов в водной среде, но и калибровочным эталоном для других методов и биосистем, рекомендуемых для целей биотестирования.

Процедура испытаний с применением ракообразных не требует использования специального дорогостоящего оборудования, может проводиться в обычном лабораторном помещении и в полевых условиях. Продолжительность испытаний - от нескольких часов до 21 суток (при необходимости получения заключений по влиянию на процессы размножения и для выявления отдаленных последствий). Методики с использованием ракообразных вошли в состав ряда методических указаний и рекомендаций по установлению ПДК загрязняющих веществ, а также токсичности сточных и природных вод.

Характеристика *Daphnia magna*

Рачки вида *Daphnia magna* Straus (Надкласс: *Crustacea*, Класс: *Branchiopoda*, Подкласс: *Diplostraca*, *Cladocera*, Отряд: *Anomopoda*, Семейство: *Daphniidae*). Дафнии обитают в стоячих и слабопроточных водоемах и распространены повсеместно на территории России.

D. magna является типичным α-мезосапробом. Оптимальное содержание кислорода для дафнии составляет 7-8 мг/дм³, однако рачок способен переносить снижение концентрации O₂ до 2 мг/дм³, 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 розовато-желтого при благоприятных условиях. Оптимальные значения активной реакции среды pH составляют 7,0 - 8,0, однако временные изменения pH в пределах 5,8 - 9,0 не подавляют существ-

венным образом жизнедеятельность дафнии. Дафнии переносят осолонение до 6‰.

Тело рачков овальной формы, сжато с боков, заключено в хитиновый прозрачный панцирь. Край панциря со спинной стороны вытянут в длинный шип. Сворки на брюшной стороне не соединены, образуют щель. Тело дафний нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы (рис.1). Голова покрыта щитом, передний край которого клювообразно вытянут, образует 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 перемещения в толще воды. Ротовое отверстие у дафний расположено в передней части раковины. Затем идет кишечник, в передней части которого расположены печеночные выросты. Пищеварительный тракт заканчивается задней кишкой. В грудном (торакальном) отделе расположено пять пар грудных ножек. Они сильно расчленены, снабжены многочисленными щетинками, которые образуют частое «сито». Функции ножек связаны с процессами фильтрации воды, питания и дыхания. Частота движений ножек изменяется в пределах 150-470 ударов в минуту в зависимости от качества воды, температуры, физиологического состояния рачков. Задний отдел туловища - брюшной (абдоминальный) - лишен конечностей, изогнут и снабжен парой крупных придатков - каудальными когтями. Заканчивается брюшной отдел постабдоменом, имеющим у вида *D. magna* характерную выемку, наличие которой является видовым признаком. На спинной стороне грудного отдела за кишечником находится сердце, оно сокращается до 200-290 раз в минуту. Половая система дафний представлена парными гонадами: яичниками у самок и семенниками у самцов, которые расположены по обеим сторонам кишечника. Яичник оканчивается яйцеводом, открывающимся в выводковую камеру. Между спинной частью туловища и панцирем расположена выводковая камера, в которой протекает эмбриональное развитие рачков. Над грудными ножками и кишечником расположено жировое тело. При полноценном питании клетки жирового тела окрашены в желтый цвет.

Рост дафний в течение всей жизни неравномерный, с возрастом замедляется и связан с периодическими линьками. Первые три линьки являются ювенильными и следуют через 20, 24, 36 ч, четвертая – созревание яиц в яичнике – и пятая – откладывание яиц в выводковую камеру – следуют с интервалом 2-3 сут. Начиная с шестой, каждая линька сопровождается откладыванием яиц. При хорошем питании размеры молодых дафний после каждой линьки удваиваются. После наступления половой зрелости рост замедляется. Выметанная молодь имеет 0,7-0,9 мм в длину, к моменту половозрелости самки достигают 2,2-2,4 мм, самцы 2,0-2,1 мм. Максимальная длина тела самок может достигать 6,0 мм при сыром весе 7-10 мг.

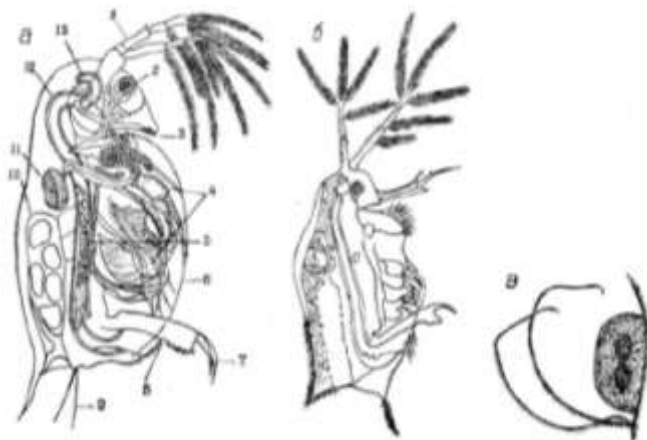


Рис.1. Строение *Daphnia magna* Straus: а – самка: 1 – антенна, 2 – сложный глаз, 3 – антеннула, 4 – грудные ножки, 5 – яичник, 6 – створки панциря, 7 – каудальные когти, 8 – постабдомен, 9 – хвостовые щетинки, 10 – выводковая камера, 11 – сердце, 12 – кишечник, 13 – печеночные выросты; б – самец; в – внешний вид эфиппиума.

С момента рождения до наступления половозрелости дафний проходит 7-9 суток при температуре 20°С. Длительность эмбрионального развития составляет 48 часов. В течение жизни дафния дает ряд пометов, которые при благоприятных условиях следуют один за другим через 2-е суток.

Большую часть года дафнии размножаются партеногенетически, откладывая диплоидные яйца в выводковую камеру, и производя потомство, состоящее преимущественно из самок. При наступлении неблагоприятных условий (изменении температуры, продолжительности светового дня, недостатке пищи, сильном повышении численности и т.д.) в популяции рачков появляются самцы и самки с гамогенетическими яйцами. После оплодотворения диплоидные “зимние яйца” (1-2) откладываются в эфиппиум (производное раковины). Эфиппиумы сбрасываются на дно водоема или прикрепляются к различным субстратам. Период партеногенетического размножения вместе с заключающим его двуполым размножением известен под названием цикла (рис. 2). При культивировании и проведении токсикологических опытов необходимо поддерживать непрерывное партеногенетическое размножение рачков, учитывая особенности биологического цикла развития.

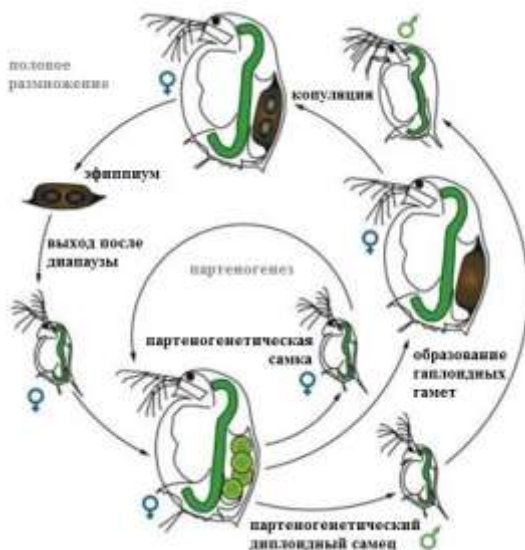


Рис.2. Цикл размножения *Daphnia magna* Straus

Длительное культивирование дафний в лабораторных условиях позволяет установить пределы изменчивости основных биологических показателей рачков в зависимости от сезона. В оптимальных условиях содержания выживаемость дафний не зависит от времени года, оставаясь на уровне 80 - 100% к концу опытов. Хронический опыт на ракообразных длится до получения 4 пометов у контрольных рачков (для дафний этот срок составляет приблизительно 20 суток). Величины плодовитости дафний за 4 помета значительно менялись в течение года: в контроле они колебались от 40 до 138 особей в пересчете на одну самку. Могут наблюдаться повторяющиеся снижения плодовитости рачков в зимний (ноябрь-январь) и летний (июнь-июль) периоды. Длительность культивирования рачков в лаборатории в комфортных условиях даже в течение 10 лет не влияет на результаты хронических опытов.

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. Скопление пищи в желобе свидетельствует о неблагополучии в питании дафний, как и в случае, когда «сито» забито взвесью. Чрезмерно высокое содержание кормовых частиц снижает активность питания дафний, и они могут погибнуть вследствие засорения пищевого аппарата.

Условия лабораторного содержания *Daphnia magna*

Для работы с ракообразными (дафниями и цериодафниями) необходимы следующие материалы и оборудование:

- термолюминистат (климатостат);
- вытяжной шкаф;
- центрифуга;
- микроскоп;
- бинокляр;
- оксиметр;
- pH-метр;
- весы лабораторные, $d \leq 0,001$ г.
- аквариумы для подготовки культивационной воды (от 50 до 200 дм³);
- компрессоры воздушные аквариумные, компрессорные шланги, распылители;
- светильники люминесцентные;
- камера Горяева;
- стаканы химические (на 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 дм³);
- пробирки;
- колбы мерные (на 0,1 - 2 дм³);
- цилиндры мерные (на 0,5 - 2 дм³);
- колбы конические (на 0,2 - 0,5 дм³);
- кристаллизаторы (на 0,5 - 3,0 дм³);
- пипетки мерные (на 0,1 - 10 см³);
- пипетки Пастера (2,5 см³);
- пипетки Мора;
- шланги резиновые различного диаметра;
- резиновые груши;
- чашки выпарительные фарфоровые;
- стекла предметные;
- воронки стеклянные;
- кюветы для выращивания водорослей;
- шелковые мельничные сита (№68-72), аквариумные сачки;
- реактивы, входящие в состав сред для выращивания водорослей (KNO₃, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, Fe₂SO₄·7H₂O, H₃BO₃, MnCl₂·4H₂O, ZnSO₄, MoO₃, NH₄VO₃);
- стандартный токсикант - бихромат калия K₂Cr₂O₇;
- подготовленная культивационная вода для ракообразных;
- дистиллированная вода.

Работу с дафниями необходимо проводить в помещении, где не используются химические летучие вещества. Температуру поддерживают в пределах 20±2 °С. Продолжительность светового дня — 12 часов.

Для культивирования дафний используют отстоянную водопроводную воду или воду из незагрязняемых водоемов. Отбор воды из природных водоемов лучше производить в ясную погоду, желательно после ряда дней без дождя. Неблагоприятное действие на рачков может оказать вода, взятая в паводковый период. Природную воду необходимо процеживать через сито (№ 68-72) во избежание попадания простейших и коловраток, которые могут паразитировать на рачках. Водопроводной водой можно пользоваться после предварительной подготовки. Рекомендуются трехступенчатая очистка и биологизация лабораторной воды. Для получения биологизированной воды водопроводная вода проходит очистку бытовым проточным фильтром, отстаивается и дехлорируется в аквариуме в течение двух недель с использованием микрокомпрессоров для ее принудительной аэрации атмосферным воздухом. Затем вода поступает в аквариум с песчаным грунтом и высшей водной растительностью для биологизации - насыщения воды метаболитами макрофитов. Спустя две недели вода переливается в третий аквариум с микрокомпрессором и используется для лабораторных нужд (рис.3).

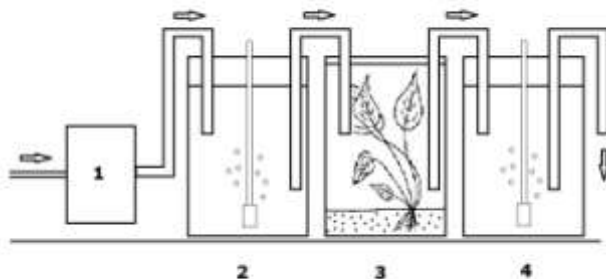


Рис. 3. Схема системы очистки и биологизации воды:
1 - фильтр, 2 - аквариум - отстойник, 3 - аквариум «биологизации»,
4 - аквариум для хранения подготовленной воды.

Основные гидрохимические показатели воды, используемой для культивирования дафний, должны находиться в следующих пределах:

- содержание кислорода 7-8 мг O_2 /дм³;
- pH - 7,0 - 8,2;
- окисляемость по Кубелю 4,2 - 5,8 мг O_2 /дм³;
- общая жесткость: 3,0 - 6,5 мг.экв/дм³ (20 ± 5 мг $CaCO_3$), соотношение Ca/Mg 4:1; (согласно методики ФР.1.39.2007.03222 - 80-250 мг/л $CaCO_3$, согласно методикам OECD и EPA приемлема и более низкая жесткость);
- NH_3^+ , NO_2^- - отсутствие, следы; NO_3^- - не более 10 мг/дм³.

В качестве корма для дафний используют одноклеточные зеленые водоросли и пекарские дрожжи. Водоросли культивируют в стеклянных кюветах, матрахах или плоскодонных колбах. Быстрый рост накопительной культуры водорослей (*Chlorella vulgaris*) создается при соблюдении следующих условий: питательная среда с добавлением микроэлементов (Тамия), круглосуточное освещение лампами дневного света (2-4 тыс. лк или 15-20 $\mu E/m^2$) и интенсивное продувание атмосферного воздуха с помощью микрокомпрессоров. При выращивании водорослей на обедненных средах продувание воздуха не требуется, но рост водорослей идет значительно медленнее (таблица 1).

Питательные среды для водорослей готовят на дистиллированной воде. Исходная концентрация водорослей должна быть около 2 млн. кл/дм³. Через 7-10 дней роста в оптимальных условиях культура достигает максимальной плотности. Для кормления водоросли отделяют от питательной среды путем центрифугирования или отстаивания в холодильнике в течение 5-7 дней. При отстаивании в

холодильнике светло-зеленый раствор водорослей со средой (верхний слой) переливают в колбу и сохраняют в холодильнике для последующего пересева и выращивания новой порции водорослевой суспензии. Оставшийся осадок разбавляется дистиллированной водой и хранится в холодильнике не более 3-х недель. Число клеток в суспензии хлореллы просчитывают в камере Горяева (или любой другой камере для счета водорослей). Кормление дафний проводится 1 раз в день, концентрация корма в сосуде с дафниями 350-700 тыс. кл/см³. В международных стандартах также приняты нормы кормления, выраженные в мг углерода: 0,1-0,2 мг С для одной дафнии в сутки.

