

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное агентство по образованию
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова
Кафедра физиологии человека и животных

Биотестирование

Биологические методы определения
токсичности водной среды

Методические указания

Рекомендовано
Научно-методическим советом университета
для студентов специальности Экология
и направления Экология и природопользование

Ярославль 2006

УДК 615.9 : 574

ББК Е 081я73

Б 63

Рекомендовано

*Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2006 года*

Рецензент

кафедра физиологии человека и животных
Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова

Составители : канд. биол. наук, доцент Е.В. Рябухина,
ст. науч. сотр. С.Л. Зарубин

Биотестирование. Биологические методы определения токсичности водной среды : метод. указания / Сост. Е.В. Рябухина, С.Л. Зарубин ; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль : ЯрГУ, 2006. – 64 с.

Предназначено для студентов факультета биологии и экологии, обучающихся по специальности 013100 Экология, направлению 511100 Экология и природопользование (дисциплина «Биотестирование», блок СД), очной формы обучения.

Ил. 5. Табл. 16.

УДК 615.9 : 574

ББК Е 081я73

© Ярославский государственный университет, 2006

© Е.В. Рябухина, С.Л. Зарубин, 2006

Тема 1. Токсикологический контроль качества водной среды методами биотестирования

1.1. Метод определения токсичности водной среды по смертности и изменению плодовитости цериодафний

1.2. Назначение и область применения методики

Биотестирование проводят для определения острой и хронической токсичности питьевых, грунтовых, поверхностных, сточных вод, воды в контрольном и других створах водопользования с целью проверки соответствия качества воды нормативным требованиям (сточная вода на сбросе не должна оказывать острого токсического действия, а вода в контрольном и других створах водопользования – хронического токсического действия на тест-объекты («Правила охраны поверхностных вод», 1991 г., п. 5.7), а также водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов в лабораторных условиях с использованием в качестве тест-объекта низших ракообразных – цериодафний.

Результаты биотестирования учитывают при установлении величин предельно допустимых сбросов (ПДС) загрязняющих веществ в водные объекты.

1.3. Принцип методики

Методика основана на определении смертности и изменений в плодовитости цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*, *Cladocera*, *Crustacea*) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль).

Острые опыты проводятся в краткосрочном эксперименте для предварительной оценки степени токсичности и выявления остротоксичной концентрации вещества или кратности разбавления сточных вод для снижения их токсичности.

Острое токсическое действие исследуемой воды (среды) на цериодафний определяется по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. **Критерием острой токсичности** служит гибель 50% и более цериодафний за 48 часов в исследуемой воде при условии, что в контроле гибель не превышает 10%.

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают:

- **среднюю летальную концентрацию** отдельных веществ (**кратность разбавления** вод), вызывающую гибель 50% и более тест-организмов (**ЛК₅₀₋₄₈**, **ЛКР₅₀₋₄₈**);

- **безвредную** (не вызывающую эффекта острой токсичности) концентрацию отдельных веществ (**кратность разбавления** вод), вызывающую гибель не более 10% тест-организмов (**БК₁₀₋₄₈**, **БКР₁₀₋₄₈**).

Подострые опыты применяются для выявления путей действия токсиканта на гидробионтов и механизмов отравления организма, с тем чтобы выбрать адекватный метод определения пороговой концентрации исследуемого вещества в хроническом опыте. В подостром эксперименте учитывается ряд показателей, позволяющих оценить состояние различных систем организма гидробионта (размножение и плодовитость, питание, число сердцебиений, рост и линька особей). Продолжительность опытов – от 7 до 30 суток.

Хронические опыты – это заключительный этап токсикологического исследования. Его задача – выявление пороговых концентраций веществ, зоны их токсического действия и максимальных недействующих (безвредных) концентраций, необходимых для установления ПДК токсических веществ, а также выявление минимальной кратности разбавления исследуемых вод, при которой хроническое токсическое действие не проявляется.

Хроническое токсическое действие исследуемой воды на цериодафний определяется по смертности и изменению их плодовитости за период 7 и более суток (до появления третьего помета мо-

лоди в контроле) в исследуемой воде по сравнению с контролем. Продолжительность эксперимента зависит от задач исследования и может составлять от 7 суток до 3-х месяцев и более.

Показателем плодовитости является среднее количество молодежи, выметанной в течение биотестирования, в пересчете на одну выжившую исходную самку. **Критерием хронической токсичности** служит гибель 20% и более тест-организмов и (или) достоверное отклонение в плодовитости из числа выживших самок по сравнению с контролем.

Метод оценки пороговой и предельно допустимой концентраций определяется данными подострого опыта, при этом используют физиолого-биохимические показатели, характеризующие функциональное состояние избирательно поражаемых систем и органов.

1.4. Характеристика тест-объекта

1. Систематическое положение, местообитание. В качестве тест-объекта используется вид *Ceriodaphnia affinis*. Относится к низшим ракообразным, отряду ветвистоусых (*Cladocera*), семейству дафнид (*Daphniidae*), роду цериодафний (*Ceriodaphnia*).

Этот вид распространен по всему земному шару. Цериодафния обитает в водоемах всех типов в Европе, Северной Африке, Азии, Южной Америке. Населяет неглубокие, преимущественно небольшие озера, пруды, садки, реки и разнообразные маленькие водоемы, а также каменистые лужи побережий полярных морей. В маленьких водоемах этот вид встречается реже, чем другие цериодафнии. В больших, глубоких водохранилищах и озерах встречаются единично. В Европе встречаются только в литоральном планктоне, на открытых местах, между зарослей тростника и между растениями над заиленным дном.

2. Морфология. Тело цериодафний овальное, заключено в хитиновую прозрачную раковинку, створки раковины на брюшной стороне не соединены, образуют щель. Тело нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной (абдоминальный) отделы. Впереди, под головным отделом, находятся две маленькие антеннулы, вооруженные осязательными щетинками. По бокам головы расположены две задние сильно развитые антенны, служащие для скачкообразного передвижения в толще воды. В грудном отделе

расположено пять пар грудных ножек, которые покрыты многочисленными щетинками, участвующими в процессе фильтрации воды, питания и дыхания. Сердце находится на спинной стороне грудного отдела. Брюшной (абдоминальный) отдел туловища самки имеет хорошо развитые абдоминальные выросты, один из них — сильно выступающий конусовидный, является видоспецифическим признаком *Ceriodaphnia affinis* (рис. 1). Постабдомен с коготками, на вогнутой стороне каудального коготка находятся мелкие щетинки (рис. 2).

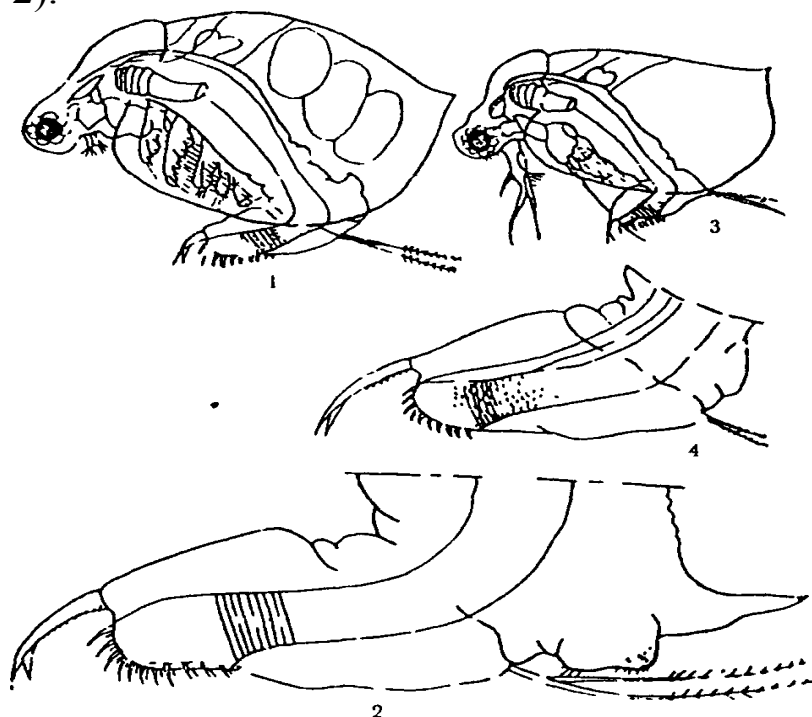


Рис. 1. Строение *Ceriodaphnia affinis*: 1 — самка, 2 — постабдомен самки, 3 — самец, 4 — постабдомен самца

3. Размножение. Половая система представлена парными гонадами: яичниками у самок и семенниками у самцов, которые расположены по обеим сторонам кишечника. Самки несут до шести яиц в выводковой камере. В природе вид *Ceriodaphnia affinis* моноили дицикличен с максимумом полового периода осенью (август — сентябрь). Эфиппиум с одним покоящимся яйцом. В лабораторных условиях самцы появляются при сокращении освещенности, снижении температуры воды, недостатке кислорода, голодании, а также при воздействии других неблагоприятных факторов. Чтобы обеспечить опыты достаточным числом рачков, необходимо создавать условия для поддержания культуры в состоянии партеногене-

тического размножения. Появление самцов особенно искажает результаты хронических опытов.

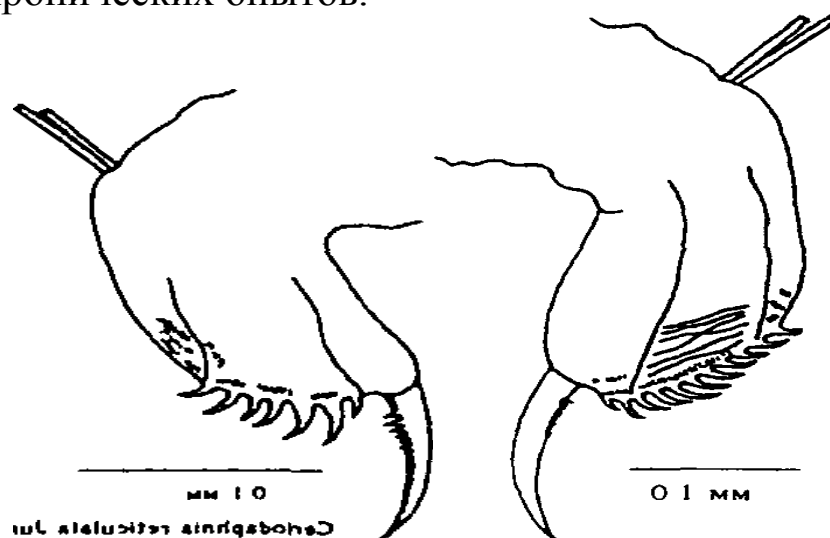


Рис. 2. Строение каудального коготка у других видов цериодафний

1.5. Условия проведения биотестирования

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов, а также следов обработки помещений инсектицидами, пестицидами и пр. Температура окружающего воздуха в лаборатории от +19 до +24°C, в люминостате для биотестирования – от +22 до +24°C. Атмосферное давление 84 – 106 кПа (630 – 800 мм рт. ст.).

Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничено особыми требованиями. Освещение в люминостате – лампами дневного света. Освещенность для цериодафний 500 – 1000 лк, для водорослей 3000 – 4000 лк.

1.6. Подготовка к проведению биотестирования

Для проведения биотестирования необходимо предварительно подготовить посуду, пробоотборники, места хранения отобранных проб, а также рабочие места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность. **Все процедуры предварительной подготовки должны исключать попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ из окружающих предметов или среды в исследуемую воду.**

1.6.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Для отбора проб воды обычно используется посуда из пластика, а при наличии в воде нефтепродуктов, моющих средств и пестицидов — банки из темного стекла.

Нельзя использовать посуду с хромовым покрытием. Посуда из пластика и стекла для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Она промывается 10 %-ным раствором азотной кислоты. Стенки посуды осторожно смачиваются этим раствором, после чего на 2 – 3 часа посуда оставляется, затем она тщательно промывается водопроводной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды и промывается 3-4 раза дистиллированной водой. При сильном загрязнении посуды, а также новую посуду промывают водой, заполняют 10 % раствором азотной кислоты и выдерживают не менее суток, затем тщательно промывают водопроводной и не менее 3-4 раз дистиллированной водой. *Для мытья посуды не разрешается пользоваться хромовой смесью, синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями.* Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, – в сушильном шкафу при 160° С в течение 1 часа.

1.6.2. Подготовка культивационной воды

Культивационная вода используется: для культивирования це-риодафний, в качестве контрольной при биотестировании, для разбавления исследуемых вод.

Для подготовки культивационной воды питьевую воду отстаивают и аэрируют в течение 3 – 7 суток (до полного дехлорирования) в емкостях из бесцветного стекла в присутствии высшей водной растительности (2 – 3 г по воздушно-сухой массе любой аквариумной высшей водной растительности на 1 дм³ питьевой воды).

При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества *допускается* использование поверхностной пресной или грунтовой воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через мембранный фильтр с размером пор 3,5 мкм для удаления одноклеточных и многоклеточных животных и растительных организмов. Мембранные фильтры перед употреб-

лением тщательно промывают и кипятят в дистиллированной воде не менее 10 минут.

Культивационная вода должна удовлетворять следующим требованиям:

- отсутствие органических загрязняющих веществ, хлора, токсических веществ, антагонистических для цериодафний организмов (сине-зеленых водорослей) и пищевых конкурентов (простейших, многоклеточных);

- рН – 7,0 – 8,2;

- жесткость общая – от 80 до 250 мг/дм³ (выраженная в CaCO₃);

- отсутствие углекислого газа, метана и др. газов (при наличии газов для их удаления культивационную воду кипятят 30 минут, затем охлаждают и аэрируют);

- концентрация растворенного кислорода – не менее 6 мг/дм³ (если концентрация растворенного кислорода в контрольной и разбавляющей воде ниже 6 мг/дм³, последняя аэрируется при помощи аквариумного компрессора до начала биотестирования);

- температура +19 ... +24 °С.

При исследовании вод с повышенным солесодержанием (содержание сухого остатка выше 1 г/дм³) необходимо провести предварительную постепенную адаптацию культуры тест-объектов, добавляя небольшими порциями хлористый натрий в культивационную воду (содержание солей по сухому остатку не должно превышать 6 г/дм³). При невозможности успешно адаптировать имеющуюся культуру, а также при содержании сухого остатка в исследуемой воде более 6 г/дм³ необходимо использовать тест-объекты, применяемые в биотестировании морских вод (*Artemia salina*, *Acartia clausi*, морские водоросли и простейшие).

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

1.6.3. Получение исходного материала, транспортировка, содержание и кормление цериодафний, выращивание культуры

Исходный материал для культивирования (водоросли, цериодафнии) можно получить в лабораториях, занимающихся биотес-

тированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности, чувствительность которой к модельному токсиканту укладывается в установленный диапазон (см. п. 1.9).

1. Транспортировка цериодафний

Цериодафнии транспортируют в стеклянной емкости с крышкой (в термосе, если температура окружающей среды выходит за пределы от +19 до +24 °C). Емкость заполняется местной культивационной водой на 2/3 объема, и в нее сачком переносятся цериодафнии. Плотность посадки – приблизительно 40 особей на 1 дм³ воды; для кормления добавляется 3 см³ водорослевой суспензии на 1 дм³ воды (см. п. 1.6.4.1). В лаборатории воду с тест-организмами по стенке сосуда переливают в емкость для культивирования, объем которой должен в 2-3 раза превышать количество воды с рачками. Культиватор с цериодафниями помещают в люминостат (климатостат, бокс) и в течение 1 – 2 дней небольшими порциями приливают приготовленную культивационную воду для адаптации рачков к новой воде.

В лаборатории содержат два вида культуры цериодафний: *маточную* (массовую), используемую как источник для возобновления в периоды потери культуры синхронизированной, и *синхронизированную*, используемую непосредственно для биотестирования.

2. Выращивание и содержание маточной культуры цериодафний

Культуру цериодафний выращивают в климатостате (люминостате), обеспечивающем поддержание искусственного освещения лампами дневного света с интенсивностью света 500 – 1 000 лк, 16-часовой световой и 8-часовой ночной (без освещения) период; температуры – от +19 до +24 °C.

В качестве культиваторов используют чашки кристаллизационные толстостенные или батарейные стаканы объемом 2 – 5 дм³, которые наполняют на 3/4 объема культивационной водой, сажают туда самок цериодафний среднего размера с выводковыми камерами, заполненными эмбрионами, и неплотно прикрывают (от попадания пыли и для уменьшения испарения) пластинами из стекла или оргстекла толщиной не менее 6 мм. Содержание растворенного кислорода в кристаллизаторах должно быть не менее 6 мг/дм³, что достигается правильным приготовлением культивационной воды (см. п. 1.6.2) и регулярной пересадкой цериодафний в свежую

культивационную воду. ***Аэрирование воды в кристаллизаторах с цериодафниями не допускается.*** Маточная культура поддерживается в одном или двух сосудах. Ежедневно утром с поверхности воды в сосудах, в которых культивируются рачки, стерильной марлевой салфеткой снимается дрожжевая и бактериальная пленка. После этого вода вместе с рачками осторожно переливается в чистый культиватор так, чтобы накопившийся осадок остался на дне. В чистый культиватор добавляется свежая порция культивационной воды. Таким образом, ежедневно проводится очистка поверхности воды и дна сосуда, в котором культивируются рачки. Кормление цериодафний осуществляют в соответствии с требованиями п. 1.6.4.3.

Один или два раза в неделю осуществляется пересадка культуры в свежую культивационную воду. Частота пересадки определяется содержанием растворенного кислорода в культиваторах. Плотность маточной культуры 40 – 50 особей на 1 дм³ культивационной воды.

В удовлетворительных культивационных условиях продуктивность маточной культуры – 500 – 700 особей каждую неделю.

Не допускается использование молоди маточной культуры для биотестирования!

3. Выращивание синхронизированной культуры

Биотестирование воды и водных вытяжек проводят только на синхронизированной культуре цериодафний. Синхронизированной является одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении. Такая культура генетически однородна. Рачки, ее составляющие, обладают близкими уровнями устойчивости к токсическим веществам, одновременно созревают и в одно время дают генетически однородное потомство. Для получения синхронизированной культуры отбирают одну самку средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, и помещают в химический стакан объемом 30 см³, заполненный на 15 см³ культивационной водой. Появившаяся молодь переносится по одной в 10 – 60 (в зависимости от планируемого количества опытов) таких же стаканов, заполненных на 15 см³ культивационной водой. Третье поколение рачков можно использовать как синхронизированную культуру. Синхронизиро-

ванную культуру выдерживают в условиях по п. 1.6.3. Кормление по п. 1.6.4.3.

Пересадка плодоносящих самок в свежую культивационную воду осуществляется три раза в неделю. Родившуюся молодь ежедневно отсаживают и используют для биотестирования. Для получения синхронизированной культуры используют самок цериодафний до 14-суточного возраста.

Взрослые самки при удовлетворительных условиях культивирования продуцируют 2 – 8 молодых особей на 3-4-й день развития. За три генерации (обычно за 7 суток) взрослая самка дает, по меньшей мере, 15 особей.

1.6.4. Подготовка корма и кормление

Цериодафниям необходимо обеспечить комбинированное дрожже-водорослевое питание. Для выращивания водорослей в качестве водорослевого корма используются зеленые водоросли родов *Chlorella* (*Chlorella vulgaris* Beijer.) и *Selenastrum*. Также можно использовать для кормления культуру сценедесмус (*Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb).

Водоросли для кормления цериодафний выращивают в стеклянных кюветах или плоскодонных колбах объемом 250 см³ при 12 – 16-часовом освещении лампами дневного света (освещенность 3 000 – 4 000 лк), температуре от +22 до +25°C, на одной из питательных сред (см. табл. 1). Питательные растворы готовят на дистиллированной воде, полученной из стеклянного перегонного аппарата (допускается приготовление питательной среды для водорослей на бидистиллированной воде, при этом не использовать аппараты с ионообменными смолами).

Чтобы избежать образования осадка в питательной среде, каждый ее компонент предварительно готовится отдельно в 100 см³ дистиллированной воды. Полученные растворы солей кипятят каждый по 10 – 15 минут, охлаждают, после чего их можно использовать для приготовления среды в течение месяца при условии хранения при температуре от +2 до +4 °C. Каждый сосуд с питательными веществами должен быть подписан с указанием состава, концентрации, времени приготовления и плотно закрыт притертой пробкой во избежание высыхания и концентрирования.

Для приготовления среды для культивирования водорослей добавляют по 1 см³ каждого концентрированного раствора (кроме солей железа) в колбу на 1 дм³, заполненную до половины дистиллированной водой, поочередно, в последовательности, как указано в таблице 1, доводят до метки 1 дм³ дистиллированной водой, тщательно перемешивают, кипятят раствор 30 минут, охлаждают и после этого добавляют 1 см³ концентрированного раствора соли железа, и если это необходимо, отдельно приготовленные растворы микроэлементов.