Таблица 1. Состав сред для культивирования кормовых водорослей

Соли	Содержание в средах, г/дм ³		
	Тамия	Успенского	Прата
KNO ₃	5,00	0,025	0,100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,50	0,025	0,100
KH ₂ PO ₄	1,25	0,025	0,100
Fe ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	0,003	-	-
FeCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	0,001
Ca(NO ₃) ₂	-	0,100	-
Растворы микро-элементов № 1 и 2	по 1 см ³		

Растворы № 1: H₃BO₃ - 2,86 г/дм³; MnCl₂ · 4H₂O - 1,81 г/дм³; ZnSO₄ - 0,222 г/дм³.
 № 2: MoO₃ - 17,64 мг/дм³; NH₄VO₃ - 22,96 мг/дм³.

Также раз в неделю дафний кормят хлебопекарными дрожжами. Для приготовления дрожжевого корма 1 г свежих или 0,3 г воздушно-сухих дрожжей заливают 100 см³ дистиллированной воды. После набухания дрожжи тщательно перемешивают. Образовавшуюся суспензию отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в сосуды с дафниями в количестве 3 см³ на 1 дм³ воды.

Для культивирования рачков удобны небольшие стеклянные кристаллизаторы объемом 1-3 дм³, плотность посадки 20 – 25 особей на 1 дм³. Появившуюся молодь в необходимом количестве отсаживают в следующие сосуды от поколения к поколению. Когда вновь народившиеся рачки начинают размножаться, материнские особи удаляют. Каждое поколение маркируют и ставят дату рождения. Одновременно в лаборатории содержат культуры двух поколений дафний.

Рачки, отловленные в водоеме или полученные из лаборатории других организаций, необходимо адаптировать к условиям новой лаборатории. Для этого

необходимо получить культуру дафний 3-го поколения. Схема получения необходимого поколения приведена на рисунке 4:



Рис. 4. Схема получения моноклональной одновозрастной молоди дафний для использования в биотест-системах

Требования к тест-культуре

Для токсикологических испытаний используют дафний, начиная с третьего поколения, полученного в лаборатории. Перед проведением эксперимента оценивают устойчивость рачков к бихромату калия, и по величинам LK_{50} за 24 ч определяют соответствие культуры стандарту.

Оценка острой токсичности

Для токсикологических испытаний используют дафний, начиная с 3-го поколения, полученного в лаборатории. Кроме того, молодь должна быть получена во 2-3 помете от размножающихся самок. Первый помет, как правило, выбраковывается и не используется в эксперименте. Оценивают чувствительность односуточных рачков к бихромату калия, и по величинам $ЭК_{50}$ за 24 часа определяют соответствие культуры стандарту. Эта концентрация бихромата калия для дафний в возрасте 18 ± 6 часов должна находиться в пределах $0,9 - 2,5 \text{ мг/дм}^3$ [ГОСТ Р 56236-2014 (перевод ISO 6341:2012)], $0,6-2,1 \text{ мг/дм}^3$ [по методике ГОСТ 32536-2013 (OECD №202: 1992)]. При исследовании водных экосистем цель острых экспериментов на дафниях - установить концентрации исследуемого вещества, которые в водоемах могут вызвать массовую гибель наиболее продуктивной части зоопланктона - фильтраторов. Кроме того, устанавливается концентрация, начиная с которой следует проводить хронические эксперименты.

Острые опыты по оценке токсичности состоят из двух экспериментов - предварительного и основного. Предварительный эксперимент проводят с набором 3 - 5 концентраций вещества, различающихся в 10 раз. Обычно это 0,001; 0,01; 0,1;

1,0; 10,0 и 100,0 мг/дм³ вещества. Длительность такого опыта 24 - 48 часов, он позволяет установить порядок остролетальных концентраций веществ.

Основной острый опыт проводится на основании результатов предварительного варианта с набором около 5 концентраций (коэффициент разбавления 2-3 раза). Выбирают такой диапазон концентраций вещества, которые вызывают иммобилизацию или гибель 10 - 90% рачков. Продолжительность основного острого опыта 48-96 часов.

В экспериментальные стеклянные стаканы заливают исследуемые растворы по 100 см³ и помещают по 10 односуточных дафний. Повторность опытов в предварительном варианте составляет 2 - 3, а в окончательном - не менее 3-х.

Условия проведения опытов следующие: температура 20±20°С, световой день - 12 часов, вода по своим свойствам должна соответствовать требованиям, перечисленным выше. В ходе острых опытов рачков кормят, начиная со 2-х суток эксперимента. При работе со стабильными веществами замену растворов не проводят. В случае, когда исследуется быстро распадающееся или летучее вещество, то испытания проводят с ежедневной заменой растворов, по возможности в вытяжном шкафу.

Учет и анализ результатов

По результатам острых опытов определяют полулетальную концентрацию за 48 или 96 ч экспозиции (LC_{50-48,96}). Наиболее простым и часто применяемым для определения LC₅₀ является графический метод. В системе координат по оси ординат откладывают величину выживаемости (гибели) дафний в процентах за заданный срок опытов, а по оси абсцисс — логарифм концентрации. Точка пересечения горизонтальной прямой, соответствующей 50% выживаемости рачков, с экспериментальной линией определит логарифм искомой концентрации LC₅₀. Более точное определение полулетальной концентрации может проводиться с использованием пробит-анализа.

Результаты опытов дают возможность оценить также наличие острой токсичности по концентрациям (разведениям проб), вызывающим достоверное снижение выживаемости рачков по сравнению с контрольными, и определить максимальную концентрацию, при которой острая токсичность не проявляется (достоверность отклонений определяется обычными методами вариационной статистики).

действием, базируется на оценке Достоверность получаемых результатов в остром опыте можно считать надежной, если удовлетворены следующие условия:

- гибель контрольных дафний не превышает 10 %;
- LC₅₀ бихромата калия за 24 ч для дафний в возрасте 18±6 ч находятся в диапазоне 0,9 — 2,1 мг/дм³;

- содержание растворенного кислорода, определенное в конце опыта, составляет не ниже 2,0 мг O_2 /дм³.

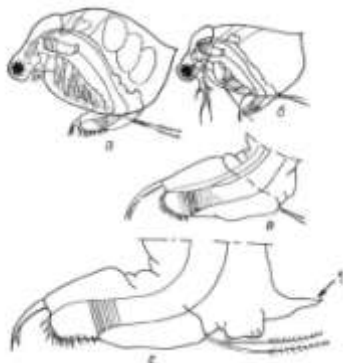
На основании результатов биотестирования по выживаемости рачков делают вывод об уровне острой токсичности исследуемых проб. Определение концентраций (разведений), не обладающих хроническим токсическим двух показателей: выживаемости и плодовитости дафний.

Характеристика *Ceriodaphnia affinis*

Цериодафния для биотестирования впервые предложена американскими специалистами Д.И. Маунтом и Т.Дж. Норбергом (вид *Ceriodaphnia dubia*). В настоящее время тест-организм цериодафния используется во многих методиках.

C. affinis (в-мезосапробный вид) населяет преимущественно небольшие, неглубокие озера, пруды, реки с замедленным течением. Встречается реже, чем другие виды цериодафний, в основном в литоральном планктоне - на открытых местах или между зарослями тростника и погруженными растениями, над заиленным дном. Этот вид распространен по всему земному шару, на территории России - повсеместно, кроме южных районов.

Тело цериодафний заключено в прозрачный хитиновый панцирь, створки которого на брюшной стороне не соединены и образуют щель (рис. 5). Тело нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной (абдоминальный) отделы. Впереди под головным отделом находятся две антеннулы, которые более развиты у самцов, вооруженные осязательными щетинками. По бокам головы расположены две задние хорошо развитые антенны, служащие для скачкообразного передвижения рачков в толще воды. В грудном отделе имеется 5 пар грудных ножек, функции которых связаны с фильтрацией воды, питанием и дыханием. Сердце находится на спинной стороне грудного отдела. Половая система представлена парными гонадами: яичниками у самок и семенниками у самцов, которые расположены по обеим сторонам кишечника. Брюшной отдел самки имеет хорошо развитые абдоминальные выросты, один из которых, сильно выступающий, конусовидный, является видоспецифическим признаком *C. affinis*. На вогнутой стороне каудального коготка имеются щетинки.



Строение *Ceriodaphnia affinis*
Lilljeborg:

- а — самка,
- б — самец,
- в — постабдомен самца,
- г — постабдомен самки (1 — ко-
нусовидный абдоминальный вырост).

Рис. 5. Внешний вид и основные органы *Ceriodaphnia affinis*

Цериодафния имеет более мелкие размеры, чем дафнии: половозрелые самки 1,5 мм, самцы - 0,8 мм, что позволяет в опытах манипулировать с меньшими объемами воды и более компактными емкостями. Биологический цикл развития от рождения до половозрелости у цериодафний вдвое короче, чем у дафний, при оптимальных условиях развития. Так, при температуре 23⁰С созревание наступает на 3-4 суток от рождения, время первого помета - на 4-5 суток, а за срок 10 суток у рачков получают 3 помета. Численность молоди у рачков в первом помете невелика - по 2-6 особей, а начиная с третьего помета - до 20 особей на самку. Максимум полового периода размножения приходится на август-сентябрь, самки образуют эфиппиум с одним яйцом. В лабораторных условиях самцы появляются при недостаточном освещении, снижении температуры, концентрации растворенного кислорода, голодании.

По отношению к кислородному фактору цериодафния более оксифильна, чем дафния, ее нормальное развитие протекает при концентрации растворенного кислорода в воде не ниже 5 мг O₂/дм³. Вследствие этого цериодафнии более чувствительны к органическому загрязнению и веществам, снижающим концентрацию растворенного кислорода в среде.

Условия лабораторного содержания *Ceriodaphnia affinis*

Условия лабораторного содержания цериодафний во многом идентичны условиям содержания дафний, но для их содержания требуется меньший объем воды: 20 см³ на особь. Рекомендуется содержать культуру цериодафний в кристаллизаторах объемом 0,5-1 дм³, которые заполняют водой наполовину.

Исходный материал для лабораторной культуры цериодафний можно получить в учреждениях-разработчиках методики или в водоеме.

Каждые 15-20 суток культуру цериодафний обновляют. Для этого отбирают 20-30 особей молоди и помещают в сосуды для культивирования, заполненные

водой из расчета 20-30 см³ на одну особь. Через 5 суток, когда новое поколение начинает размножаться, старую культуру выбрасывают.

Культивирование цериодафний идет благоприятно, если в течение 10 суток после рождения гибель рачков не превышает 20%, а численность молоди в первых трех пометах в пересчете на самку составляет не менее 15 особей. Отклонения от этих параметров свидетельствуют о нарушении условий культивирования — качества воды и/или корма.

Ежедневно цериодафний кормят суспензией зеленых водорослей, раз в неделю — суспензией хлебопекарных дрожжей (см. раздел «Условия лабораторного содержания» *Daphnia magna*).

Для биотестирования используют молодых особей в возрасте 4-24 ч после рождения. Разница в возрасте молоди цериодафний одной выборки не должна превышать 8 ч. За два часа до начала опыта молодь кормят.

Чтобы получить одновозрастных цериодафний, из основной культуры отлавливают 10-20 половозрелых самок в возрасте 7-10 суток и помещают по одной в стеклянные сосуды для культивирования и кормят ежедневно. Полученную от них молодь используют в опыте. Также возможен вариант, когда за неделю до эксперимента новорожденную молодь рассаживают в стаканы (как в предыдущем варианте) до получения 3-го или 4-го помета, который используют в опыте. Выметанную самками одновозрастную молодь изымают из сосудов, часть используют для биотестирования, а оставшуюся удаляют.

Процедура биотестирования на *Ceriodaphnia affinis*

Биотестирование проводят в климатостате, люминостате, боксе или помещении, в котором обеспечиваются оптимальная освещенность (400-600 лк) и температура (23±1 °C). Результаты биотестирования считают правильными, если гибель цериодафний в контроле за весь период наблюдений не превышает 10% и концентрация растворенного кислорода в тестируемой воде к концу биотестирования составляет не менее 5,0 мг/дм³.

Требования к тест-культуре

Для токсикологических испытаний используют цериодафний, начиная с третьего поколения, полученного в лаборатории. Перед проведением эксперимента оценивают устойчивость рачков к бихромату калия, и по величинам LC₅₀ за 24 ч определяют соответствие культуры стандарту. Эта концентрация для цериодафний должна находиться в пределах 1,0-2,5 мг/дм³.

Для определения LC₅₀ за 24 ч готовят серию концентраций бихромата калия: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/дм³. В стаканы с 50 см³ раствора помещают по 4 цериодафнии (повторность 5-кратная) и через сутки подсчитывают число выживших

рачков. По результатам опыта определяют LC_{50-24} (см. раздел «Учет и анализ результатов»).

Оценка острой токсичности

Основная цель острых экспериментов на цериодафниях — установить токсичность исследуемых проб воды, водных вытяжек из почв и т.п. по выживаемости молоди. Кроме того, устанавливается разбавление, начиная с которого следует проводить хронические эксперименты.

Схема постановки острого опыта на цериодафниях аналогична таковой для дафний (см. стр. 19). Продолжительность острого опыта - 48 ч.

При биотестировании используют по 5 сосудов для контрольной, тестируемой воды и всех ее разбавлений (повторность опытов для каждого разбавления пятикратная). В каждый сосуд соответственно наливают по 50 см³ контрольной, тестируемой воды или ее разбавлений и помещают по 4 цериодафнии в возрасте 4-24 часов.

Вначале помещают цериодафний в контрольную, а затем в тестируемую воду. При тестировании серии разбавлений посадку ведут от большего разбавления к меньшему.

Учет выживших цериодафний проводят через 1, 6, 24 и 48 ч от начала биотестирования. Особей считают выжившими, если они свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позднее 15 с после его легкого покачивания. Если в любой учитываемый период времени в сточной воде гибнет 50 и более процентов выборки особей, биотестирование прекращают. В течение 48 ч цериодафний не кормят.

Учет и анализ результатов

По результатам острых опытов определяют полулетальную концентрацию вещества (разведение пробы) за 48 ч экспозиции.