Таблица 1

Состав питательных сред для культивирования водорослей

<i>Компоненты среды</i>	<i>Концентрация в среде для культивирования, г/дм³</i>		
	<i>Тамия</i>	<i>Успенского №1</i>	<i>Прата</i>
KNO ₃	5,00	0,025	0,10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,50	0,025	0,01
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	0,144	-
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	-		0,01
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	1.25	0,025	
K ₂ CO ₃	-	0,0345	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,003	-	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-	0,001
Микроэлементы	По 1 см ³ /дм ³ растворов А и В*		-

* Растворы А и В готовят отдельно, раствор А (Н₃ВО₃, – 2.86 г/дм³; MnCl₂·4H₂O – 1,81 г/дм³; ZnSO₄·7H₂O – 0,222 г/дм³) и раствор В (МоО₃ – 17,64 мг/дм³; NH₄VO₃ – 22,96 мг/дм³). Затем отдельно стерилизуют каждый раствор 30 минут кипячением, охлаждают, плотно закрывают притертой пробкой и хранят в холодильнике при температуре от +2 до +4° С до трех месяцев.

Растворы солей железа и микроэлементов можно добавлять во все среды независимо от того, указано это в прописи их состава или нет.

Для предупреждения выпадания в осадок железа и других микроэлементов дополнительно во все среды можно добавлять хелатирующее вещество, образующее с ионами металлов устойчивые

комплексные соединения в форме, доступной для питания водорослей. С этой целью используется стерильный раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевой соли (трилон В) в концентрации 0,037 г/дм³. Раствор готовится в 100 см³ дистиллированной воды совместно с солью железа. Соли железа и трилона Б отдельно растворяют в 30 см³ дистиллированной воды, смешивают, доводят дистиллированной водой до 100 см³, кипятят, охлаждают и добавляют в охлажденную среду для культивирования водорослей 1 см³ на 1 дм³ среды.

Например, для приготовления среды Успенского растворяют 2,5 г KNO₃; 2,5 г MgSO₄·7H₂O; 14,4 г Ca(NO₃)₂·4H₂O; 2,5 г KH₂PO₄·3H₂O и 3,45 г K₂CO₃ в 100 см³ дистиллированной воды, в отдельных склянках каждой соли. Отдельно растворяют 3,7 г трилона Б и 0,3 г Fe₂(SO₄)₃ в 100 см³ дистиллированной воды.

Все шесть склянок кипятят 10 – 15 минут, охлаждают и, соблюдая условия стерильности (над пламенем горелки или спиртовки), переносят в колбу на 1 дм³ по 1 см³ из каждой склянки (кроме раствора железа и трилона Б) в 0,5 дм³ дистиллированной воды, смешивают, доводят до метки 1 дм³ дистиллированной водой. Полученную смесь кипятят, охлаждают и добавляют после охлаждения 1 см³ смеси солей железа и трилона Б и по 1 см³ каждого раствора микроэлементов (А и В) на 1 дм³ среды. *Готовые среды не хранят.*

Приготовленную питательную среду разливают в колбы по 100 см³ и, соблюдая условия стерильности, добавляют 1 – 5 см³ концентрированной суспензии водорослей (см. п. 1.6.4.1). Закрывают колбы стерильными колпачками из алюминиевой фольги или ватными пробками и ставят в люминостат. В люминостате соблюдают 12 – 16-часовой световой и 8 – 12-часовой ночной период.

Во время выращивания водорослей в люминостате необходимо 2-3 раза в день встряхивать питательный раствор с водорослями, чтобы обеспечить удаление образующегося углекислого газа, при накоплении которого среда в исследуемых растворах подщелачивается. С этой же целью при интенсивном культивировании водорослей на концентрированной среде Тамия необходимо обеспечить постоянное перемешивание водорослевой культуры на лабораторной мешалке или аэрирование.

1. Получение водорослевой суспензии

После того как окраска питательной среды становится интенсивно зеленой (требуемая плотность клеток водорослей – $1,5 \cdot 10^6$ кл/см³), водоросли отделяют от культивационной среды центрифугированием или отстаиванием в холодильнике (от +2 до +4 °С) в течение 7 суток с последующим отделением супернатанта. При использовании среды Тамия суспензия дважды промывается дистиллированной водой с последующим центрифугированием или отстаиванием. Плотность водорослей в концентрированной суспензии должна составлять $(3,0 - 3,5) \cdot 10^7$ кл/см³. Суспензию водорослей хранят в холодильнике (от +2 до +4 °С), не допуская замораживания. Для использования в качестве корма суспензия хранится до 14 суток, а в качестве посевного материала для выращивания водорослей – до 6-ти месяцев.

Плотность клеток микроводорослей подсчитывают в камере для счета форменных элементов крови по Горяеву.

Счетная камера с сеткой Горяева представляет собой толстое предметное стекло, в центре которого находятся три поперечные стеклянные пластинки. Средняя пластинка разделена поперечным желобком на две части. На обеих частях средней пластинки выгравированы сетки. Средняя пластинка на 0,1 мм ниже боковых, поэтому, когда к боковым пластинкам притирают покровное стекло, образуется воздушная камера с высотой 0,1 мм. Сетка Горяева состоит из 225 больших квадратов, часть из которых подразделена на маленькие квадратики. Сторона маленького квадрата равна 1/20 мм, площадь равна 1/400 мм².

Камеру накрывают покровным стеклом и притирают его до образования радужных колец интерференции, что является признаком достаточно плотно притертого стекла. Пипеткой отбирают произвольное количество тщательно перемешанной культуры водорослей и наносят ее капли под нижний и на верхний край покровного стекла, заполняя камеру так, чтобы в нее не попадали пузырьки воздуха. Избыток водорослевой культуры вытесняется по канавкам камеры. Просматривают все квадраты по диагонали (5 больших квадратов) или камера целиком (если численность водорослей незначительная). Подсчет производят под микроскопом МБИ или МБР при увеличении в 100 или 200 раз.

В каждой пробе подсчитываются клетки водорослей, как минимум, в трех камерах с последующим вычислением среднего арифметического. Пересчет численности клеток водорослей проводится по формуле:

$$N = \frac{1000n}{Sh}, \quad (1)$$

где N – численность водорослей, кл/см³; n – численность водорослей, найденных в секторе (квадрате) сетки камеры, кл; S – площадь сектора сетки, мм²; h – глубина счетной камеры, мм; 1000 – коэффициент пересчета кубических миллиметров в кубические сантиметры.

2. Приготовление дрожжевой суспензии

Для приготовления дрожжевой суспензии 1 г свежих или 0,5 г сухих хлебопекарных дрожжей заливают 100 см³ дистиллированной воды. После набухания суспензию тщательно перемешивают. Для кормления используют слабомутный (верхний слой после отстаивания) раствор дрожжевой суспензии. Допускается хранить дрожжевую суспензию в холодильнике не более суток. Перед кормлением дрожжевую суспензию тщательно перемешивают.

3. Кормление маточной и синхронизированной культуры цериодафний

Оптимальное количество корма и соблюдение режима кормления – одно из основных условий получения удовлетворительных результатов биотестирования, так как избыточное кормление может привести к снижению чувствительности тест-организмов, засорению фильтрующего аппарата рачков и сокращению содержания растворенного кислорода в культивируемой среде. Недостаточное питание приводит к неадекватному реагированию цериодафний на воздействие токсических веществ.

Кормят маточную культуру цериодафний ежедневно, один раз в сутки, добавляя 7 см³ дрожжевой суспензии и 7 см³ концентрированной водорослевой суспензии на 1 дм³ культивационной воды.

Синхронизированную культуру цериодафний кормят также ежедневно, один раз в сутки, добавляя 0,2 см³ концентрированной или в 2 раза разбавленной дистиллированной водой водорослевой суспензии на 15 см³ культивационной воды. Допускается кормить

синхронизированную культуру цериодафний комплексно, добавляя дрожжевую суспензию через день – $0,06\text{ см}^3$ (две капли) на 15 см^3 культивационной воды. Достаточность питания тест-организмов подтверждается удовлетворительными результатами контроля.

4. Кормление цериодафний в эксперименте

Кормят цериодафний в остром опыте ежедневно, один раз в сутки, добавляя $0,2\text{ см}^3$ концентрированной или в 2 раза разбавленной дистиллированной водой водорослевой суспензии на 15 см^3 культивационной воды. Достаточность питания тест-организмов подтверждается удовлетворительными результатами контроля.

Если в опыте наблюдается эффект перекорма (гибель рачков в контроле), то цериодафний кормят в опыте водорослевой культурой меньшей плотности, $5 - 6$ млн. кл/см³ – слабо-зеленое окрашивание. По $0,03\text{ см}^3$ (одна капля) на 15 см^3 культивационной воды. Оптимальная плотность водорослей может быть подобрана экспериментально.

Цериодафний в хроническом опыте допускается кормить комплексно: водорослями и суспензией дрожжей. Суспензия дрожжей в объеме $0,06\text{ см}^3$ на 15 см^3 культивационной воды добавляется через день. Перед кормлением температуру водорослевой и дрожжевой суспензии доводят до комнатной. Плотность водорослей в культивационных и экспериментальных сосудах сразу после кормления должна составлять $(2 - 2,3) \cdot 10^5$ кл/см³. Добавки пищи осуществляют при помощи автоматического дозатора или микропипетки после тщательного предварительного перемешивания дрожжевой и водорослевой суспензий.

1.6.5. Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб воды

1. Отбор, транспортировка и хранение проб воды

Объем пробы воды для определения острого токсического действия составляет 500 см^3 , хронического токсического действия – $2,5\text{ дм}^3$. Отбираемый объем должен быть в два раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца биотестирования.

Методы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования должны обеспечить неизменность состава проб в интервале времени между отбором проб и их анализом.

Общие процедуры отбора проб определены в ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

Отбор проб, транспортировка и хранение грунтовых вод осуществляется в соответствии с СТ СЭВ 4710-84 «Воды подземные. Общие требования к отбору проб».

Отбор проб в поверхностных проточных и непроточных водоемах осуществляется в соответствии с ГОСТ 17.1.5.05-85 «Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков».

Для пробоотбора используют устройства в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.04-81 «Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия».

Отбор проб питьевых вод осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51592-2000 «Вода питьевая. Отбор проб».

Отбор питьевых вод перед поступлением в распределительную сеть производят из кранов на водоводах, расположенных на входе в установку обеззараживания.