Результаты опытов дают возможность оценить также наличие острой токсичности по концентрациям (разведениям проб), вызывающим достоверное снижение выживаемости рачков по сравнению с контрольными и определить максимальную концентрацию, при которой острая токсичность не проявляется (достоверность отклонений определяется обычными методами вариационной статистики).

Достоверность получаемых результатов в остром опыте можно считать надежной, если удовлетворены следующие условия:

- гибель контрольных цериодафний не превышает 10 %;
- LC_{50} бихромата калия за 24 ч для цериодафний в возрасте находятся в диапазоне 1 — 2,5 мг/дм³;
- содержание растворенного кислорода, определенное в конце опыта, составляет не ниже 5,0 мг O₂/дм³.

При углубленных исследованиях определяют хроническую токсичность, где основными показателями токсического действия являются выживаемость, плодовитость и качество потомства.

Биотестирование соленых проб с использованием *Artemia salina*

Нередко при биотестировании приходится иметь дело с пробами водных вытяжек из образцов высокоминерализованных почв, отходов или морских вод, загрязненных токсикантами. Другими словами, приходится выявлять степень токсичности на фоне повышенной минерализации растворов, в которых пресноводные организмы гибнут именно из-за наличия высокого количества солей. Для этой цели разрабатываются тест-системы, включающие морские организмы или виды, адаптированные к обитанию в условиях повышенной минерализации. Таким тест-организмом может быть давно известный и широко применяемый экологами вид ракообразных из рода артемий.

Специально для анализа экотоксичности высокоминерализованных почв и отходов, сбрасываемых, например, в моря и океаны, актуализирована в настоящее время «Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L.» ФР 1.39.2006.02505.

Методика, разработанная сотрудниками ЛЭТАП и лаборатории водной токсикологии МГУ, рекомендована для определения острой токсичности высокоминерализованных водных вытяжек из почв и отходов, поверхностных и сточных вод, по реакции солоноватоводных рачков *A. salina* L. с уровнем солёности от 6 ‰ и выше.

Характеристика артемий *Artemia salina*

Жаброногий рачок *A. salina*— широко распространенный эвригалинный вид. Тело артемий удлинённое, не имеет раковины, состоит из многочисленных, ясно различимых сегментов, хорошо подразделяется на отделы: голову, тункус, несущий листовидные ножки (11 пар), и тельсон (или abdomen) (рис.6).

Голова с двумя стебельчатыми сложными глазами и одним непарным науплиальным глазом. 2-я антенна у самцов большая и крючкообразная, превращена в хватательный орган. Abdomen закачивается фуркой, состоящей из 2 фуркальных пластинок, покрытых щетинками. (Липин, 1950, Определитель пресноводных беспозвоночных..., 1995). Размеры тела: 0,5 – 1,5 см (от науплия до взрослой особи).



- 1 — науплиальный глаз
- 2 — антеннула
- 3 — фасетированный глаз
- 4 — антенна
- 5 — грудные ножки
- 6 — яйцевой мешок
- 7 — абдомен (брюшко)
- 8 — фурка (вилочка)

Рис. 6. Строение жаброногого рачка *Artemia salina*, эвригалинного вида для биотестирования соленых проб

У этих рачков выражен половой диморфизм, самцы и самки отличаются окраской, строением и размером антенн, которые у самцов значительно больше.

Получение исходного материала, выращивание культуры, содержание, кормление

Исходным материалом для биотестирования на артемиях служат науплии в возрасте до 24 часов, полученные в лаборатории из покоящихся яиц. Науплии артемий легко получают в очень широком диапазоне солености из яиц (цист), которые могут храниться продолжительное время в холодильнике. Сухие яйца артемий приобретают в зоомагазинах, в специализированных на рыбоводстве или аквариумистике фирмах, а также в других лабораториях, занимающихся биотестированием. Культура должна быть требуемой видовой принадлежности, характеризоваться чувствительностью к стандартному токсиканту в определенном диапазоне, а измеряемые с помощью этой культуры тест-параметры должны соответствовать метрологическим характеристикам. При покупке артемий в зоомагазине необходимо учитывать, что для биотестирования нужны не декапсулированные цисты. Также не стоит хранить цисты более 2-3 лет, так как намного снижается выклев.

Сухие яйца артемий заливают отстоянной водопроводной водой (1-3 г яиц на 500 см³ воды). Через 30 минут сливают слой воды над осевшими яйцами, при этом удаляют всплывшие нежизнеспособные яйца и пустые оболочки яиц. Очистку повторяют несколько раз. Затем яйца несколько раз промывают природной или искусственной морской водой. Промытые яйца помещают в термолюминостат для выклева. При температуре 23±2°С науплии появляются через 24-36 часов. Для синхронизации культуры первых науплиев отбрасывают. В опыте используют

рачков, полученных в течение следующего часа и выдержанных в течение 2 часов (таким образом, возраст рачков к началу опыта — $2,5 \pm 0,5$ часа).

В первые дни жизни науплии находятся на эндогенном питании, поэтому, при выявлении острой токсичности при 48 ч экспозиции, кормить молодь не надо.

Приготовление морской воды. Для выклева артемий можно использовать раствор поваренной (нейодированной) соли (NaCl), или морскую соль (можно приобрести в зоомагазине). Готовят исходный раствор соленостью 30‰ так: соль растворяют в дистиллированной воде, затем отстаивают и аэрируют не менее недели. Не позднее чем за сутки до начала опыта исходный раствор разбавляют дистиллированной водой до необходимой солености, отстаивают и аэрируют.

Существует целый ряд способов повышения выклева артемии. Самый простой из них — промораживание. Даже одни сутки в морозильной камере холодильника незадолго до инкубации способны повысить процент выклева рачков. Активация биологических процессов холодом у беспозвоночных призвана имитировать зимний период покоя. Наилучшие результаты дает промораживание яиц артемии при температуре минус 20-25 °С в насыщенном растворе соли в течение 1-2 месяцев в морозильной камере. Перед началом инкубации яйца вынимают из морозильника и оставляют на 3-4 дня при комнатной температуре.

Другой способ — обработка перекисью водорода. Яйца замачивают в 3%-ном растворе перекиси в течение 15-30 минут, после чего промывают и помещают в инкубатор. Можно часть яиц высушить и хранить несколько дней для порционной закладки. При отсутствии морозильной камеры этот способ является наилучшим.

Культивирование артемий

В возрасте 3 — 4 суток (метанауплис III) науплиусы переходят на активное питание и совершают первую линьку. В зависимости от температурных условий артемии достигают половозрелости через 3-4 недели после выклева из яиц.

Артемии являются фильтраторами. Взрослым особям пищей служат мелкие планктонные организмы (одноклеточные водоросли, бактерии) и частицы детрита. В качестве корма рекомендованы культуры одноклеточных водорослей *Phaeodactylum uviella* (эксувиелла) и *Nephrochloris salina* (Временные методические рекомендации..., 1999). Также удобно использовать одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella* sp. Культивировать морские водоросли можно на средах Гольдберга, F/2.

Артемию кормят 2-3 раза в неделю. Суспензию водорослей добавляют до появления светло-зеленой окраски воды (соответствует примерно 100 тыс. кл/см³). В дополнение к водорослевому корму можно использовать сухие пекарские дрожжи. Для приготовления суспензии 0,3 г дрожжей растворяют в 100 см³ морской воды и отстаивают некоторое время до оседания мутного осадка. Суспензия

дрожжей хранится в холодильнике не более 3 дней. Артемий кормят из расчета 1 см³ суспензии на 500 см³ воды.

Взрослые рачки способны откладывать зимние яйца — цисты. Для этого достаточно просто оставить аквариум с артемиями до полного высыхания воды. Это действие имитирует естественное высыхание водоемов, и повышение солености воды стимулирует рачков к откладыванию цист.

Необходимые материалы для постановки эксперимента

- Стаканы 150 см³ для разведения культуры
- Пластиковые бакпечатки (одноразового использования) или стеклянные стаканы объемом 50 см³ для постановки опыта, по 5 шт. на каждую пробу или её разведение
- Пипетки пластиковые или стеклянные для отлова молоди
- Лупа или увеличительное стекло

Процедура биотестирования на *Artemia salina*

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводят в пяти параллельных сериях. В качестве контроля используют пять параллельных серий с культивационной водой. В качестве культивационной воды используют отстоянную водопроводную воду с добавлением NaCl (или морской соли), соответствующей солености, т.е. идентичной солености тестируемой пробы. Биотестирование проводят с соблюдением требований к температуре (23±2°С) и качеству культивационной воды.

Для биотестирования используют бакпечатки или другие широкогорлые сосуды, в которые наливают по 10-15 см³ испытуемой жидкости или культивационной воды (контроль). В каждую из 5 бакпечаток помещают по 4 особи артемии, таким образом, в целом, в каждом эксперименте и контроле используют по 20 особей.

Сосуды с рачками оставляют на 48 часов при температуре 23±2°С. По истечении этого времени производят подсчет выживших и погибших особей. Выжившими считают артемии, которые свободно перемещаются в толще воды. Обездвиженных особей относят к погибшим. Результаты наблюдений заносят в рабочий журнал.

Если гибель артемий в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитывают и его повторяют. После того, как результаты эксперимента учтены, все артемии выбрасывают, посуду промывают водой (температура не выше 40°С), споласкивают дистиллированной водой.

Требования к чувствительности тест-культуры

Для каждой новой партии цист артемий, а также ежеквартально определяют диапазон чувствительности тест-культуры к стандартному токсиканту — бихромату калия ($K_2Cr_2O_7$). Определяют концентрацию токсиканта, при которой за 48 часов гибнет 50% подопытных организмов, - полулетальную концентрацию LC_{50-48} . Допустимый диапазон концентрации бихромата калия составляет 2,0 — 7,0 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 и нарушения, допускаемые в процессе культивирования организмов и условиях проведения опытов.

Обработка и оформление результатов

При определении острой токсичности исследуемых проб, а также их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель 50% тест-объектов за 48 часовую экспозицию — LC_{50-48} ;
- безвредное разбавление пробы, вызывающее гибель не более 10% за 48 часовую экспозицию BKP_{10-48} .

Для оценки острой токсичности пробы рассчитывают процент погибших особей (A, %) по формуле: $A = (X_i/X_t) \cdot 100$, где X_i — количество исходных особей; X_t — количество погибших особей в тестируемой воде через 48 часов.

За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов пяти параллельных определений.

Вопросы для контроля усвоения материала

1. *Какая разница между острой и хронической токсичностью?*
2. *Какие виды ракообразных применяются для оценки высокоминерализованных проб?*
3. *Для чего проводится синхронизация лабораторной тест-культуры ракообразных?*
4. *Как проверяется чувствительность стандартной тест-культуры?*
5. *Можно ли, используя методы биотестирования на гидробионтах, определить, загрязнена ли почва?*
6. *Как и с какой целью готовят биологизированную воду?*

Биотестирование на гидробионтах: водоросли

Водоросли, как и высшие водные растения, представляют в водных экосистемах группу организмов-продуцентов. Им принадлежит ведущая роль в синтезе органического вещества, а также в формировании качества природных вод, что определило их широкое применение для оценки токсичности веществ различных классов (тяжелых металлов, хлора, фосфоро- и хлороорганических соединений, поверхностно-активных веществ и др.). Все эти факторы обусловили включение водорослей в число обязательных объектов исследований по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ в воде, а также при определении класса опасности сточных вод.

Широко применяются микроводоросли и для оценки класса опасности промышленных отходов и почв по реакции на водные экстракты из твердофазных объектов.

Метод биотестирования с применением культуры водорослей (или альготестирование) основан на определении изменения их характеристик (прироста численности, интенсивности флуоресценции хлорофилла и др.) в опытной пробе (при воздействии токсикантов) относительно контроля.

Характеристика видов водорослей, используемых для биотестирования

Для биотестирования несоленых проб наиболее часто используются следующие виды пресноводных микроводорослей.

***Scenedesmus quadricauda*.** Данный вид относится к ценобиальным организмам. Ценобии 2-, 4-, реже 8, 16-клеточные, в виде плоских пластинок (Рис. 7). Клетки удлинено-овальные, с закругленными концами. Краевые клетки имеют два отогнутых наружу рога. Оболочка гладкая. Хроматофор периферический с одним боковым пиреноидом, ядро центральное. Оболочка гладкая. Размножение при помощи автоспор. При размножении в материнской клетке образуются 2-4 автоспоры, которые при выходе слагаются в ценобии. Иногда при неблагоприятных условиях (особенно в условиях культуры) вместо ценобиев образуются отдельные клетки. Вид широко распространен в разнообразных биотопах, главным образом, в планктоне пресных водоемов.



Рис. 7. Внешний вид ценобия *Scenedesmus quadricauda*

Chlorella vulgaris. Хлорелла относится к одноклеточным водорослям (рис. 8). Клетки шаровидные с тонкой оболочкой, без слизи. Хроматофор чашевидный, с пиреноидом. Размножение автоспорами, образующимися по 4-8, реже по 16 внутри материнской клетки и освобождающимися через разрыв ее оболочки. Широко распространенный вид в планктоне пресных водоемов, особенно южных широт.



Рис. 8. Внешний вид клеток *Chlorella vulgaris*

Selenastrum capricornutum. Одноклеточная зеленая водоросль (рис. 9). В настоящее время видовое название изменено на *Pseudokirchneriella subcapitata* (Hindak, 1990).



Рис. 9. Внешний вид клеток *Selenastrum capricornutum*

Для биотестирования соленых сред, как правило, используют культуру морской одноклеточной диатомовой водоросли — *Phaeodactylum tricornutum*. Вид представлен клетками овально-треугольной формы с шипиками на концах (рис. 10). Клетки неподвижны, длина 13-16 мкм. Размножение вегетативное путем простого деления клеток надвое.



Рис. 10. Внешний вид клеток *Phaeodactylum tricornutum*

Культивирование водорослей

Для биотестирования используют нормально развивающуюся культуру водорослей (~30-50 тыс.кл/см³), частично синхронизированную чередованием «дня» и «ночи», содержащую не менее 90% живых клеток и находящуюся в фазе логарифмического роста. Для этого предварительно (за 3-5 сут. до опыта) водоросли пересевают в новую питательную среду.