Пробы питьевой воды в источнике водоснабжения и сточной воды с глубины менее 0,5 м отбираются пробоотборником любого типа объемом 500 – 700 см³.

Водопроводную воду отбирают из-под крана, многократно ополоснув его отбираемой водой, после 10-минутного слива при полностью открытом кране. Кран антисептической обработке не подвергается.

Отбор сточных вод осуществляется в соответствии с требованиями НВН 33-5.3.01-85 «Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод».

Отбор природных и сточных вод следует производить в местах наибольшего перемешивания. Сточные воды отбираются на средней глубине потока, где твердые частицы равномерно распределены.

Очищенные сточные, а также питьевые воды на стадии водоподготовки следует отбирать до системы хлорирования. Предпочтительно отбирать среднесуточную пробу каждый час в течение 24 часов, после тщательного перемешивания всего объема отобранной пробы для исследования берется необходимое количество воды.

Допустимое минимальное количество отбираемых единичных проб для последующего смешения — три, с интервалом между отборами не менее часа.

При взятии проб измеряют температуру воды. Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность. Для лучшей сохранности в жаркую погоду пробы транспортируют в контейнерах-холодильниках при температуре от +4 до +10 °С. В холодный период года контейнеры должны быть снабжены термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При транспортировке не следует держать пробы на свету.

При отборе пробы составляют протокол, в котором указывают цель пробоотбора, число, время, место отбора пробы, температуру воды (или результаты других произведенных измерений), номер пробы, ставят подпись и расшифровывают подпись отбравшего пробы. На бутылку наклеивают этикетку с указанием номера пробы, места, даты и времени ее отбора.

Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают (+2...+4 °С). Хранить пробы следует не более 24 часов после отбора. О продолжительности хранения проб воды делают отметку в протоколе биотестирования. В исключительных случаях, при отсутствии летучих органических веществ, допускается замораживание проб (–20 °С) и их хранение до двух недель, однако следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться. Если пробы требуется оттаивать или фильтровать, то фильтрация и оттаивание должны предшествовать замораживанию.

2. Подготовка проб воды к биотестированию

Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до температуры от +19 до +24 °С.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений (с диаметром частиц более 3,5 мкм) необходима **фильтрация** пробы через наиболее пористые обеззоленные фильтры «белая лента» (недопустимо использовать «синюю ленту», так как она задерживает коллоидные вещества, что занижает результаты биотестирования).

Природные воды фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 3,5 мкм (фильтр перед применением должен быть промыт и простерилизован кипячением в дистиллированной воде не менее 10 минут) или через обеззоленные фильтры «белая лента».

Активный хлор, используемый для обеззараживания питьевых и сточных вод, является токсическим веществом, поэтому перед биотестированием питьевых вод, а также при необходимости анализа сточных вод после системы хлорирования хлор следует удалить из исследуемой воды отстаиванием пробы с открытой крышкой при температуре от +2 до +4 °С не менее 24 часов.

Проба воды, подлежащая тестированию, должна иметь **pH** 7,0 – 8,2, если pH пробы выходит за указанные пределы, в отдельном эксперименте устанавливается токсичность, вызываемая водородным показателем. Затем определяется токсичность воды после нейтрализации пробы. *Подкисление* осуществляют 10 %-ным раствором HCL, *подщелачивание* – 10 %-ным раствором NaOH. После нейтрализации пробы аэрируют 10 – 20 минут для стабилизации pH. Регулирование pH не должно вызывать химической реакции с веществами, присутствующими в пробе (выпадение осадка, комплексообразование) и не должно более чем на 5 % изменять концентрацию исследуемых вод.

При исследовании грунтовых или других вод с **содержанием железа** двухвалентного более 1 мг/дм³ (валовая форма) необходимо предварительное отстаивание проб не менее 24 часов при температуре от +2 до +4 °С. Осветленная вода сифонируется и анализируется на токсичность.

Тестируемая проба воды должна иметь **концентрацию растворенного кислорода** не ниже 6 мг/дм³, в противном случае пробу аэрируют при помощи аквариумного компрессора перед процедурой биотестирования.

3. Приготовление разбавлений исследуемых вод для биотестирования

Для приготовления разбавлений исследуемых вод используется культивационная вода. Предварительно, перед приготовлением необходимых разбавлений вод для исследования, подготавливают соответствующей емкости посуду, в которой будут готовить растворы. Объем используемой посуды должен на 1/3 превышать не-

обходимый объем приготавливаемого разбавления исследуемых вод.

Перед приготовлением разбавлений нужно подготовить по возможности два одинаковых сосуда: один – для разбавления, а другой – для хранения раствора (может случиться, что в ближайшие часы процедуру биотестирования в определенном разбавлении необходимо будет повторить). Как во время приготовления разбавлений, так и при их хранении бутылки или другая посуда обязательно должны быть закрыты пробками и снабжены надписями о приготовленной концентрации исследуемых вод. Приготовление растворов, разбавлений, проведение биотестирования выполняются при комнатной температуре (19 – 24°C). Температура культивационной и исследуемой воды должна быть также доведена до комнатной температуры перед приготовлением разбавлений.

Для приготовления разбавлений берут определенные, отмеренные мерной посудой, объемы исследуемой и разбавляющей (культивационной) воды. В качестве мерной посуды для объемов меньше 10 см³ используются мерные пипетки, более 10 см³ – мерные цилиндры. ***Поверхностные, пресные, грунтовые и сточные воды*** с неизвестной степенью токсичности анализируются в ***100, 30, 9, 3, и 1%-ной концентрациях***. ***Сточные и очищенные сточные воды*** (отобранные до системы хлорирования), если не известны их токсические свойства, тестируются в первичном испытании в большем наборе разведений при ***100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,5, 0,78 %-ной концентрации***.

Если предварительно известно, что ***сточные воды*** обладают ***гипертоксичностью***, а также, если это можно предположить по данным гидрохимического исследования, исследуемые концентрации уменьшаются и составляют ***10, 3, 0,3, 0,1 %***. Возможен произвольный выбор разведений. Чем выше предполагаемая токсичность, тем большей должна быть кратность разбавлений исходной пробы.

После получения предварительных результатов биотестирования при необходимости готовятся и анализируются дополнительные разбавления.

В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают.

При выполнении практического биотестирования используют в основном два показателя, характеризующих содержание исследуемой воды в разбавленном культивационной водой растворе: *во сколько раз исследуемая вода разбавлена и каково ее процентное содержание в разбавлении.*

Пример. Как путем разбавления получить x %-ный раствор сточной воды и рассчитать, во сколько раз она разбавлена? Величину x будем измерять в долях. Тогда единица соответствует раствору, в котором x – доля исследуемой воды и $(1 - x)$ – доля чистой культивационной воды. Культивационной воды в растворе больше, чем сточной, в $\frac{1-x}{x}$ раз. Степенью разбавления называется величина $\frac{1}{x}$. Если x измеряется в процентах, то эта величина запишется в виде:

$$\frac{100\%}{x\%}$$

Итак, если к одной доле сточной воды добавить $(100 - x)$ % долей культивационной воды, мы получим x %-ный раствор. Например, для получения 5 %-ного раствора сточных вод вычислим степень разбавления

$$\frac{100\%}{5\%} = 20$$

и получим, что 1 доля сточных вод и 19 долей культивационной воды составят при смешении 5 %-ный раствор сточных вод, т.е. 5 %-ный раствор сточных вод получится при их 20-кратном разбавлении.

1.7. Процедура биотестирования

1.7.1. Эксперименты по установлению острого токсического действия

1. Биотестирование проб воды

Для определения острого токсического действия проводится биотестирование исходной (без разбавления) исследуемой воды

или водной вытяжки из почв, осадков сточных вод, отходов. Если требуется сравнить степень токсичности сточной воды, отобранной из разных мест или в разное время, готовят серию разбавлений (не менее трех), приготовленных по п. 1.6.5.3.

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

Биотестирование проводится с соблюдением требований к температуре, продолжительности фотопериода и качеству культивационной воды по пп. 1.6.2; 1.6.3.2.

Эксперименты проводятся в химических стаканах объемом 30 см^3 , которые заполняются на 15 см^3 исследуемой водой, в них помещается *по одной цериодафнии* не более 24-часового возраста (разница между возрастом рачков не должна составлять более 8 часов, что определяется по размеру рачков и обеспечивается синхронизированным культивированием). Цериодафний отлавливают из химических стаканов, в которых выращивается синхронизированная культура, пипеткой объемом 2 см^3 (с отпиленным и оплавленным концом и диаметром отверстия $2,0\text{ мм}$) с резиновой грушей. Помещают их по одной на сачок, через который вода сливается в отдельный химический стакан, после чего цериодафнии сачком вносят в стаканы с исследуемой водой. ***Посадку рачков начинают с контрольной серии. В исследуемые растворы цериодафний помещают, начиная с больших разбавлений (меньших концентраций загрязняющих веществ) к меньшим разбавлениям.*** После каждой посадки в исследуемые растворы сачок тщательно промывается в сосуде объемом 2 дм^3 с культивационной водой. Для работы с серией контроля должен быть отдельный сачок.

Для каждой серии исследуемой воды используется 10 химических стаканов. Общее количество стаканов, используемых в опытах, равно удесятенной сумме всех разбавлений, плюс 10 для исходной воды, плюс 10 для контроля.

В экспериментах по определению острой токсичности цериодафний кормят перед началом эксперимента, а в последующие сутки – согласно п. 1.6.4.4. При исследовании малых концентраций токсиканта необходимо отказаться от кормления дрожжами, так как дрожжевые клетки поглощают химикат, вследствие чего

концентрация его в растворе снижается и это заметно влияет на результаты исследования. **В течение 48 часов цериодафний не кормят.**

В экспериментах по определению острой токсичности растворы не меняют.

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

Неподвижные особи считаются погибшими, если они не начинают двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания стакана. Отмечаются также *признаки* гибели гидробионтов (изменения в окраске тела и содержимого кишечника, в жизненно важных органах особей).

Результаты наблюдений заносят в рабочий журнал (Приложение 1, 2). Если гибель цериодафний в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитываются, и он должен быть повторен.

2. Гидрохимический анализ исследуемых растворов

После того как результаты эксперимента учтены, все цериодафнии из стаканов выбрасываются, каждая серия разбавлений из 10 стаканов сливается в химический стакан объемом 200 см³, и проводятся измерения рН, температуры, содержания растворенного кислорода с помощью оксиметра. Содержание растворенного кислорода в конце эксперимента должно быть не ниже 4 мг/дм³, рН в диапазоне 7,0 – 8,2. Все отклонения от установленных норм, а также данные по каждой серии разбавлений, исходной воды и контролю также заносят в рабочий журнал и протокол результатов эксперимента (Приложение 1).