Водоросли выращивают на питательных средах со специально подобранным для разных систематических групп минеральным составом (обычно ср. Успенского №1 или Прата; таблица 2), используя реактивы с маркировкой не ниже хч.

Растворы солей вносят в дистиллированную воду из расчета 1 см³ концентрированного раствора на 1 дм³ воды в порядке, указанном в прописи среды. Среда для культивирования пресноводных видов стерилизуют в автоклаве или слабым кипячением в течение 20-30 мин. Железо вносится в количестве 1 см³ на 1 дм³ среды после стерилизации.

Таблица 2. Состав питательной среды Успенского №1 и Прата

Компоненты среды	Концентрация в среде для культивирования, г/дм ³		Концентрация исходных растворов для приготовления среды, г/100 см ³	
	Прата	Успенского №1	Прата	Успенского №1
KNO ₃	0,1	0,025	10,0	2,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,025	1,0	2,5
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	0,144	-	14,4
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,01	-	1,0	-
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	-	0,025	-	2,5
K ₂ CO ₃	-	0,0345	-	3,45
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,001	0,002	0,1	0,2

Среда для биотестирования на морских водорослях готовят на природной или искусственной морской воде нужной солености (обычно 20 ‰, что соответствует средней солености морской воды в шельфовой зоне), стерилизуют трехкратной пастеризации на водяной бане при 80 градусах. pH после стерилизации 7,0–7,3.

Водоросли культивируют в стеклянных конических колбах емкостью 100-250 см³ (с полезным объемом 50-100 см³, соответственно). В эти колбы вносят среды с культурами клеток и помещают в люминостат при освещенности 3,5 тыс. люкс со сменой дня и ночи (12:12 часов).

Оптимальный режим предусматривает культивирование при температуре 20±2 °С в люминостате или климатостате. Для обогащения культуры углекислым газом (необходимым для нормального протекания процесса фотосинтеза), уменьшения оседания клеток водорослей и их прилипания к стенкам сосуда содержимое колб перемешивают два раза в сутки (или на качалке). Поскольку при повышении температуры до 25 °С градусов токсичность веществ повышается, а при понижении до 12–15 °С, наоборот, уменьшается, то одной из рекомендаций при проведении токсикологического эксперимента на водорослях является создание термостатируемых условий (по возможности).

Водоросли рекомендуется один раз в 5-10 дней пересевать. Для этого в чистую простерилизованную колбу со свежей средой над пламенем спиртовки приливают верхний слой из колбы ранее культивируемых водорослей до появления зеленоватого оттенка. При этом получают начальную плотность клеток в колбе

для культивирования примерно 200-300 тыс.кл/см³. Колбу закрывают ватно-марлевым тампоном или фольгой, перемешивают, подписывают на колбе название культуры, дату посева и ставят в люминостат.

Если исходная маточная культура старая (25-30 сут.), ее можно синхронизировать. Для этого ее переливают в стерильный цилиндр с пробкой и ставят в темное место. За это время старые и мертвые клетки оседают на дно, а молодые клетки (как более легкие) остаются на поверхности культуральной среды. Затем верхний слой жидкости, состоящий преимущественно из молодых клеток, сливают в колбу с чистой питательной средой и ставят в люминостат для подращивания культуры. При необходимости процедуру синхронизации культуры повторяют дважды.

Требования к тест-культуре

Пригодность культуру водорослей к биотестированию оценивают по реакции на токсикант сравнения Периодически (один раз в два месяца) необходимо проверять чувствительность культуры водорослей к эталонному токсиканту бихромату калия — $K_2Cr_2O_7$. Бихромат калия в концентрациях 1,3–2,5 мг/дм³ за 48 ч или 0,2–2,0 мг/дм³ за 72 часа должен вызвать 50 %-ное снижение численности клеток микроводорослей. Если результаты опытов не укладываются в указанный интервал, следует проверить правильность приготовления исследуемых растворов, температуру культивирования и состояние культуры водорослей.

Необходимые материалы для постановки эксперимента:

- колбы 50 или 100 см³, по три шт на каждую пробу или её разведение;
- большая колба на 1-2 л для приготовления среды;
- цилиндры на 25, 50, 100 см³;
- пробирки на 10 см³ с притертой пробкой - 5-7 штук для разведений токсиканта;
- дозаторы пипеточные или пипетки на 0,1; 1 и 10 см³;
- камера Горяева и покровные стёкла;
- газ горелка, спиртовка;
- аналитические весы;
- микроскоп оптический с увеличением $\times 200$ (для ручного подсчёта клеток);
- флуориметр (например, Фотон-10, Флюорат-02-3М или другой).

Процедура биотестирования на микроводорослях

В большую колбу объемом 1-2 дм³ с предварительно приготовленной средой Успенского №1 стерильно вносят плотную культуру водорослей (в экспоненциальной фазе роста) до получения численности 30-50 тыс. кл/см³ (слабое бледно-

зеленого окрашивания). Объем среды для культивирования водорослей определяется количеством опытных и контрольных колб. Например, для постановки опыта с пятью концентрациями токсиканта в трехкратной повторности для каждой концентрации и контроля потребуется 1,8 дм³ культуры водорослей при объеме пробы 100 или 900 см³ культуры водорослей при объеме пробы 50 см³.

Культуру водорослей численностью 30-50 тыс. кл/см³ стерильно разливают по опытным колбам (по 50 или 100 см³, в зависимости от объема колбы) и добавляют объем раствора токсиканта, необходимый для создания той или иной его концентрации в пробе. Колбы помещают в люминостат или в хорошо освещенное место, защищенное от прямых солнечных лучей. Через 72 ч биотестирование заканчивают. Опыты ставятся без смены растворов в 3 - 5 повторностях для получения статистически значимых результатов. В каждой колбе учитывают численность клеток на 1, 2 и 3 сутки для определения наличия острого токсического действия пробы воды.

При необходимости, в отсутствие острого токсического действия, исследуют наличие хронической токсичности, для чего биотестирование продолжают до 14 сут.

Подсчет клеток водорослей проводят в остром опыте ежедневно, в хроническом на 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 сутки.

На 14 сутки от начала эксперимента опыт прекращают и устанавливают, оказывают ли исследуемые концентрации вещества хроническое токсическое действие.

Учет и анализ результатов биотестирования

Токсичность веществ для водорослей можно фиксировать по целому ряду показателей — побурение, посветление, лизис культуры клеток, изменение pH среды в культуре, определение соотношения живых и мертвых клеток водорослей методом люминесцентной микроскопии и пр. Для более полной оценки токсического действия веществ, кроме вышеперечисленных, дополнительно можно использовать такие показатели как определение биомассы водорослей (расчетным способом по объему клеток); определение содержания фотосинтетических пигментов — хлорофиллов, каротиноидов (с помощью экстрагирования ацетоном); определение интенсивности фотосинтеза (с помощью флуориметра); скорость деления клеток водорослей (расчет генераций) и многие другие физиологические и биохимические показатели.

Для целей практического экоконтроля аттестованными методиками предписывается определение изменения прироста численности клеточной популяции водорослей или флуоресцентных показателей в опыте относительно контроля.

Общее число клеток считают в камере Горяева (для культур пресноводных микроводорослей) или Нажотта (для культур морских микроводорослей). Стандартный объем данных камер 0,0001 см³ (камера Горяева) и 0,1 или 0,3 см³ (ка-

мера Нажотта). При невысокой исходной плотности культур (5-10 тыс. кл/см³) для подсчета численности клеток целесообразно использовать счетные камеры большего объема (камеры Нажотта).

Камеру Горяева и покровное стекло хорошо отмывают и обезжиривают, покровным стеклом накрывают камеру и притирают его до образования радужных колец интерференции. Тем самым создается фиксированный объем просчитываемой пробы. Из каждой колбы пипеткой или стеклянной палочкой аккуратно наносят по одной капле тщательно перемешанной суспензии водорослей на верхний и нижний края покровного стекла. При этом заполняется верхняя и нижняя счетные области камеры. Очень важно, чтобы при заполнении камеры не образовывались пузырьки воздуха, поскольку в этом случае объем пробы будет меньше вместимости камеры, и точно определить число клеток водорослей в 1 см³ просчитываемой пробы уже не удастся. Избыток жидкости вытесняется по канавкам камеры и осторожно удаляется фильтровальной бумагой.

При работе с камерой Горяева (рис. 11) удобно просчитать количество клеток в 25 больших квадратах, а затем провести пересчет на 1 мл (= 1 см³) по следующей формуле: $X = m \cdot 10^4$, где X – общее количество клеток в 1 см³; m – количество (сумма) клеток в 25 больших квадратах. Количество клеток выражают в тысячах и миллионах на 1 см³. Каждую повторность (3-5 повторностей) пробы просчитывают не менее 2 раз (2 сетки). Если значения сильно разнятся, считают большее число раз до получения близких результатов.

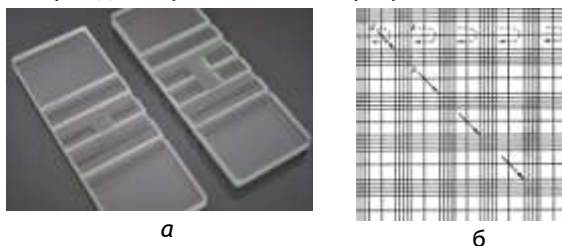


Рис. 11. Внешний вид (а) и сетка (б) камеры Горяева

Учет численности клеток также можно проводить в камере Фукса-Розенталя объемом 3,2 см³. Техника заполнения камеры Фукса-Розенталя такая же, как и при работе с камерой Горяева, поскольку и при использовании этой камеры нам важно создать постоянный объем просчитываемой пробы.

При высокой численности клеток просчитывают по диагонали 16 квадратов, при малой – ведут подсчет по всему полю камеры. Количество клеток также выражают в миллионах в 1 см³ (или в миллиардах в 1 дм³). Расчет числа клеток проводят по формуле:

$$M = \frac{m \cdot 10^3}{n \cdot V},$$

где M – количество клеток в 1 см³; m – количество просчитанных клеток (сумма); n – количество просчитанных маленьких квадратов камеры; V – объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата.

Результаты опыта и статистическую обработку результатов заносят в основную таблицу.

Пример оформления результатов опыта представлен в таблице 3.

Таблица 3. Изменение общей численности клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бихромата калия (численность клеток выражена в дес. тыс. кл/см³)

Срок, сутки	Контроль	Концентрации бихромата калия, мг/дм ³				
		0,1	0,5	1	5	10
1	10,2±1,33	10±1,67 $t_d = 0,955$	10±1,26 $t_d = 0,22$	10,2±1,6 $t_d = 0$	10,7±2,07 $t_d = 0,499$	8,2±0,8 $t_d = 3,24$
	100 %	106,6 %	98,4 %	100 %	104,1 %	80,4 %
3	56±3,29	57,3±4,97 $t_d = 0,274$	48±7,38 $t_d = 2,68$	36,4±5,76 $t_d = 4,75$	26±3,79 $t_d = 7,46$	18,4±2,2 $t_d = 11,4$
	100 %	102,4 %	85,7 %	65 %	46,4 %	32,8 %

Примечание: жирным шрифтом отмечены достоверные отличия опытных значений от контроля.

Величину ЕС₅₀ за 72 (или 96 час) определяют расчетным способом с использованием пробит - анализа.

Определение интенсивности фотосинтеза клеток водорослей

Помимо методов прямого подсчета клеток водорослей в камере Горяева возможно измерение фотосинтетической активности клеток с использованием отечественных и импортных приборов (флуориметр Фотон-10 или различных РАМ).

Данный метод основан на том, что в присутствии загрязняющих веществ происходит резкое изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла в клетках. Регистрируемая величина – квантовый выход флуоресценции является количественной мерой токсичности пробы по отношению к контролю.

На основе данного метода в РФ разработана и аттестована для целей государственного экологического контроля экспресс-методика биотестирования токсич-

ности вод и отходов с использованием флуориметра Фотон-10 (ПНД Ф 14.1:2:4.16-09 16.1:2.3.3.14-09). В качестве тест-культуры используется культура водоросли хлорелла. Длительность анализа с учетом одночасовой экспозиции клеток водоросли в тестируемой пробе не превышает 1,5 часов.

В Европе и США используется методика исследования токсичности проб с использованием приборов серии РАМ согласно требованиям OECD. Исследуется фотосинтетическая активность тест-культуры после 4 часовой экспозиции.

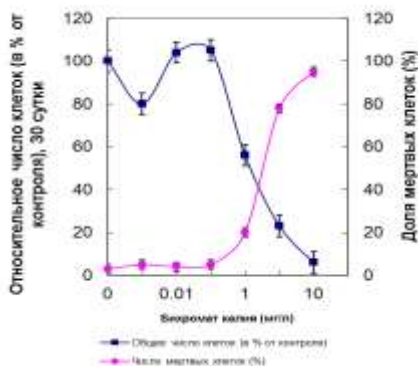
Для характеристики функционального состояния фотосинтетического аппарата водорослей часто используют метод регистрации *замедленной люминесценции* (флуоресценции) хлорофилла *in vivo*: $I_{\text{макс}} - I_{\text{стац}}$, где $I_{\text{стац}}$ — стационарный уровень свечения, когда фотосинтез максимален («световое» состояние).

Метод замедленной люминесценции позволяет также судить о повышении или, наоборот, снижении устойчивости клеток водорослей к токсическому воздействию. Для этого при нагревании со скоростью 5° в минуту от 20 до 60°C регистрируется так называемая температурная зависимость флуоресценции. На полученной кривой отмечают температуру положения максимума замедленной люминесценции. Рост термоустойчивости означает повышение общей устойчивости клеток к повреждающим, в том числе токсическим, воздействиям.

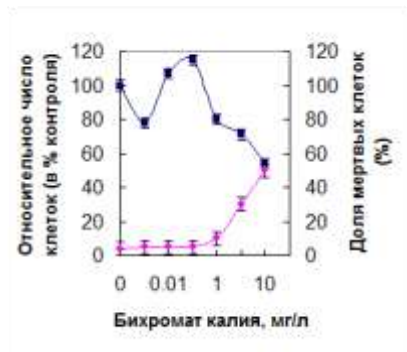
Эффективную концентрацию (EC_{50}) можно определять пробит-анализом или графическим способом. Для этого на графике, отражающем связь эффекта с концентрацией, определяют точку, соответствующую значению пробита 5 (50%-ный эффект), и опускают из нее перпендикуляр на ось концентраций. Место пересечения этого перпендикуляра с осью X и есть искомая величина логарифма концентрации EC_{50} .