1.7.2. Эксперименты по установлению хронического токсического действия

Для определения хронического токсического действия проводится острый эксперимент с использованием контроля и серии разбавлений, в которых острое токсическое действие не проявилось или готовится новая серия разбавлений с учетом результатов острых опытов. За исходную воду принимается разбавление иссле-

дуемых вод, водных вытяжек из осадков, отходов, почв, не вызвавшее острого токсического действия. В случае исследования токсичности растворов веществ целесообразно использовать 5-6 концентраций с пятикратными интервалами. Исходную концентрацию и диапазон выбирают, руководствуясь данными острого и подострого опытов. Как правило, **исходной концентрацией для хронического эксперимента является концентрация, составляющая 0,1 – 0,5 от ЛК₅₀ (LC₅₀), установленной в остром опыте.**

Для определения наличия хронического токсического действия воды в контрольном и других створах водного объекта воду тестируют без разбавления. Если требуется сравнить степень токсичности разных проб воды или использовать результаты биотестирования при установлении величин ПДС, готовят серию разбавлений. Определяют минимальную кратность разбавления, при которой хроническое токсическое действие не проявляется.

Определение токсичности каждой пробы и каждого разбавления проводится в 10 параллельных сериях и сопровождается одной для всех разбавлений серией контроля в 10 стаканах.

Процедуру приготовления растворов и посадки рачков в экспериментальные стаканы по определению хронического токсического действия производят по п. 1.7.1.1.

Биотестирование по определению хронического токсического действия проводится с соблюдением требований к температуре, продолжительности фотопериода и качеству культивационной воды по пп. 1.6.2; 1.6.3.2. При несоблюдении этих условий продолжительность хронического эксперимента может увеличиться, или его результаты будут сомнительны. Вынужденное нарушение требуемых условий следует отмечать в журнале и протоколе.

В экспериментах по определению хронического токсического действия цериодафний кормят перед началом эксперимента и в последующие дни – один раз в сутки по п. 1.6.4.4.

Смена растворов на новые осуществляется через каждые двое суток на третьи из свежееотобранных проб или из проб, хранящихся в холодильнике при температуре от +2 до +4 °С.

Для смены растворов готовят 10 параллельных рядов испытуемых разбавлений (и контроль), аналогичных исходным, куда из старых растворов выжившие цериодафнии переносятся при помощи сачка, на который они помещаются пипеткой объемом 2 см³, в

свежеприготовленные растворы. Старые растворы профильтровывают через сито из мельничного газа, и на нем производят подсчеты родившейся молоди, которую удаляют, а в растворах – измерения физико-химических параметров по п. 1.7.1.2. Содержание растворенного кислорода в конце хронического эксперимента должно быть не ниже 4 мг/дм³, рН в диапазоне 7,0 – 8,2. Все отклонения от установленных норм заносятся в рабочий журнал и протокол результатов эксперимента.

Учет смертности и родившейся молоди в опыте и контроле проводят один раз в сутки ежедневно, до конца хронического опыта. Молодь подсчитывают и удаляют пипеткой, пропуская исследуемый раствор через сито над тем стаканом, в котором производится подсчет. Исходных выживших самок возвращают в стакан.

Хронический опыт считается законченным, если в контроле выжило 80 % испытуемых цериодафний, а 60 % и более из них дали три последовательных поколения молоди (первый помет при удовлетворительных условиях на 3-4-й день и каждый следующий через 36 – 48 часов; при соблюдении удовлетворительных условий обычно происходит три помета за 7 – 10 суток эксперимента; в зимний период третий помет, как правило, происходит на 10-е сутки). Считают погибших цериодафний и прекращают эксперимент в стаканах с погибшей самкой. Родившуюся молодь подсчитывают (при помощи лупы или стереоскопического микроскопа) и выбрасывают. Время биотестирования сокращается, если при промежуточном подсчете устанавливают гибель 20 и более процентов исходных цериодафний по сравнению с контролем или достоверное отличие от контроля показателя плодовитости.

Результаты экспериментов заносят в рабочий журнал. Форма регистрации представлена в Приложениях 1, 3, 4.

1.8. Обработка, оценка и оформление результатов

1.8.1. Острые токсикологические эксперименты

1. Расчет процента погибших цериодафний в тестируемой воде по сравнению с контролем

При определении острой токсичности питьевых, сточных, поверхностных, грунтовых вод, а также водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов и их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную (концентрацию) кратность разбавления вод, водных вытяжек, вызывающую гибель 50 % тест-объектов за 48-часовую экспозицию (LK_{50-48} , LKP_{50-48});
- безвредную (концентрацию) кратность разбавления вод, водных вытяжек, вызывающую гибель не более 10 % тест-объектов за 48-часовую экспозицию (BK_{10-48} , BKP_{10-48}).

Для определения острой токсичности исследуемых вод, водной вытяжки рассчитывается процент погибших в тестируемой воде цериодафний (A , %) по сравнению с контролем:

$$A = \frac{X_k - X_t}{X_k} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где X_k – количество выживших цериодафний в контроле;

X_t – количество выживших цериодафний в тестируемой воде.

При $A \leq 10$ % тестируемая вода или водная вытяжка не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления).

При $A \geq 50$ % тестируемая вода, водная вытяжка оказывает острое токсическое действие (средняя летальная кратность разбавления).

2. Графический метод определения LKP_{50-48}

Если экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления, вызывающей 50 %-ную гибель цериодафний за 48 часов экспозиции, то для получения точного значения LKP_{50-48} без выполнения дополнительных экспериментов используется графический метод определения.

Чтобы получить на графике линейную зависимость, используется пробит-анализ. Результаты экспериментов по установлению

острого токсического действия из рабочего журнала (см. Приложение 2) заносят в таблицу 2. Значения пробитов, соответствующие установленному проценту гибели цериодафний, находят по таблице 3. В таблицу 2 вносят значения пробитов для экспериментально установленного процента гибели цериодафний (см. табл. 3) и значения десятичных логарифмов для исследованных концентраций сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов.

Таблица 2

Форма записи результатов определения острой токсичности сточной воды

<i>Концентрация сточных вод (С), %</i>	<i>Десятичный логарифм концентрации (lgC)</i>	<i>Количество погибших цериодафний</i>	<i>Значения пробитов для % гибели</i>
3.12	0.494	0	-
6.25	0.796	0	-
12.50	1.097	10	3.72
25.00	1.398	40	4.75
50.00	1.699	80	5.84
100.00	2.000	100	7.33

По значениям, пробитов (см. табл. 3.) и десятичных логарифмов от экспериментально полученных данных (табл. 2) строится график (рис. 3). По оси абсцисс откладываются значения логарифмов процентных концентраций исследуемых вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов, по оси ординат – пробиты от значений процента гибели цериодафний. Экспериментально полученные значения вносятся в систему координат и через точки проводится прямая.

На графике параллельно оси логарифмов концентраций (lgC) проводится прямая из точки, соответствующей пробитному значению 5, что соответствует 50%-ной гибели цериодафний (см. табл. 3). Из точки пересечения прямой с графиком зависимости пробитного значения ингибирования тест-параметра от логарифма концентраций опускают перпендикуляр на ось логарифма концентраций и получают значение логарифма концентрации исследуемых вод, водных вытяжек, соответствующей ЛКР₅₀₋₄₈. Далее логарифм концентрации переводят в процентную концентрацию.

Таблица 3

**Значения пробитов для экспериментально устанавливаемой
гибели цериодафний от 0 до 99 %**

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

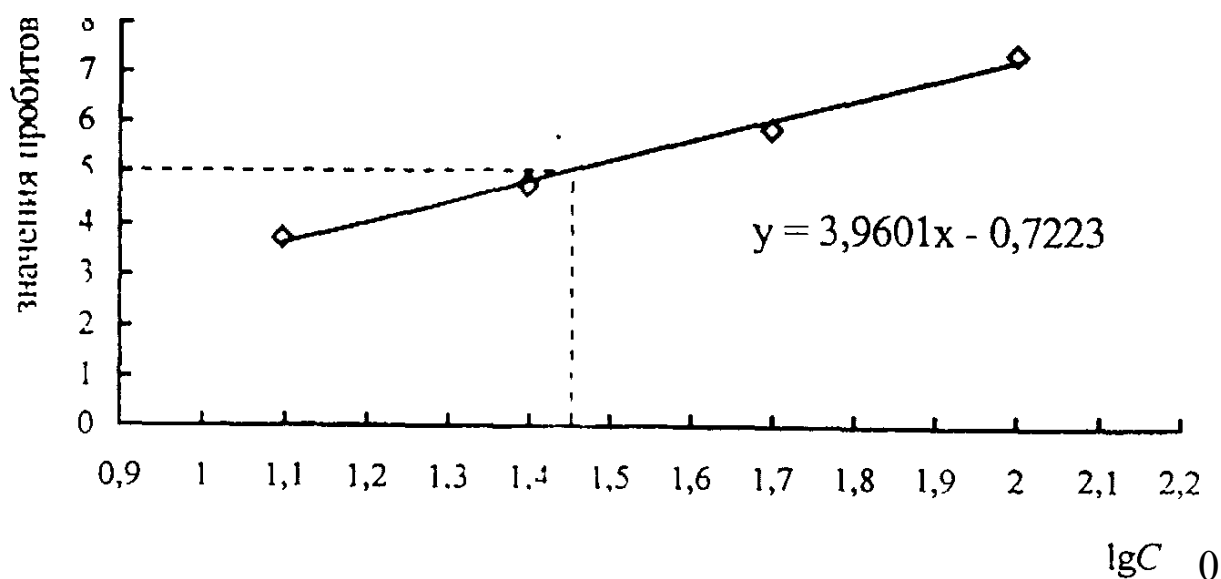


Рис. 3. Линейная зависимость пробитного значения гибели цериодафний от логарифма концентраций исследуемых вод

Для нахождения точных значений величин логарифмов концентраций, соответствующих 50 %-ному ингибированию тест-параметра, график строят в программе Excel (пакет Microsoft Office), указывая в опции «тип диаграммы» параметр «точечная». Уравнение прямой, описывающее взаимосвязь между этими величинами, получают следующим образом: в параметре «диаграмма» указывается команда «добавить линию тренда». В опции «линия

тренда» «тип» указывается «линейная», в опции «линия тренда» «параметры» помечается галочкой окошко «уравнение на диаграмме».

Из полученного уравнения линии тренда получают значения величин $x = \lg C$, соответствующие величинам y (значениям пробитов).

Пробитное значение 5,0 соответствует логарифму концентрации исследуемой воды 1,44, вызывающей ингибирование 50 % тест-параметра за 48 часов экспозиции. Логарифм процентной концентрации переводится в процентную концентрацию: $\lg C_{50-48} = 1,44$ соответствует процентной концентрации 27,54%.

Таким образом, устанавливается, что 27,54%-ная концентрация исследуемой сточной воды вызывает 50%-ную гибель тест-объектов за 48 часов, $ЛКР_{50-48} = 3,63$ (кратность разбавления в 3,63 раза).

Все полученные значения, расчеты и график по результатам острого эксперимента вносят в рабочий журнал.

1.8.2. Хронические токсикологические эксперименты

Продолжительность хронического токсикологического эксперимента с использованием цериодафний – 7 и более суток (до появления третьего помета молоди в контроле). Хроническая токсичность устанавливается по двум параметрам: гибели 20% и более исследуемых тест-организмов и (или) по достоверному отклонению в плодовитости исследуемых тест-организмов по сравнению с контролем. Результаты хронического опыта заносятся в таблицы 10, 11, форма которых представлена в Приложениях 3, 4.

Для оценки результатов используются следующие значения.

1. При определении токсичности отдельных веществ:

– устанавливают концентрацию вещества, вызывающую хроническую токсичность за 7 и более суток экспозиции, если гибель цериодафний составит не менее 20% и (или) в их плодовитости *будет* установлено достоверное отклонение от контроля;

– безвредную концентрацию вещества, не вызывающую хронической токсичности за 7 и более суток экспозиции, если гибель цериодафний составит не более 20% и (или) в их плодовитости *не будет* установлено достоверное отклонение от контроля;

2. При определении хронической токсичности вод, водных вытяжек, включающих смеси различных веществ, а также их разбавлений, устанавливают:

– кратность разбавления вод, водных вытяжек, вызывающую хроническую токсичность за 7 и более суток экспозиции, если гибель цериодафний составит более 20 % и (или) в их плодовитости будет установлено достоверное отклонение от контроля;

– безвредную кратность разбавления вод, водных вытяжек, не вызывающую хронической токсичности за 7 и более суток экспозиции, если гибель цериодафний составит менее 20% и (или) в их плодовитости не установлено достоверное отклонение от контроля.

3. Для определения хронической токсичности воды, водной вытяжки рассчитывают:

– процент погибших цериодафний в тестируемой воде для каждой серии разведений по сравнению с контролем;

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

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

Для расчета достоверного отклонения в количестве родившейся молоди на одну самку по отношению к контролю по результатам эксперимента составляются таблицы 12, 13 (Приложения 5, 6).

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

– определение среднего арифметического (\bar{x}) показателя плодовитости в контрольной и тестируемой воде:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (3)$$

где x_i – количество молоди в i -ом стакане; n – количество параллельных серий (стаканов);

– определение среднего квадратичного отклонения (σ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}; \quad (4)$$

– определение ошибки среднего арифметического показателя плодovitости m :

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}; \quad (5)$$

– определение показателя достоверности t_d разности двух сравниваемых величин:

$$t_d = \frac{\bar{x}_K - \bar{x}_T}{\sqrt{m_K^2 + m_T^2}}, \quad (6)$$

где \bar{x}_K и \bar{x}_T – среднее арифметическое показателя плодovitости в контроле и тестируемой воде, m_K^2 и m_T^2 – квадраты ошибок среднего арифметического в контроле и тестируемой воде.

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

$$f = n_K + n_T - 2, \quad (7)$$

где n_K и n_T – число наблюдений (число стаканов) в контроле и в тестируемой воде. Поскольку при биотестировании на цериодафниях серия каждого разведения и контроля состоит из 10 стаканов, $n_K = n_T = 10$, следовательно, $f = 18$.

Критерий достоверности Стьюдента для уровня достоверности $P = 0,95$ и степени свободы $n_K + n_T - 2$ определяется по таблице 4.

Таблица 4

Значения критерия Стьюдента (t_{cm})

f	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
t_{Cr}	12,7	4,3	3,18	2,78	2,57	2,45	2,36	2,31	2,26	2,23	2,20	2,18	2,16	2,14	2,13

16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
2,12	2,11	2,10	2,09	2,09	2,08	2,07	2,07	2,06	2,06	2,06	2,05	2,05	2,05	2,04

Если рассчитанное $t_d \geq t_{Cr}$, то изменения в плодovitости цериодафний достоверны, а не случайны. В этом случае принимают, что исследуемая вода, водная вытяжка оказывает хроническое токсическое действие.

Если $t_d \leq t_{ст}$, то выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле недостоверны, следовательно, исследуемая вода, водная вытяжка не оказывает на цериодафний хронического токсического действия.

4. Для характеристики степени хронического токсического действия используют величину БКР (безвредная кратность разбавления, или кратность разбавления воды, водной вытяжки, при которой хроническое токсическое действие не проявляется).

5. По результатам определения острой и хронической токсичности вод ведутся записи в рабочем журнале (см. Приложения 1, 2). Пример статистической обработки полученных результатов биотестирования приведен в Приложении 6.

1.9. Контроль погрешности методики токсикологического анализа

1.9.1. Контроль качества оценки токсичности воды

Проводится один раз в три месяца по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту – двуххромовокислumu калию ($K_2Cr_2O_7$). Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 24 часов гибнет 50% цериодафний, составляет 0,9 – 2,0 мг/дм³.

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

1.9.2. Процедура определения диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант

Определяют ту концентрацию модельного токсиканта, при которой за 24 часа гибнет 50% подопытных организмов. Для этого на основании стандарт-титра методом последовательных разбавлений

готовят серии растворов двуххромовокислого калия в культивационной воде с концентрациями 0,5; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/дм³.

Испытания на цериодафниях проводят в соответствии с прописью методики в трех независимых опытах.

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

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

В тех случаях, когда чувствительность цериодафний не укладывается в установленный диапазон по причине ухудшения качества водопроводной воды, используемой для приготовления культивационной воды, например в период весенних паводков, то культура цериодафний не меняется. Проводятся мероприятия по улучшению качества культивационной воды, дополнительное отстаивание или фильтрование, аэрирование и т.д. В протоколах биотестирования в этот период указывается установленная концентрация модельного токсиканта, при которой гибнет 50% цериодафний за 24 часа экспозиции. После улучшения качества используемой культивационной воды чувствительность цериодафний к модельному токсиканту восстанавливается до установленной нормы через 1 – 2 недели.

1.10. Форма представления результата анализа

Результат токсикологического анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$X \pm \sigma (\overset{\circ}{\Delta}) \text{ при } P = 0,95,$$

где $\sigma (\overset{\circ}{\Delta})$ – значение характеристики случайной составляющей погрешности.

Тема 2. Экспериментальная оценка изменения качества среды в процессе самоочищения модельных водоемов от токсических веществ

Самоочищение водоема от загрязняющих веществ происходит в результате физико-химических и биологических процессов и во многом определяется жизнедеятельностью гидробионтов. Поэтому научно-практические усилия общества, направленные на повышение качества воды, должны предполагать не только разработку нормативов загрязняющих веществ, очистку воды на водозаборе и при сбросах сточных вод, но и исследование процессов формирования качества воды в водоемах.

Для изучения биоценозов в более полном приближении к реальным условиям их существования в исследовательской практике с успехом используются экспериментальные модельные системы – мезокосмы и микрокосмы.

Микрокосмы – это искусственно созданные водные сообщества из лабораторных культур или природных растительных и животных гидробионтов. *Использование таких модельных экосистем позволяет выяснить воздействие загрязнителей на биогеоценозы, а также проследить динамику очищения водоемов с участием биотических и абиотических факторов.*

Терминологически понятия «микрокосм» (биокосм) и «мезо-косм» различаются нечетко. Однако в рамках каждой конкретной серии исследований, в том числе и экотоксикологических, различие между ними становится очевидным, поскольку эти два понятия имеют в первую очередь соотносительный смысл. Важнейший для искусственных экосистем фактор – размер, влияющий на набор содержащейся в них биоты, а также на природу получаемых данных и стоимость исследований. Большие системы требуют больших капитальных вложений и затрат, что делает относительно сложным проведение и повторение работ с их использованием. Поэтому конкретные экотоксикологические исследования надо начинать с простых лабораторных тестов на токсичность с отдельными видами гидробионтов и с предварительных полевых исследований. Затем надо изучать реакции небольших простых лабораторных

микрокосмов на конкретные токсиканты. Только после этого можно переходить к тестированию на значительно больших мезокосмах, располагаемых в естественных условиях и содержащих полный набор представительных видов гидробионтов, включающий в себя и высшее трофическое звено – рыб. Такие работы проводят для детализации и уточнения экологических воздействий загрязняющих веществ (ЗВ), для увеличения достоверности результатов и прогнозов, основанных на получаемых данных. *Использование мезокосмов позволяет ставить длительные эксперименты для выяснения отдаленных последствий загрязнения*, поскольку при большем объеме систем возрастает их стабильность и уменьшается влияние выделяемых гидробионтами метаболитов (как, например, в замкнутых экспериментальных экосистемах, закрытых для поступления и оттока вещества).

Для многих токсичных веществ тестирование в проточных экосистемах (при постоянном возобновлении тестируемой среды для подопытных организмов) часто является необходимым условием грамотно проведенных исследований. Например, корректными и сравнимыми результатами биотестирования на рыбах в небольших микрокосмах признаются только результаты исследований, выполненных в проточных аквариумах, в которых постоянно с помощью специальных устройств поддерживается необходимая концентрация испытуемого вещества или группы веществ. Это связано с тем, что в непроточных условиях могут наблюдаться следующие отрицательные моменты, делающие результаты биотестирования малоприменимыми: непостоянство концентрации тестируемого вещества за счет его разложения, связывания и выпадения в нетоксичной форме; накопление продуктов жизнедеятельности гидробионтов и метаболитов испытуемых соединений.

В зависимости от целей тестирование химических веществ в проточных микрокосмах проводится кратковременно (длительность меньше месяца) и долговременно (длительность больше месяца). Выбор между этими двумя типами тестов делают на основе знаний о природе, пути поступления и токсичности изучаемого вещества для репрезентативных видов гидробионтов.