Некоторые особенности реагирования микроводорослей на токсическое воздействие

В физиологической литературе отмечается, что пропорциональность (или линейность) ответа водорослей на действие повреждающего фактора наблюдается редко. Обычно же реакция носит сложный характер и выражается в фазности реагирования. При этом характер реагирования живой системы представляют двух- либо трехфазной кривой. Например, на следующем рисунке представлена кривая относительной численности клеток *S. quadricauda* в присутствии различных концентраций бихромата калия на 30 сутки, на котором видна последовательная смена фаз роста: фаза ингибирования — фаза стимуляции — фаза ингибирования.



а



б

Рис. 12. Многофазные кривые относительной численности клеток *Scenedesmus quadricauda* в присутствии бихромата калия:
а - на 30-е сутки, б - на 4-е сутки

Среди водных растительных организмов широко распространена адаптация к токсикантам (пестицидам и тяжелым металлам).

В определенных пределах виды микроводорослей выживают в слабо загрязненной среде в результате физиологической адаптации. Существует высокая межвидовая вариабельность в чувствительности к токсикантам у пресноводных и морских водорослей. При низких уровнях загрязнения индуцированные эффекты могут быть скомпенсированы. Однако с увеличением концентрации загрязнителя физиологической адаптации оказывается недостаточно, и в этом случае генетическая вариабельность природной популяции может гарантировать выживание, по крайней мере, некоторым генотипам. Скорость появления резистентных к загрязнителям спонтанных мутантов (появившихся еще до контакта с загрязнителем) является относительно низкой (от 10^{-5} до 10^{-7} мутантов на клеточное деление). Такая скорость может гарантировать выживание микроводорослей при высоких токсических уровнях загрязнения при условии, если размер популяции будет достаточно большим.

Поэтому необходимо крайне осторожно подходить к оценке токсичности тех или иных веществ для водорослей, особенно принимая во внимание тот факт, что у быстро размножающихся планктонных организмов возникающие функциональные изменения могут легко закрепляться в ряду поколений, приобретая необратимый характер и способствуя тем самым возникновению токсикорезистентных популяций.

Часто при проведении биотестирования сточных и природных вод наблюдается эффект стимуляции, т.е. превышение численности клеток водорослей в опыте по сравнению с контролем. Интерпретация таких данных представляет собой

некоторые трудности, поскольку наблюдаемый эффект может быть связан как с присутствием в воде питательных веществ, так и с некоторыми особенностями действия токсиканта.

Анализ подобных результатов проводят в зависимости от методики биотестирования. Так, при краткосрочном биотестировании и определении класса опасности сточной воды или почвенных вытяжек допустимой считается стимуляция численности до 30% от контроля. В длительном хроническом эксперименте с целью определения недействующих концентраций токсикантов эффект стимуляции не учитывается только в том случае, если численность клеток водорослей в анализируемой пробе статистически недостоверно отличается от таковой в контроле. Если же на протяжении хронического эксперимента длительностью 10-30 суток наблюдается достоверная стимуляция в развитии водорослей в большинстве дат измерения, то это может служить показателем токсического действия.

Контроль усвоения материала

Задание 1. Как приготовить концентрацию $0,001 \text{ мг/дм}^3$ бихромата калия в колбе с 50 см^3 среды из исходного концентрированного раствора 100 мг/100 см^3 бихромата калия.

Задание 2. Посеять маточную культуру с исходной плотностью 3 млн. кл/ см^3 в чистую питательную среду объемом 900 см^3 , чтобы получилась численность клеток 50 тыс кл/ см^3 .

Вопросы

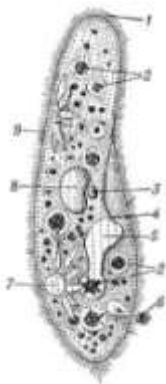
- 1. С какой частотой необходимо проводить контроль физиологической чувствительности водорослей?*
- 2. Каков порядок добавления растворов солей при приготовлении питательной среды?*
- 3. Как проводить синхронизацию культуры?*
- 4. Как поддерживать чистоту маточной культуры?*
- 5. С какой периодичностью необходимо пересевать культуру?*
- 6. С чем может быть связано обесцвечивание культуры?*
- 7. Какое минимальное число повторностей допустимо при проведении биотестирования?*
- 8. Что такое камера Горяева (камера Ножота) и какое количество камер необходимо просчитывать для каждой повторности в опыте?*

Биотестирование на гидробионтах: простейшие

Среди простейших удобными организмами для биотестирования являются инфузории, в частности вид *Paramecium caudatum*. Простейшие инфузории — одноклеточные организмы размером 120-300 мкм. Тело сигарообразной или веретенообразной формы, покрытое плотной оболочкой (пелликулой). Передний конец закруглен, задний заострен (рис. 13).

Характеристика *Paramecium caudatum*

Paramecium caudatum (Домен: Eukaryota Тип: Ciliophora Класс: Oligohymenophorea Отряд: Peniculida Семейство: Parameciidae) — массовый вид, обитающий в пресной воде с высоким содержанием органических веществ. В сточной воде является часто основным видом, поли-альфамезосапробом. Простейшие, в том числе ресничные инфузории, играют весьма значительную роль в функционировании экосистем и жизни человека. В водоемах они питаются бактериями и гниющими органическими остатками, очищая воду (санитарная роль), сами же являются пищей для многих животных.



Строение *Paramecium caudatum*:

- 1 — реснички;
- 2 — пищеварительные вакуоли;
- 3 — микронуклеус;
- 4 — ротовое отверстие;
- 5 — глотка;
- 6 — содержимое анальной вакуоли;
- 7 — резервуар сократительной вакуоли;
- 8 — макронуклеус;
- 9 — трихоцисты.

Рис. 13. Внешний вид и строение *Paramecium caudatum*

Острое токсическое действие исследуемой пробы определяют по смертности (летальности) инфузорий за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности пробы служит гибель 50% и более парameций за 24 ч при условии, что в контроле гибель особей не превышает 10%.

При определении острой токсичности устанавливают:

- среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель 50% тест-организмов за 24 ч экспозицию, - LC₅₀₋₂₄ или ЛКР₅₀₋₂₄;

- безвредную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель не более 10% тест-организмов за 24 ч (БК₁₀₋₂₄ или БКР₁₀₋₂₄).

Культивирование инфузорий

Тест-культура представляет собой суспензию одноклеточных инфузорий-туфелек *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Культуру парameций выращивают в термостате при температуре $+22\pm 2^{\circ}\text{C}$. В качестве культиваторов используют чашки Петри (диаметр 9 см). Пересевает культуру инфузорий один раз в 10 дней. Для этого в чистые чашки Петри наливают на половину чашки культивационной воды и добавляют по 1 см^3 суспензии дрожжей. Для приготовления дрожжевой суспензии 1 г свежих или 0,5 г сухих хлебопекарных дрожжей заливают 50 см^3 культивационной воды. После набухания суспензию тщательно перемешивают. Допускается хранить дрожжевую суспензию в холодильнике 1–2 суток. Перед кормлением дрожжевую суспензию тщательно перемешивают, отстаивают в течение одной минуты и надсадочную жидкость используют для кормления. Таким образом, содержимое чашек Петри становится питательной средой для выращивания парameций. В свежую питательную среду переносят часть суспензии с инфузориями (около одной трети содержимого) из старой чашки Петри и помещают в термостат.

Если культура инфузорий *P. caudatum* заражается другими простейшими или мелкими многоклеточными, то пересев клеток из старой культуры на свежую питательную среду производят следующим образом. На предметный столик бинокля помещают планшет с лунками на 1 см^3 . Устанавливают такое увеличение, чтобы вся лунка планшета была в поле зрения. Одну из лунок заполняют старой культурой. Четыре лунки (если культура заражена другими простейшими, то шесть лунок) заполняют на $1/3$ объема культивационной водой. Капиллярной пипеткой отбирают небольшое количество старой культуры и переносят в первую лунку. Пипетку тщательно промывают и, наблюдая в бинокляр, переносят клетки из первой лунки во вторую, затем из второй в третью и так далее каждый раз тщательно промывая капиллярную пипетку. Таким образом, клетки парameций отмывают от остатков старой среды и избавляют от других простейших в случае зараженной исходной культуры. Из последней лунки чистой капиллярной пипеткой инфузорий переносят в чашки Петри с подготовленной свежей питательной средой, помещая в каждую чашку Петри по одной — две особи. Чашки с посевами ставят в термостат при температуре $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Через 7-10 дней культура должна приобрести необходимую плотность (10-15 особей в $0,1\text{ см}^3$ культивационной среды).

Подготовка культивационной воды

Для получения культивационной воды водопроводную воду отстаивают в течение 3-7 суток (до полного дехлорирования) в бутылки из бесцветного стекла или непрозрачного пластика. При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества допускают использование поверхностной пресной воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм. Можно использовать питьевую очищенную артезианскую воду Аква Минерале (группы компаний «Пепси-Кола» и др.), распространяемую через торговую сеть. В культивационной воде должны отсутствовать органические загрязняющие вещества, хлор, токсические вещества и антагонистические для парameций организмы (простейшие, многоклеточные). Уровень pH воды должен быть в пределах 7,0 – 8,0; температура – $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

Необходимые материалы для постановки эксперимента

- прозрачный планшет с лунками минимального объёма 1 см^3
- бинокулярный (стерео-) микроскоп с увеличением не менее $\times 20$
- дозаторы пипеточные или пипетки $0,6 \text{ см}^3$
- пипетки капиллярные

Процедура биотестирования

Для определения токсичности проводят биотестирование исходной исследуемой воды или водной вытяжки и нескольких ее разбавлений.

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводят в трех-пяти параллельных сериях. В качестве контроля используют параллельные серии с культивационной водой.

Для биотестирования используют планшет с лунками. Расположив чашку Петри с культурой инфузорий на предметном столике стереомикроскопа, глядя в микроскоп отлавливают несколько особей капиллярной пипеткой и переносят в лунки планшет. Помещают по 10 – 12 особей в каждую лунку. В сумме выборка инфузорий для каждого варианта должна насчитывать не менее 30 особей.

При помещении тест-организмов количество культуральной жидкости в лунке не должно превышать $0,02 \text{ см}^3$. После помещения инфузорий в планшет в контрольные лунки наливают по $0,6 \text{ см}^3$ культивационной воды, в опытные – по $0,6 \text{ см}^3$ тестируемой пробы. Отмечают время начала биотестирования и подсчитывают под микроскопом количество особей в каждой лунке. В процессе экспозиции ни в контрольных, ни в опытных лунках кормление тест-организмов не осуществляется.

Планшет с заполненными лунками помещают в термостат и выдерживают в течение 24 часов при температуре $22 \pm 2^\circ \text{C}$. По истечении этого времени производят подсчет выживших и погибших особей под микроскопом. Выжившими считаются инфузории, которые свободно перемещаются в толще воды. Обездвиженных особей относят к погибшим. Результаты наблюдений заносят в рабочий журнал.

Если гибель парameций в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитывают, и его повторяют снова.

После того, как результаты эксперимента учтены, всех парameций выбрасывают, микроаквариумы промывают водой, протирают ваткой, смоченной в спирте, промывают дистиллированной водой.

Обработка результатов

При определении острой токсичности исследуемых проб, а также их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель 50% тест-организмов за 24 часовую экспозицию, — LC_{50-24} или LKP_{50-24} ;
- безвредную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель не более 10% за 24 часовую экспозицию, — BK_{10-24} или BKP_{10-24} .

Для оценки острой токсичности пробы рассчитывается процент погибших парameций ($A, \%$): $A = X_t / X_i \cdot 100\%$, где X_i — среднее арифметическое количество исходных особей; X_t — среднее арифметическое количество погибших особей в тестируемой воде через 24 часа.

Контроль погрешности методики токсикологического анализа

Контроль качества оценки токсичности водного образца проводят один раз в квартал по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту — бихромату калия ($K_2Cr_2O_7$). При проведении контрольного тестирования на основании стандарт титра методом последовательных разбавлений готовят серии растворов $K_2Cr_2O_7$ в культивационной воде с концентрациями 0,3; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 г/дм³. Диапазон концентрации эталонного токсиканта, при действии которого в течение 24 часов должны погибнуть 50 % парameций, составляет (0,55 — 0,89) г/дм³. Если концентрация $K_2Cr_2O_7$, вызвавшая острую токсичность, находится в пределах допустимого интервала, то чувствительность культуры парameций соответствует необходимым требованиям, и культуру используют в биотестировании. Если концентрация модельного токсиканта, вызвавшая острую токсичность, не находится в данном интервале, то проверяют точность приготовления исследуемых растворов, условия проведения опыта. Если ошибки при проведении испытаний исключены, то необходимо взять новую партию тест-организмов.

Вопросы для контроля усвоения материала

- 1) *Что служит основанием для выбора инфузорий в качестве тест-культуры при проведении биотестирования?*
- 2) *Какая тест-функция используется в биотестировании на парамециях?*
- 3) *Как культивируют инфузорий в лаборатории?*
- 4) *Что является критерием острой токсичности при биотестировании на инфузориях?*
- 5) *Как определить, что тест-культура инфузорий соответствует требуемым нормативам качества и может использоваться в биотестировании?*
- 6) *Какова продолжительность экспозиции пробы в биотест-системе с использованием парамеций?*

Биотестирование на бактериях по биолюминесценции

В батарею тест-организмов нередко включают бактерии, среди которых наиболее доступными и популярными в экотоксикологических исследованиях оказались светящиеся виды. Люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу. Люцифераза осуществляет превращение энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений.

Люминесцентные бактерии широко распространены в природе, например, род *Vibrio* (*V.harveyi*, *V.fisheri*), род *Photobacterium* (*P.phosphoreum*, *P.leiognathi*) и др. К настоящему времени методами генной инженерии получены штаммы бактерий, содержащие плазмиды, несущие гены люминесцентной системы. В России производятся тест-системы на основе морских и пресноводных генноинженерных светящихся бактерий.