Кратковременное тестирование применяют для определения острых биологических эффектов на индивидуальном и популяционном уровнях (изучение таких эффектов в целостной эко-

системе обеспечивает значительно большую степень реалистичности результатов по сравнению с обычным лабораторным биотестированием), а также *для описания закономерностей разложения вносимых соединений* (также более реалистичного, чем собственно физико-химическое изучение) *с учетом процессов биологического самоочищения в экосистемах.*

Для исследований такого типа формируют достаточно сложные микрокосмы, чтобы поддерживать жизнедеятельность организмов из основных таксонов. Однако в микрокосмах не обязательно имитируется весь комплекс природных пищевых сетей.

Долговременное тестирование применяется для достижения двух вышеописанных целей в отношении показателей и веществ, характеризующихся сравнительно более высокой степенью устойчивости. Однако такого рода тесты используют в основном при оценке *хронических биологических эффектов* при поступлении ЗВ в сублетальных концентрациях (на индивидуальном, популяционном, видовом уровнях, а также уровнях сообществ и биоценоотическом), которые проявляются лишь при длительной экспозиции с токсикантом.

Если можно ожидать *биоаккумуляции* и передачи по трофическим цепям определенных ЗВ, то при изучении следует определять их концентрации в растениях, макробеспозвоночных, зоопланктоне и особенно в рыбе (поскольку существует риск попадания соответствующих токсических веществ в организм человека при использовании рыбы в пищу).

Экологические особенности в искусственном водоеме наблюдаются с момента окончательного формирования микрокосмов (спустя две недели от начала формирования) на протяжении всего периода воздействия, а затем еще 2 – 3 месяца после окончания этого воздействия. Реальные концентрации тестируемого вещества контролируются в течение всего эксперимента.

При отборе проб придерживаются определенного графика. За макрофитами и рыбой во время воздействия ЗВ ведутся ежедневные наблюдения. Интегральные пробы воды отбираются с разной глубины в нескольких точках каждого микрокосма. Затем в них определяют электропроводность, щелочность, жесткость, общее количество взвешенных частиц и содержание пигментов фитопланктона. Эти же пробы позволяют определять концентрацию

нитратов, нитритов, аммония, общего азота, фосфатов, общего фосфора и других биогенных веществ.

Биомасса организмов впоследствии определяется с помощью весоразмерных зависимостей, установленных при предварительном анализе проб, либо с помощью результатов собственных размерных определений и литературных данных.

В готовые микрокосмы исследуемое вещество вводится следующими способами: распылением по водной поверхности (имитирующим попадание из воздуха), внесением с грунтово-водной смесью (для имитации смылов с поверхности почвы); приливанием базового раствора. Концентрация и частота внесения веществ, необходимые для достижения требуемых концентраций в микрокосмах, зависят от целей исследования.

Тестируемое вещество в каждую емкость следует вносить рандомизированно (очередность внесения вещества в емкости – иногда используются специальные схемы). В отдельных случаях для предотвращения предвзятости выполняется даже усиленная рандомизация.

После окончания эксперимента все полученные данные статистически обрабатываются. Для каждой величины подсчитывается среднее ее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации. При непараметрическом анализе наряду с ранжированием может оказаться полезным подсчет медианы и границ каждого параметра. Для анализа всего массива данных, полученных с помощью экспериментальных микрокосмов, применяется широкий спектр статистических подходов. Различие контроля и опыта оценивается по t – критерию Стьюдента (при единственном варианте опыта). Правильность выводов, которые делаются на основе этих тестов, зависит от верности допущений о равенстве дисперсий и нормальности распределений в выборках.

2.1. Биотестирование модельного раствора токсиканта с использованием цериодафний

Изучение процессов самоочищения искусственных водоемов (микрокосмов) от загрязняющих веществ методами биотестирования основано на *оценке изменения токсичности среды по показателю выживаемости цериодафний в пробах воды, отобранных из*

контрольных и опытных микрокосмов *через определенные интервалы времени* на протяжении эксперимента. По мере разрушения токсиканта под действием абиотических факторов (температура, свет) или его биотрансформации живыми организмами, присутствующими в водоемах, происходит изменение токсичности растворов. Показателем этого изменения является количество выживших в пробе рачков (по результатам острого опыта).

Таким образом, моделирование процессов самоочищения водоемов от токсиканта предполагает ***формирование в начале эксперимента определенной токсичности среды путем внесения в микрокосм токсиканта в концентрации, вызывающей гибель 80 – 100% цериодафний в остром опыте, т.е. в концентрации большей, чем среднелетальная (LC₅₀₋₄₈)***. Для этих целей необходимо в предварительном остром (48-часовом) эксперименте выявить ***диапазон летальных концентраций*** (от LC₀₋₄₈ до LC₁₀₀₋₄₈) исследуемого вещества ***для цериодафний и установить среднелетальную концентрацию, которая и будет являться основой для создания первоначальной остротоксичной среды водоема***.

2.1.1. Выявление летальных концентраций исследуемого вещества в остром опыте по показателю выживаемости Ceriodaphnia

1. Оборудование и материалы

Растворы стандартных промышленных препаратов: 0,1%-ный раствор CuCl₂, 1%-ный раствор фенола, 10%-ный раствор синтетических моющих средств (СМС); культура дафний (цериодафний); чашки Петри или пробирки; биологизированная (культивируемая) вода; стеклянные трубочки для отбора дафний или мельничный газ (полоски) – для цериодафний; чашки Петри или стаканчики для промывки полосок; пипетки химические на 1,0 мл и 5,0 мл; химические мерные стаканы на 100 мл – 5 шт; мерные цилиндры на 50 мл и 100 мл.

2. Принцип методики

Острые опыты проводятся для предварительной оценки степени токсичности и выявления остротоксичной концентрации вещества, поступающего в окружающую среду.

Методика основана на определении выживаемости цериодафний при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с культурой рачков в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль). Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более рачков за 48 часов в исследуемой воде при условии, что в контроле гибель не превышает 10%. В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают:

- летальную концентрацию исследуемого вещества, вызывающую гибель 100% тест-организмов (LK_{100-48} (LC_{100-48}));
- среднюю (медианную) летальную концентрацию исследуемого вещества, вызывающую гибель 50% и более тест-организмов (LK_{50-48} (LC_{50-48}));
- летальную концентрацию исследуемого вещества для редких (единичных) особей (принимается за пороговую) (LK_{0-48} (LC_{0-48})).

3. Составление рядов рабочих концентраций исследуемого вещества

Для определения степени токсичности неизвестного в токсикологическом отношении вещества исходя из цели эксперимента необходимо приготовить основной (маточный, концентрированный) раствор исследуемого вещества: например, 10%-ный; 1%-ный или другой процентной концентрации. В качестве растворителя или разбавителя для приготовления концентрированных растворов используется дистиллированная вода (или специальные растворители).

Модельные (рабочие) растворы токсиканта готовятся на отстоянной – культивационной (биологизированной) воде (или воде из условно чистого водоема) путем разбавления основного (маточного) раствора в 2^n раз, где $n = 0, 1, 2, 3...$ (например: в 0, 2, 4, 8, 16 и т.д. раз), либо в 10^n , где $n = 0, 1, 2, 3...$ (например: в 0, 10, 100, 1000 и т.д. раз), либо составляется ряд концентраций в геометрической прогрессии, с коэффициентом 0,1, например: 1000 мг/л; 100 мг/л; 10 мг/л; 1 мг/л; 0,1 мг/л и т.д.

Для получения биологизированной воды питьевая вода отстаивается и аэрируется в течение 3 – 7 суток (до полного дехлорирования) в присутствии высшей водной растительности (2 – 3 г по воздушно-сухой массе любой аквариумной растительности на

1 дм³ питьевой воды). Культивационная вода должна удовлетворять определенным требованиям (см. п. 1.6.2).

4. Эксперименты по установлению острого токсического действия исследуемых растворов (опыты на цериодафниях)

Эксперименты проводятся в химических стаканах, широких (биологических) пробирках или в чашках Петри. Количество емкостей определяется по числу исследуемых концентраций и параллельных серий (повторностей). Дополнительно ставится контрольный эксперимент в том же количестве повторностей.

Для постановки острого опыта на цериодафниях готовится ряд растворов исследуемого вещества, состоящий из 5-6 концентраций. Опыты ставятся в трех параллельных сериях. В каждую пробирку (чашку Петри) вносится по 15 мл изучаемого раствора вещества и помещается по 5 односуточных цериодафний (в том числе и в контрольные – с биологизированной водой). Разница между возрастом рачков не должна превышать 6 – 8 часов, что определяется по размеру рачков и обеспечивается синхронизированным культивированием (п. 1.6.3.2). Посадку рачков начинают с контрольной серии. В исследуемые растворы цериодафний помещают, начиная с больших разбавлений (меньших концентраций загрязняющих веществ) к меньшим разбавлениям. При посадке цериодафний в растворы вещества с помощью полоски мельничного газа или других приспособлений*, последние промываются в чистой воде каждый раз перед отловом рачков из культуры. Для работы с серией контроля используются отдельные инструменты отлова.

** Возможны другие способы посадки цериодафний в сосуды для тестирования: стеклянной трубкой или пипеткой объемом 2 см³ отлавливают рачков и вместе с водой, попавшей в трубку, переносят в пустой сосуд для биотестирования. Затем пастеровской пипеткой отсасывают жидкость и осторожно, чтобы не повредить рачков, приливают отмеренный объем тестируемой воды.*

Все емкости с цериодафниями помещаются в шкаф-люминостат с искусственным освещением и температурой не ниже 20⁰С.

Число живых рачков оценивается визуально, регистрация проводится по следующей схеме: через каждый час до конца первого дня эксперимента, а затем два раза в сутки ежедневно до истечения

срока острого опыта (48 часов для *Ceriodaphnia*, 96 часов – для *Daphnia magna*).

При проведении наблюдения в опытных и контрольных емкостях обязательно регистрируются выживаемость и характер движений рачков (всплыли к поверхности, легли на дно, судорожно всплывают и падают на дно, иммобилизация, т.е. дафнии еще проявляют симптомы жизнедеятельности, но не реагируют на покачивание стакана). Неподвижные особи считаются погибшими, если они не начинают двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания стакана. Результаты эксперимента сразу же заносятся в протокол (табл. 5).