Наиболее распространенной в РФ тест-культурой является генномодифицированный штамм *Escherichia coli* i (кишечной палочки) Домен: Bacteria, Тип: Proteobacteria, Класс: Gammaproteobacteria, Порядок: Enterobacteriales Rahn, Семейство: Enterobacteriaceae, Вид: *Escherichia coli*.

Суть экотоксикологических испытаний в бактериальном биотесте сводится к измерению снижения интенсивности свечения в пробах, в которых присутствуют токсичные вещества. Измеряемым параметром является биолюминесценция в видимой области спектра. Биолюминесцентный бактериальный тест — это комплект реагентов с биолюминесцентной активностью в комплексе с люминометрами специального назначения.

Измеряемым параметром является биолюминесценция в видимой области спектра. Это быстрый интегральный, чувствительный и объективный тест на загрязнение окружающей среды и токсичность образцов.

Отклик люминесцентных бактерий на токсические вещества полностью коррелирует с таковым у других биологических организмов и величина 50 %-ного гашения свечения ЕС₅₀ полностью коррелирует с величиной LD₅₀ для высших растений и человека (Bulich, 1979, 1980), а также с другими биосенсорами.

Лиофилизированную культуру люминесцентных бактерий *Escherichia coli* содержат в среде инертных газов в специальных стеклянных флаконах до начала экспериментов. Этот бактериальный биосенсор получил название «Эколюм» (рис. 14а). Биосенсор производится согласно ТУ 2639-236-00209792-01 (Данилов, Егоров, 1990). Люминесцентные бактерии *E. coli* длительно хранятся при температуре - 18°С (до 12 месяцев). Измерительным прибором, предназначенным для проведения токсикологического анализа с использованием бактериальной биолюминесцентной тест-системы серии «Эколюм» является специализированный люминометр «Биотокс-10» (рис. 14б).



Рис. 14. Материал и приборы для биотестирования на бактериях по интенсивности свечения: а) флакон с тест-системой «Эколюм»; б) специализированный люминометр «Биотокс-10»

Принципиальная схема функционирования биолюминесцентного бактериального теста представлена ниже:

Токсичен ли образец?	
ДА	НЕТ
Наблюдается гашение свечения	Нет гашения свечения
В измеряемом образце есть токсическое соединение или смесь соединений, в случае необходимости можно продолжать анализ другими методами для установления природы реагентов.	В измеряемом образце концентрация токсического соединения очень мала или его нет, нет необходимости в проведении дополнительных анализов.

Основными областями применения люминесцентного бактериального теста являются:

- постоянный мониторинг питьевой воды, водоемов, почв, воздуха, материалов и изделий на токсический эффект;
- экспрессный контроль отходов и сбросов промышленных предприятий;
- контроль технологических процессов в режиме реального времени;
- определение уровня токсичности новой продукции;
- медицина и фармацевтика, контроль токсических эффектов материалов и лекарственных веществ;
- пищевая индустрия, гарантия безопасности продуктов питания.

Принцип определения интегральной токсичности

Интенсивность свечения бактерий зависит от внешних факторов и не является строго постоянной величиной. Поэтому необходимо постоянное сравнение образца с контролем, нет зависимости от исходной абсолютной величины свечения биосенсора. Измерение контроля всегда предшествует измерению опыта. Оптимальная температура для работы с биосенсором находится в диапазоне от 15 до 25°C.

Устройство «Биотокс» автоматически вычисляет степень токсичности образца (T), или индекс токсичности по формуле: $T = (i_0 - i) / i_0$, где i_0 и i соответственно интенсивность свечения контрольной и опытной проб. Основными параметрами тест-системы являются величины EC_{50} — концентрация известного вещества или объем пробы, вызывающие 50% тушение свечения бактерий по сравнению с контролем; EC_{20} — концентрация известного вещества или объем пробы, вызывающие 20% тушение свечения бактерий по сравнению с контролем. В ряде случаев используются величину EC_{10} , определяющую порог чувствительности тест-системы. Специальная светорегистрирующая аппаратура позволяет измерить интенсивность свечения реагента до и после введения неизвестного токсиканта в образце небольшого объема (0,2-0,5 см³). Экспресс-анализ занимает 5 минут, мониторинг возможен в полевых условиях.

Вычисление величин EC проводят с использованием достаточно известной в токсикологии гамма-функции. Гамма-функция (Γ) представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается вышеприведенной формулой $T = (i_0 - i) / i_0$. Функция Γ очень удобна для точного определения величин EC_{20} и EC_{50} путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец сильно токсичен. График Γ в логарифмических координатах против объемов пробы V (или концентрации отдельного вещества) есть теоретически прямая линия молекулярности реакции токсического вещества с одной или несколькими мишенями, связывающими эти поллютанты в тест-объекте. При $\lg \Gamma$ равном 1 происходит 50%-ное тушение биолюминесценции и это есть величина EC_{50} . При $\lg \Gamma$ равном -0.6 происходит тушение свечения на 20% от контроля (величина EC_{20}).

Методики измерений интегральной токсичности воды, почв, воздушной среды, материалов и изделий с помощью биосенсора «Эколюм» имеют свидетельство о метрологической аттестации и зарегистрированы в Департаменте Госсанэпиднадзора РФ и Госкомэкологии (сертификат Госкомитета РФ по стандартизации и метрологии № 224.01.17.072/2005).

Согласно методикам утверждены следующие критерии токсичности:
допустимая степень токсич- | — индекс токсичности T меньше 20; объем

ности образца	пробы или концентрация вещества в пробе, меньше величины EC_{20}
образец токсичен	– индекс Т равен или больше 20 и меньше 50; объем пробы (или концентрация вещества в пробе), меньше величины EC_{50} и больше или равен EC_{20}
острая токсичность образца	– индекс токсичности Т равен или более 50; объем пробы (или концентрация вещества в пробе), равен или больше величины EC_{50}

Процедура биотестирования и обработка результатов

Перед началом биотестирования вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом и добавляют 10 см³ охлажденной дистиллированной воды с рН 6,8-7,4. Выдерживают полученную суспензию бактерий в течение 30 минут, периодически помешивая. Перед проведением анализа на токсичность проводят регидратацию лиофилизированных бактерий. Рабочую суспензию бактериальной тест-системы «Эколюм» используют в течение 8 часов после ее приготовления, хранить можно при комнатной температуре.

Для определения токсичности исследуемой пробы проводят биотестирование с использованием водной вытяжки из этой пробы в исходном, 100, 1000 и 10000 разведениях.

В контрольные кюветы добавляют по 0,9 см³ дистиллированной воды (рН 6,8-7,4). В опытные кюветы добавляют по 0,9 см³ тестируемой пробы. Из флакона с культурой отбирают по 0,1 см³ суспензии бактерий и добавляют в три кюветы от люминометра контрольные, и три кюветы для пробы.

Измерение интенсивности биолюминесценции проводят с помощью прибора «Биотокс» согласно инструкции по эксплуатации прибора в стандартном варианте через 30 минут экспозиции. В экспрессном варианте допустимо проведение анализа через 5 минут.

Обработку результатов измерений токсичности выполняют путем расчета среднеарифметического значения величины индекса токсичности «Т» по формуле:

$$T = (T_1 + T_2 + T_3) / 3,$$

где T_1 - T_3 - повторности опытной пробы.

Величины T_1 , T_2 и T_3 получают из трех параллельных измерений контрольный опыт в короткий промежуток времени или при измерении в последовательности контроль, и затем серия опытных образцов.

После того, как результаты эксперимента учтены кюветы промывают 10% азотной кислотой и водопроводной водой, а затем дистиллированной водой.

Контроль качества результатов измерений и преимущества люминесцентного бактериального теста

Контроль качества результатов измерений проводят один раз в квартал по определению чувствительности используемой тест-культуры к модельному «эталонному» токсиканту – сернокислому 7-водному ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

Если концентрация $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, вызвавшая острую токсичность, равна $7,0 \text{ мг/дм}^3$, то чувствительность тест-культуры соответствует необходимым требованиям, культуру используют в биотестировании. Если концентрация модельного токсиканта, вызвавшая острую токсичность, больше $7,0 \text{ мг/дм}^3$, то проверяют точность приготовления исследуемых растворов, условия проведения опыта. Если ошибки при проведении испытаний исключены, то необходимо взять новую партию тест-организмов.

На основании всей приведенной информации можно суммировать достоинства данного метода (таблица 4).

Таблица 4. Преимущества люминесцентного бактериального теста

Быстродействие	Время анализа - 30 минут
Точность и воспроизводимость результатов	ошибка эксперимента менее 5%
Небольшие объемы для проведения биотестирования	объем анализируемых образцов - $0,9 \text{ см}^3$
Простота и экономичность аналитической процедуры	небольшое число вспомогательных операций, автоматическое определение индекса токсичности
Стабильность биореагента	биореагент сохраняет свои свойства 1 год
Автоматизированная малогабаритная регистрирующая аппаратура	люминометр позволяет проводить биотестирование в лабораторных и полевых условиях, в режиме единичных измерений и непрерывного мониторинга с автоматической регистрации индекса токсичности

Вопросы для контроля усвоения материала

- 1) Что служит основанием для выбора бактерий в качестве тест-объекта при проведении биотестирования?
- 2) Какой тест-отклик используется в биотестировании на бактериях?
- 3) Как культивируют бактерии в лаборатории?

- 4) *Что является критерием острой токсичности при биотестировании на бактериях?*
- 5) *Какой прибор необходим при биотестировании на бактериях?*
- 6) *Как определить, что тест-культура бактерий соответствует требуемым нормативам качества и может использоваться в биотестировании?*
- 7) *Чему равно время экспозиции в биотестировании с использованием бактерий?*
- 8) *Какие преимущества бактериального теста по сравнению с другими методами биотестирования?*

Фитотестирование на проростках семян высших растений

Фитотестирование с использованием высших растений широко применяется для определения как фитостимулирующих эффектов, так и для установления токсичности природных и техногенных сред, различных материалов, химических веществ, промышленных отходов. Особенно востребованы фитотесты при исследовании почв, так как почвы являются естественной средой обитания высших растений.

Фитотоксичность регистрируют по изменениям ростовых и морфологических параметров роста и развития растений: всхожести семян, длины и биомассы всего растения или его наземной или подземной части.

Благодаря хорошей сохранности тест-культур (семян высших растений) и относительной простоте реализации фитотестирование является популярным способом

Способы фитотестирования токсичности главным образом, регламентируются такими международными стандартами:

- Определение загрязнения по задержке роста корня (ИСО 11269-1)
- Определение загрязнения по развитию и росту растений (ИСО 11269-2).

Для определения токсичности проб предпочтительны мелкие семена с небольшим запасом питательных веществ одинакового размера и массы. При выборе семян рекомендуется руководствоваться следующими принципами:

- растения должны быть чувствительны к широкому спектру поллютантов и демонстрировать надежные и воспроизводимые данные;
- применять зональный подход - использовать растения, для которых тестируемая почва является естественной средой обитания;
- одновременно использовать однодольные и двудольные растения, как минимум, по одному из каждой группы, так как они обладают различной чувствительностью к поллютантам;
- выбирать возделываемые либо дикорастущие виды в зависимости от целей исследования (Николаева, Терехова, 2017).

При выборе формы постановки фитотестирования целесообразно отдавать предпочтение субстрату в твердом виде, а не водным экстрактам, так как существует большое количество нерастворимых загрязняющих веществ (в частности, нефтепродукты). Кроме того, в зависимости от типа почв, в экстракты переходить будет разное количество поллютантов.

При выборе параметров, по которым судят о реакции растений на тестируемый объект, рекомендуется использовать не менее двух характеристик. Длина корня растения и всхожесть семян являются одними из наиболее ин-

формативных показателей. Рекомендации по выбору почвенного образца в качестве контрольного (образца сравнения) должны предусматривать сходства по ряду химических и физических свойств с испытуемыми, в частности, pH среды, гранулометрическому составу, содержанию органического вещества, а также по характеристике электропроводности раствора.

При использовании нескольких тест-растений и анализе серии параметров их реакции на тестируемый объект оценка токсичности должна осуществляться по наиболее чувствительному варианту, чтобы выявить наибольший возможный риск в экосистеме в реальных условиях.

Посуда, материалы, реактивы, аппаратура, необходимые для постановки эксперимента:

- стеклянные колбы ($V=250\text{ см}^3$)
- стеклянные стаканчики ($V=75\text{ см}^3$)
- воронки
- чашки Петри
- мерные пипетки
- семена целевого растения
- фильтровальная бумага или бумажные фильтры
- Ввда (дистиллированная)
- вода водопроводная (после 10-15 мин кипения)
- линейка измерительная (с ценой деления 1 мм)
- пластиковый или стеклянный шпатель
- мельница для размолва образцов
- весы (погрешность не более 0,1 г)
- встряхиватель
- гомогенизатор, терка или другие приспособления для размельчения сырых растительных образцов.
- центрифуга
- биотермостат
- сита почвенные
- ступки и пестики фарфоровые
- шпатели металлические
- бумажные фильтры («белая лента»)

Подготовка проб

Оптимально подвергать анализу свежесобранные образцы. Допускается их хранение при температуре от $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более двух суток. Если требуется более длительное хранение образцов, их высушивают до воздушно-сухого состояния при температуре не выше $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, растирают и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1-2 мм.

Водная вытяжка из почвенного образца готовится в соотношении почва: вода —1:4. При устойчивом появлении окраски и повышенной мутности допускается приготовление вытяжки в соотношении 1:10 (с учетом гигроскопической влажности). Суспензию встряхивают 2 часа, затем 30 мин отстаивают, затем фильтруют через фильтр «белая лента».

Фитотестирование в чашках Петри

Наиболее распространенный способ реализации фитотестирования сводится к проращиванию семян высших растений в чашках Петри.

Перед началом работ проверяют качество семян по показателю всхожести, которая должна составлять не менее 95 %.

Возможны два способа фитотестирования почвы - аппликатный и элюатный.

1. Фитотестирование почвы (твердой фазы) аппликатным способом

В чашки Петри (минимум 3 чашки Петри для контроля и 3 - для тестируемого образца) вносят предварительно увлажненную до 60% от полной влагоемкости почву слоем высотой 1 см. В качестве контроля выбирают незагрязненную почву с аналогичным гранулометрическим составом и содержанием органического вещества. Во все чашки вносят семена: в количестве от 10 до 30 в зависимости от размера с целью обеспечить равномерное взаимодействие с почвой и отсутствие конкуренции за свет и питательные вещества при развитии растений. Чашки Петри закрывают крышками и размещают в термостат или фитотрон (Капелькина и др., 2009).

В течение опыта необходимо поддерживать влажность субстрата на одном и том же уровне, осуществляя регулярное взвешивание чашек и добавление воды с целью поддержания постоянного уровня влажности почвы.

2. Фитотестирования почвы (водного экстракта) элюатным способом

Чашки Петри с вложенными в них кружочками фильтровальной бумаги стерилизуются и охлаждаются. В каждую чашку помещается по 10-30 сухих семян.

В опытные чашки вносят по 5 см³ экстракта или его разведений; в контрольные - 5 см³ дистиллированной воды. Все образцы помещаются в термостат (20-23 °C).

Анализ результатов

На 7-й день подсчитывают количество проросших семян и длину корней проростков в контрольных и опытных пробах. При анализе твердых проб корни растений отмывают от почвы водой. У двудольных растений линейкой измеряют главный корень, выделяющийся толщиной и длиной среди придаточных и боковых корней. У однодольных растений линейкой измеряют длину самого длинного корня, значение фиксируют в мм (Рис. 15).

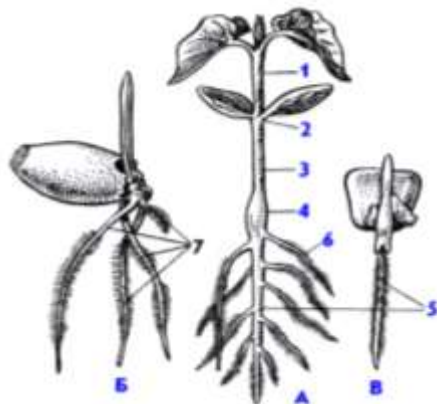


Рис. 15. Морфология проростков семян двудольных (А - фасоли) и однодольных (Б - пшеницы и В - кукурузы) растений:

1 - растущий эпикотиль (первое междоузлие главного побега), 2- узел семядолей, 3 - растущий гипокотиль, 4 - корневая шейка, 5 - главный корень, 6 - боковые корни, 7 - придаточные корни.

Результаты измерений оформляют в виде таблицы.

Рассчитывают эффект торможения для параметров «всхожесть» и «длина корня» по формуле:

$$E_m = \frac{L_k - L_{on}}{L_k} \cdot 100\%$$

где E_m — эффект торможения (%); L_{on} — средняя длина корней в опыте (мм); L_k — средняя длина корней в контроле (мм). Аналогичная формула применяется для расчета эффекта торможения при анализе всхожести семян.

Показателем токсического воздействия тестируемого объекта является снижение всхожести семян и/или уменьшение длины корней проростков по сравнению с контрольным вариантом.

При расчете класса опасности отхода выявляют кратность разведения пробы, при котором происходит подавление роста длины корней на 50% (величина ER_{50}), и далее устанавливается по табличным значениям (таблица 5).

Для нахождения величины ER_{50} готовят серию последовательных разбавлений тестируемого вещества (набор 3-5 проб с разной концентрацией тест-объекта). В варианте работы с водными экстрактами разбавления исследуемого объекта осуществляются дистиллированной водой, а при работе с твердыми субстратами - кварцевым песком или субстратом того же состава, что и контроль.

Определение ER_{50} основано на экспериментально установленной зависимости величины эффекта торможения от кратности разведения тест-объекта в соответствии с уравнением прямой общего вида: $y = mx + b$. Учитывая линейный характер данной зависимости, принимая за «х» величину эффекта торможения, а за «у» логарифм разбавления экстракта, определение ER_{50} осуществляется с использованием регрессионной модели:

$$\text{Lg}R = -kE_m + b, \text{ где}$$

E_m - эффект торможения, установленный в эксперименте;

R - кратность разбавления отхода;

k - коэффициент, соответствующий каждому значению эффекта торможения;

b - коэффициент регрессии (МР 2.1.7.2297-07).

Определив коэффициенты k и b и принимая $E_m = 50$, можно рассчитать величину R и, соответственно, ER_{50} .

Соответствие класса и категории опасности отходов устанавливается по градациям кратности разбавления, приведенным в таблице 5.

Таблица 5. Класс опасности отхода, определяемый по подавлению роста длины корней при соответствующей кратности разбавления исследуемого образца

Классы опасности	1	2	3	4
Категории опасности	Чрезвычайно опасные	Высоко опасные	Умеренно опасные	Мало опасные
Значения ER_{50} (кратность разведения пробы)	> 100	> 10-100	> 1-10	≤ 1

Фитотестирование в планшетах

Помимо широко распространенного способа фитотестирования в чашках Петри применяют фитотестирование в прозрачных пластиковых планшетах (контейнерах), предложенных бельгийскими учеными (Persoone, 2005). Этот способ имеет целый ряд заметных преимуществ, в первую очередь благодаря тому, что они экспонируются вертикально, а корни и ростки ориентируются естественным образом.

В чашках Петри для получения статистически достоверных результатов требуется анализировать по несколько сотен семян в одном опыте. Корешки проростков извлекаются по одному и проводятся измерения длины корней с

помощью линейки для каждого проросшего семени. Очевидно, что такой способ обработки данных является весьма трудоемким. На процедуру измерения всей опытной партии требуется несколько часов.

При использовании контейнеров проросшие семена развиваются в них в «двумерном пространстве», корни проростков не скручиваются и не переплетаются, что существенно упрощает измерение их длины (рис. 16 б,в)..

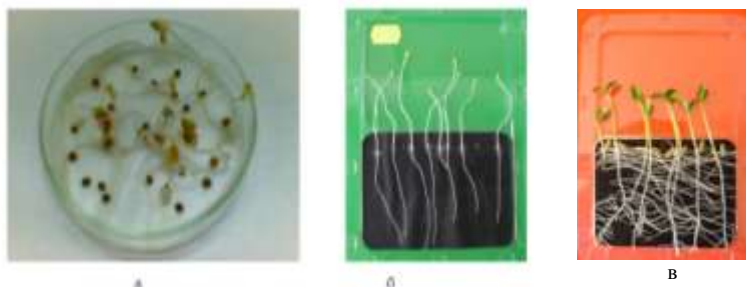


Рис. 16. Способы проращивания семян: а - в чашках Петри («трехмерный») б и в - в пластиковых планшетах («двумерный»)

В контейнерах (размером 18 x 12 см) помещаются по 8-10 семян растений в нижнюю камеру планшета. Можно исследовать как водные экстракты из твердых субстратов, раскладывая семена на смоченную водным экстрактом фильтровальную бумагу, так и непосредственно твердые субстраты, увлажненные и накрытые фильтровальной бумагой (желательно черного цвета, для лучшей контрастности с неокрашенными корешками).

По истечении срока экспозиции планшетов с пробами и семенами, измеряют длину корней и ростков. Или же с помощью фотокамеры делают фотоснимки проростков, а затем переносят на компьютер. Цифровые фотографии обрабатывают с помощью компьютерных анализаторов изображений автоматически. Это позволяет существенно упростить процедуру обработки данных до нескольких минут, что делает тест более оперативным, надежным, свободным от ошибок исследователя. Данные автоматически архивируются и сохраняются на компьютере, к ним можно обратиться снова в нужный момент.

Блок-схема дизайна эксперимента в планшетах в соответствии с методикой по определению биологической активности, в частности, гуминовых препаратов приведена на рисунке 17. (Терехова В.А., Якименко О.С., Воронина Л.П., Кыдралиева К.А. Методика измерений биологической активности гуминовых веществ методом фитотестирования "Фитоскан". 2014. *Доброе слово: Москва*, 24 с.)

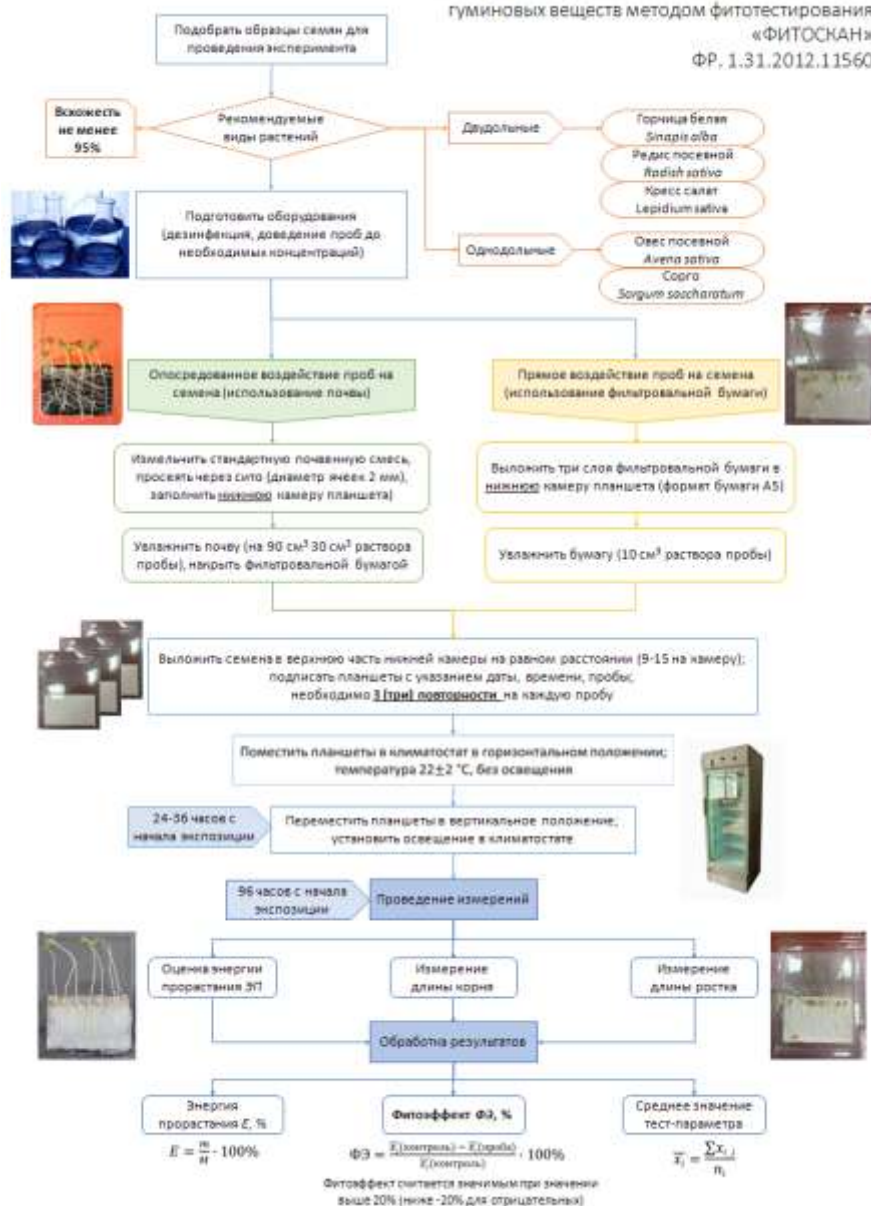


Рис. 17. Блок-схема процедуры фитотестирования в планшетах

Вопросы для контроля усвоения материала:

- 1. Какой показатель качества семян необходимо проверить перед проведением фитотестирования?*
- 2. Сколько семян растений следует размещать в одной чашке Петри?*
- 3. По каким принципам выбирают «контроль» в случае тестирования почвы в твердом виде?*
- 4. В лабораторию поступили пробы почв, отобранные вдоль транспортной магистрали. Какой способ реализации фитотестирования стоит выбрать - «твердый субстрат» или «водная вытяжка»?*
- 5. Какие растения вы предложили бы для осуществления фитотестирования черноземов степной зоны России, руководствуясь зональным подходом?*

Биотестирование на почвенных беспозвоночных: энхитреиды

Биотестирование на основе реакций почвообитающих организмов (педобионтов) - неотъемлемый элемент экологического контроля почв. Использование почвенных беспозвоночных животных в разработке системы оценок экологического риска от различных загрязнений приобретает особое значение в условиях активизации процессов деградации почв, накопления токсикантов и их смесей, появления продуктов и отходов новых технологий.

Интерес к почвообитающим беспозвоночным животным - кольчатым малощетинковым червям энхитреидам (Oligochaeta, Enchytraeidae) как тест-организмам обусловлен относительной простотой культивирования. Энхитреиды предложены в странах ЕС для определения опасности индивидуальных соединений и синтезируемых химических веществ (Phillips, 1993; Rombke, 1995; Rombke, Moser, 1999; Filimonova, Pokarzhevskii, 2001; Didden, 2003).

Токсичность загрязненных почв оценивают по выживаемости (острая токсичность) и размножению (хроническая токсичность) энхитреид в контролируемых условиях.

В РФ применяется методика с использованием двух видов энхитреид - *Enchytraeus albidus* и /или *Enchytraeus crypticus* (Методика измерений токсичности почв по реакциям энхитреид. ФР.1.39.2014.18039).

Процедура биотестирования

Тест-функциями в биотестах с использованием энхитреид, служат важнейшие интегральные характеристики выборки популяций - выживаемость и/или репродуктивность.

Выживаемость определяют путем прямого подсчета червей через 2 недели, а размножение - путем прямого подсчета количества молодых особей (через 4 или 6 недель) в контрольных и исследуемых образцах.

Измерения токсичности проб на энхитреидах, как правило, состоит из двух этапов:

- 1) в тесте на выживаемость определяют острую токсичность, при этом проводят оценку выживаемости животных после двух недель воздействия пробы (такая диапазон-диагностика проводится как предварительная обычно в случае отсутствия необходимой информации о токсикантах);

- 2) в тесте на размножение (репродуктивность) определяют хроническую токсичность, при этом проводят учет взрослых особей и потомков через 4 или 6 (в зависимости от вида энхитреид) недель воздействия пробы (это оконча-

тельное испытание образца при отсутствии полной гибели животных в течение первых двух недель экспозиции).

В тестах на основании количества энхитреид, подсчитанных в пробах исследуемого образца и в пробах контрольного образца, устанавливают: эффективную концентрацию (массовую долю), ЕСх (effect concentration) - действующее содержание исследуемого вещества или загрязненной почвы, вызывающее х-процентное снижение показателей выживаемости и/или репродуктивности энхитреид в исследуемом образце относительно контрольного образца. Тест-концентрации должны охватывать весь диапазон ЕСх (в частности, ЕС₁₀, ЕС₅₀) так, чтобы ЕСх определялось не экстраполяцией, а интерполяцией. Допускается определение максимальной недействующей концентрации (массовой доли), NOEC (noobserved effect concentration) - недействующее содержания исследуемого вещества или загрязненной почвы, то есть не вызывающее снижение показателей выживаемости и/или репродуктивности энхитреид в исследуемом образце относительно контрольного образца.

Этот метод можно также использовать для тестирования химических соединений, используя различные содержания исследуемого вещества в контрольной почве. Для измерения токсичности известных химических соединений готовят образцы почв с их различным содержанием, затем в эти образцы вносят тест-культуры энхитреид.

Для каждого содержания готовят почву с массой, соответствующей 20 г сухой массы (веса). В каждый сосуд на поверхность почвы помещают по 10 червей, осторожно перенося их с помощью, например, пинцета, крючка или петли. При помещении животных в субстрат следили чтобы со взрослыми животными не попали молодые особи, которые могут прилипнуть к поверхности тела взрослых животных.

Количество параллельных измерений для каждого исследуемого содержания зависит от схемы эксперимента, но не должно быть менее 4. Сосуды с почвой и энхитреидами накрывают пищевой пленкой и оставляют в контролируемых условиях: температура 20± 2 °С, свет от 400 до 800 люкс (рекомендуется чередовать освещенность 16 часов света и 8 часов темноты) и влажность 50-60 %.

Для того чтобы поддерживать необходимую влажность почвы, сосуды взвешивают в начале испытаний и далее один раз в неделю. Потеря веса пополняется путем добавления соответствующего количества деионизированной воды. Следует отметить, что потери воды могут быть уменьшены за счет поддержания высокой влажности воздуха (> 80 %) в тест-инкубаторе.

В тесте на выживаемость после 2-х недель экспозиции подсчитывают количество выживших особей. При условии, что не все особи погибли за первые две недели проводят тест на размножение. Для этого через 4 недели(или 6 недель) сосуды заливают 10 мл спирта и добавляют по 2-3 капли 1%-ного

спиртового раствора бенгалроз. Через сутки подсчитывают количество окрашенных молодых животных.

Чувствительность биотестов определяется пороговыми концентрациями реагирования тест-культур на действующее вещество. Она зависит от видовой принадлежности организмов.

Вопросы для контроля усвоения материала:

- 1. Какие виды энхитреид используют для биотестирования?*
- 2. Какова длительность оценки острой и хронической токсичности при биотестировании на энхитреидах?*
- 3. Какое количество особей энхитреид помещают в каждый экспериментальный сосуд при постановке эксперимента?*
- 4. Опишите меры для контроля и поддержания необходимой влажности в ходе эксперимента.*
- 5. Допускается ли определение ЕСх методом экстраполяции?*

Биотестирование на культуре клеток млекопитающих *in vitro*

В экологическом контроле находят применение методы оценки цитотоксичности по реакции культуры клеток млекопитающих. Такие методы, которые позволяют получить тот же результат, что и метод *in vivo*, но без использования животных, относят к альтернативным токсикологическим методам.

Заметным преимуществом перед методами, использующими культуры соматических клеток, отличается экспресс-оценка цитотоксичности на кратковременной суспензионной культуре подвижных клеток млекопитающих – сперме быка. Эти преимущества заключаются, в частности, в том, что идентичный результат получают в 20 раз быстрее и в 20 раз дешевле, суспензия сперматозоидов быка готова к немедленному использованию сразу после размораживания, используется простая и дешевая поддерживающая среда, нет требований к стерильности исследуемых растворов и экстрактов, цитотоксическое действие оценивается без применения красителей в реальном масштабе времени (Каюмов и др., 1988).

Замороженную сперму быка в виде гранул весом (0,1-0,15) г можно получить на станциях искусственного осеменения сельскохозяйственных животных и племенных хозяйствах. Допускается использовать сперму, забракованную по потомству. Сперма должна соответствовать ГОСТ 26030-83.

Сперму хранят в токсикологической лаборатории в сосудах Дьюара типа СДС различной емкости, заполненных жидким азотом. В жидком азоте тест-культуру можно хранить неограниченно долго.

Оценка цитотоксичности осуществляется с помощью Анализатора изображений АТ-05 (рис. 18).



Рис. 18. Анализатор изображений АТ-05 (Анализатор токсичности АТ-05)

Принцип работы анализатора основан на автоматическом компьютерном анализе микроскопических видеоизображений суспензии сперматозоидов.

Разработаны нормативные документы, регламентирующие применение этого метода оценки токсичности в сфере Ростехнадзора РФ для анализа водных вытяжек из почв, отходов производства и потребления, осадков сточных вод, а также поверхностных, грунтовых, питьевых и сточных вод в лабораторных условиях - ФР.1.31.2009.06301; ПНД Ф 14.1:2:4:15-09 (16.1:2:2.3:3.13-09).

Метод внедрен также в сферу Роспотребнадзора и санитарно-эпидемиологического контроля для оценки биобезопасности медицинских изделий; полимерных материалов и изделий; товаров бытовой химии; парфюмерно-косметической продукции; одежды, токсичности спиртов и водок; проб воды и воздуха; различных отходов и т.д. (МР 2.1.7.2279-07)

По реакции суспензионной культуры сперматозоидов быка (КСБ *in vitro*) оценивают суммарный эффект от воздействия на культуру всей совокупности токсикантов, присутствующих в исследуемом объекте.

Методика основана на регистрации изменений зависимости двигательной активности сперматозоидов от времени под воздействием химических агентов, содержащихся в экстракте из испытуемых проб. Тест-функцией, т.е. измеряемым параметром, является подвижность суспензии половых клеток m , которая пропорциональна концентрации сперматозоидов c_m и среднему модулю скорости движения клеток v : $m = c_m v$.

Подвижность суспензии сперматозоидов $m = m(t)$ для контрольного и опытного образцов регистрируется анализатором изображений, принцип работы которого основан на цифровом анализе микроскопических видеоизображений. Анализатор токсичности вычисляет индекс токсического действия I_t , как отношение средневзвешенного времени подвижности сперматозоидов в испытуемой и контрольной пробе.

Критерием отсутствия токсичности в испытуемой пробе служит величина индекса токсичности более 80 % и менее 120 %.

Процедура биотестирования

В качестве контрольной пробы готовится глюкозо-цитратный буфер (глюкоза — 0,4 г; цитрат натрия трехзамещенный — 0,1 г; вода дистиллированная — 10 см³). Этот же буферный раствор используют в качестве среды для оттаивания замороженной спермы.

Испытуемая проба готовится следующим образом: вода или водная вытяжка из пробы переводится в изотоническое состояние (относительное постоянство осмотического давления в среде и клетках), для этого на 10 см³ вытяжки добавляют 0,4 г глюкозы и 0,1 г цитрата натрия.

Контрольный и испытуемый растворы по 0,4 см³ помещают в пробирки в штатив блока пробоподготовки (БПП), поддерживающий температуру (40 ± 1,5)°С.

Подготовка тест-культуры

Сперму хранят в токсикологической лаборатории в сосудах Дьюара различной емкости, заполненных жидким азотом. В жидком азоте тест-культуру можно хранить неограниченно долго.

Перед началом эксперимента производится оттаивание тест-культуры – подготовка маточной суспензии сперматозоидов. Для этого пробирку с глюкозно-цитратным буфером устанавливают в блок пробоподготовки и прогревают не менее 5 мин; гранулу спермы помещают в пробирку, прогревают 5-7 мин перемешивая каждые 15-20 с.

Готовят растворы для заполнения капилляров: в пробирки с контрольным и испытуемым растворами вносят по 0,1 см³ маточной суспензии сперматозоидов, перед каждым отбором суспензии маточную культуру аккуратно перемешивают кончиком пипетки или встряхивая пробирку для равномерного распределения клеток в растворе.

В БПП перед каждой пробиркой с рабочим раствором устанавливают чистую сухую пробирку с 5 капиллярами, протертыми сухой марлей. В каждую пробирку с капиллярами по стенке дозатором приливают, предварительно перемешав, по 0,2 см³ соответствующего рабочего раствора.

Мокрые поверхности каждого капилляра вытирают сухой марлей и устанавливают в каретку прибора. Первые 5 позиций каретки предназначены для капилляров с контролем, остальные 20 – для испытуемых проб (по 5 капилляров на каждый из 4-х исследуемых образцов). Заполненная каретка накрывается крышкой и помещается в анализатор изображений. Необходимо убедиться, что все капилляры лежат в одной плоскости, без перекосов.

Выполнение измерений

«Руководство пользователя анализатора изображений» подробно описывает работу на приборе:

- включить прибор и запустить программу «Токсичность»;
- установить параметры испытания в диалоговом окне (количество капилляров в опытном образце (4 или 5), количество опытных образцов (от 1 до 5) и время экспозиции в секундах (20 с);
- в соответствующих полях ввести название исследуемых проб, объем оттаивания и кличку быка;
- включить накопление экспериментальных данных.

Для каждого капилляра с рабочими растворами автоматически измеряется подвижность суспензии сперматозоидов. Величины подвижности отображаются в таблице на мониторе.

Когда для всех капилляров показатель подвижности суспензии сперматозоидов снизится на 95% (и более) от начального значения, эксперимент считается законченным и процесс накопления данных прекращают.

При соблюдении требований к подготовке и проведению испытаний продолжительность эксперимента составляет 2,5 – 3 часа.

Альтернативные методы позволяют проводить токсикологические исследования, не прибегая к использованию животных. А результаты получаются очень близкими к значениям, полученным методами с использованием животных. Разработка и внедрение таких альтернативных методов очень приветствуется обществом и стимулируется законодательно путем запрета на неограниченное распространение токсикологических испытаний на животных.

Вопросы для контроля усвоения материала:

- 1. Должна ли культура клеток млекопитающих соответствовать каким-либо стандартам качества?*
- 2. Назовите условия хранения культуры клеток млекопитающих?*
- 3. Назовите критерии токсичности при биотестировании на культуре клеток млекопитающих.*
- 4. Что является контролем в экспериментах при биотестировании на культуре клеток млекопитающих?*
- 5. Какие процедуры необходимо произвести для перевода пробы в изотоническое состояние?*

Рекомендуемая литература

Биологический контроль окружающей среды: Биоиндикация и биотестирование/ Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И. / Издательство Академия, 2007. - 288 с.

Практическая экотоксикология: оценка чувствительности биотест-культур: Учебное пособие/ Под ред. В.А. Тереховой /Федосеева Е.В., Сапункова Н.Ю., Терехова В.А. 2016. *ГЕОС Москва*, ISBN 978-5-89118-723-8, 54 с.

Биотестирование качества среды с использованием гидробионтов. Раздел большого практикума по гидробиологии: Учебно-методическое пособие/ О. Ф. Филенко, Е.Ф. Исакова, Д. М. Гершкович и др. — Москва: Москва, 2015. — С. 44.

Оценка токсичности почв по реакциям беспозвоночных животных - энхитреид (*Olygochaeta*, *Enchytraeidae*)/ Горшкова И.А., Гонгальский К.Б., Филимонова Ж.В., Терехова В.А.. 2014. *Изд-во "Доброе слово" Москва*, ISBN 978-5-905723-09-4, 38 с.

Методика выполнения измерений всхожести семян и длины корней проростков высших растений для определения токсичности техногенно загрязненных почв /Капелькина Л.П., Бардина Т.В., Бакина Л.Г. и др., М-П-2006. ФР.1.39.2006.02264: СПб., 2009. 19 с.

Токсикологическая оценка индивидуальных химических соединений и смесей сложного состава с использованием подвижного клеточного тест-объекта/ Каюмов Р.И., Еськов А.П., Арефьев И.М., Бюл. экспер. биол и мед.- 1988.- № 1- С. 48-50

Методические рекомендации по установлению предельно - допустимых концентраций загрязняющих веществ для воды рыбохозяйственных водоемов.- ВНИРО.М., 1986.

Методическое руководство по биотестированию воды. РД 118-02-90.- М.- 1991. -48 с.

Совершенствование лабораторного фитотестирования для экотоксикологической оценки почв / Николаева О.В., Терехова В.А. *Почвоведение*, 2017, № 9, с. 1141-1152

Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности. Методические рекомендации - Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, МР 2.1.7.2297-07., 2007. 15 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Перечень наиболее распространенных стандартных методик биотестирования, включенных в реестр МВИ Федерального фонда по обеспечению единства измерений в РФ.

- ФР.1.39.2006.02506. ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06). Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg.
- ФР.1.31.2012.11560 Методика измерений биологической активности гуминовых веществ методом фитотестирования .
- ФР 1.39.2006.02505. ПНД Ф Т 14.1:2.14-06 (ПНД Ф Т 16.1:3.11-06) Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L.
- ФР.1.39.2007.04104. ПНД Ф Т 16.3.12-07. Методика определения токсичности золошлаковых отходов методом биотестирования на основе выживаемости парameций и цериодафний
- ФР.1.31.2009.06301; ПНД Ф 14.1:2:4.15-09 (16.1:2:2.3:3.13-09) Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов вод и отходов по изменению подвижности половых клеток млекопитающих *in vitro* .
- ФР.1.37.2010.08619 (ПНД Ф Т 16.1.17-10) Методика выполнения измерений интенсивности потребления тест-субстратов микробными сообществами почв и почвоподобных объектов фотометрическим методом
- ФР.1.39.2014.18039 Методика измерений токсичности почв по реакциям энхитреид.
- ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний
- ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний
- ФР.1.39.2007.03223. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности

клеток водорослей

- ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.7-04). Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer).
- ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.9-06). Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus.
- ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04). Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» на приборе «Биотокс-10»
- ПНД Ф Т 16.2:2.2-98. Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий



Лаборатория экотоксикологического анализа почв

119992, Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова,

web: <http://letap-msu.ru/>

e-mail: letap.msu@gmail.com

тел./факс: (495) 930-03-95