Таблица 5

Результаты исследований по определению медианной летальной концентрации методом дафниевых тестов

Вещество	Концентрация, мг/л	Дата опыта	Экспозиция, час.	Количество выживших цериодафний, экз.					Процент к контролю	% среднего (А)
				x			\bar{x}			
				Повторность						
				1	2	3				

где x – количество выживших особей в одной повторности: контрольного раствора – x_K ; тестируемого раствора – x_T ;

\bar{x} – среднее арифметическое количества выживших особей в трех повторностях: \bar{x}_K – в контроле; \bar{x}_T – в тестируемой воде;

А – процент среднего арифметического количества погибших особей в тестируемой воде по сравнению с контролем рассчитывается по формуле 2 (п. 1.8.1):

$$A = \frac{\bar{x}_K - \bar{x}_T}{\bar{x}_K} \cdot 100\%$$

Наименьшая концентрация, в которой происходит полное подавление жизнедеятельности изучаемых организмов, обозначается как ЛК₁₀₀₋₄₈ (LC₁₀₀₋₄₈), а наибольшая концентрация, в которой нет признаков гибели, – как ЛК₀₋₄₈ (LC₀₋₄₈).

5. Определение степени острого токсического действия тестируемого раствора (расчет медианной летальной концентрации - LC_{50})

Для получения точного значения концентрации, вызывающей гибель 50% цериодафний за 48 часов экспозиции используется **графический метод**, основанный на определении LC_{50} по кривой летальности, или характеристической кривой, отражающей распределение индивидуальной устойчивости животных к исследуемому токсическому агенту.

Характеристическая кривая (рис. 4) строится путем нанесения доз или концентраций на ось абсцисс, а процента летальности – на ось ординат. Зависимость между концентрацией и эффектом (в данном случае – процентом гибели животных) при графическом изображении должна иметь вид симметричной S-образной кривой. При логарифмировании концентраций кривые становятся более симметричными. От точки на оси ординат, соответствующей 50% гибели, проводят линию, параллельную оси абсцисс. Из точки пересечения линии с экспериментальной кривой опускают перпендикуляр на ось абсцисс и находят логарифм концентрации, соответствующей искомой величине LC_{50} .

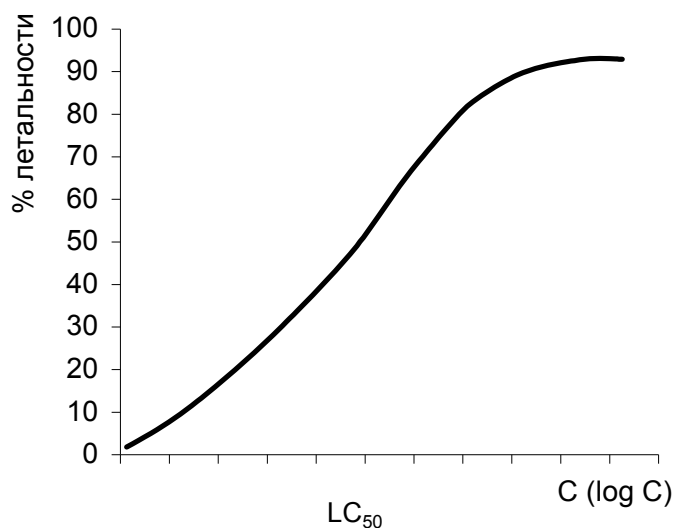


Рис. 4. Кривая зависимости выживаемости цериодафний от концентрации исследуемого вещества в растворе

Все полученные значения, расчеты и график по результатам острого опыта вносят в рабочий журнал (протокол опыта).

2.2. Выявление роли факторов среды в процессах самоочищения модельных водоемов (микрокосмов) от токсических веществ методами биотестирования

2.2.1. Выявление роли абиотических и биотических факторов в процессах детоксикации химических веществ в модельном эксперименте

1. Принцип методики

Методика основана на *изучении влияния растительных и животных гидробионтов* и их искусственных сообществ, а также абиотических (температура, освещенность и т.д.) факторов, *на процессы очищения воды* микрокосмов от токсических веществ *методом дафниевого теста*. Показателем улучшения или ухудшения качества воды в микрокосмах и влияния на него различных факторов служит увеличение или снижение количества выживших в остром (48-часовом) опыте цериодафний в пробах воды, взятых из водоемов с разными комбинациями биотических и абиотических факторов через определенные промежутки времени (например, через каждые 7 суток) на протяжении всего периода наблюдения за микрокосмами.

2. Оборудование и материалы

Элодея Канадская (*Elodea canadensis* Rich.), пресноводные двустворчатые моллюски *p. Unio* или *p. Anodonta*, культура *Daphnia magna* или *Ceriodaphnia*, раствор токсиканта в концентрации $2 \cdot LC_{50}$, стеклянные емкости объемом 5 литров – 5 шт., чашки Петри или химические пробирки из расчета – 3 шт (количество повторностей) для проб, взятых из одного варианта биокосмов, умноженные на количество вариантов биокосмов, полоски мельничного газа, химические пипетки на 10 мл, резиновая груша, химические стаканы на 200 мл для взвешивания, весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания 1000 г, люминостат, культивационная вода.

3. Формирование биокосмов (микрокосмов)

Исследования должны проводиться при стандартных условиях (t^0 воды, t^0 воздуха, освещенность, кислородный режим согласно п. 1.5).

Для создания искусственного водоема (биокоосма) стеклянные емкости объемом 5 литров заполняются культивационной (биологизированной) водой до отметки 4 литра и нумеруются с указанием варианта и даты формирования биокоосма. Для получения модельного раствора в пронумерованные емкости вносится токсическое вещество в одинаковом для всех вариантов (кроме контрольного – I В) количестве, соответствующем удвоенной медианной летальной концентрации ($2 \cdot LC_{50}$) (использовать маточные растворы токсиканта (п. 2.1.1.3). Биоконпоненты (гидробионты) вносятся в готовый раствор в зависимости от варианта биокоосма.

Варианты биокоосмов:

- I В.** - **Контроль** (биологизированная вода)
- II В.** - **раствор токсиканта**
- III В.** - **раствор токсиканта + макрофиты**
- IV В.** - **раствор токсиканта + моллюски**
- V В.** - **раствор токсиканта + макрофиты + моллюски**
- VI В.** - **Контроль + макрофиты**
- VII В.** - **Контроль + моллюски**
- VIII В.** - **Контроль + макрофиты + моллюски**

Компоненты среды вносятся из расчета нагрузки биомассы:

– моллюски (пресноводные двустворчатые моллюски – беззубка обыкновенная (*p. Anodonta*), перловица (*p. Unio*) – 20,0 г на 2 литра воды;

– макрофиты – элодея канадская (*Elodea canadensis Rich*) из расчета 5,0 г сырой массы на 2 литра воды.

Существуют другие варианты сочетаний биотических компонентов при формировании биокоосмов, например внесение грунта (из расчета 100 г на 2 литра воды), определенных видов рыб (при нагрузке ихтиомассы 2 г на 2 литра воды), а также различные сочетания отдельных компонентов.

4. Анализ проб воды биокоосмов с помощью дафниевого теста

Продолжительность экспозиции микрокоосмов может составлять в зависимости от задач исследования и выбора тест объекта от 15 – 30 до 60 суток. За этот период времени с определенными интервалами (2 – 4 и более суток, например: на 1, 7, 14 и 21-е сутки) производится отбор проб воды из каждого варианта биокоосмов для

определения степени токсичности модельных растворов в остром опыте на цериодафниях.

В качестве критерия токсичности в остром опыте принимается показатель выживаемости цериодафний в пробах тестируемого раствора каждого варианта водоемов за период острого опыта (48 часов для *Ceriodaphnia* и 96 часов для *D. magna*).

Показателем изменения качества воды в микрокосмах является повышение (или снижение) выживаемости цериодафний в пробах воды, взятых из биокосмов через определенные промежутки времени в течение всего периода наблюдения за водоемами.

Острые опыты на цериодафниях ставятся (см. п. 2.1.1.4) в пробирках или в чашках Петри. В каждую емкость наливается 15 мл пробы (исследуемого раствора из конкретного варианта микрокосмов). Опыт ставится в трех повторностях. В каждую повторность помещается по 10 рачков.

Первая серия проб отбирается в день формирования биокосмов (1-е сутки) и ставится дафниевый тест на 48 (96) часов. Затем отбор проб и постановка теста на рачках производится через равные промежутки времени, например через 4 или 7 суток, в зависимости от целей и продолжительности экспозиции водоемов.

Таким образом, биотестирование проб воды микрокосмов проводится по стандартной методике на цериодафниях (см. выше), основанной на определении выживаемости рачков в остром опыте, т.е. на определении среднего (из 3-х повторностей) числа выживших за время биотеста дафний в процентах от их исходного количества (или контроля). Например, через 48 часов в пробе воды, взятой на 8-е сутки из 2-го варианта биокосмов, из 10 дафний в первой повторности выжило 4 особи, во второй повторности - 5 особей, в третьей - 3 особи. Среднее (\bar{x}) – 4 особи, или 40% из 100%.

Результаты эксперимента по изучению влияния растительных и животных гидробионтов и их искусственных сообществ на процесс очищения воды микрокосмов от токсических веществ (по результатам биотестирования) заносятся в таблицу 6.

Образец заполнения таблицы 6 представлен в Приложении 7.

5. Анализ состояния гидробионтов

После отбора проб воды биокосмов на дафниевый тест производится анализ состояния макрофитов и моллюсков по изменению их массы в III, IV и V вариантах биокосмов. Для этого макрофиты

вынимаются из раствора и взвешиваются после отделения пожелтевших и погибших частей растения. Взвешивание осуществляется либо после обсушивания на фильтровальной бумаге, либо в стаканчике с раствором из соответствующего водоема. Результаты измерений заносятся в таблицу 7.

Таблица 6

**Результаты биотестирования проб воды биокосмов
за время экспозиции**

№ группы	Вид биокосма	Повторность	Забор пробы исследуемого раствора (сутки)/ Дата начала/окончания Дафниевого теста							
			1		7		14		21	
№ рабочей группы	Дата формирования биокосма	Результаты Дафниевого теста (через 48 /96 ч)								
		Жи- вые (экз.)	$M \pm m_M$	Жи- вые (экз.)	$M \pm m_M$	Жи- вые (экз.)	$M \pm m_M$	Жи- вые (экз.)	$M \pm m_M$	
		1								
		2								
		3								
Контроль		1								

Таблица 7

**Изменение веса (г) гидробионтов в процессе самоочищения
микрокосма от токсических веществ**

Вариант	Гидробионт	Сутки			
		1	7	14	21
III	макрофит				
IV	моллюск				
V	макрофит				
V	моллюск				

Изменение веса гидробионтов, так же как и выживаемость це-риодафний, является показателем снижения или увеличения токсичности растворов в процессе эксперимента (например, за счет утилизации вещества биообъектами).

Погибшие в ходе эксперимента компоненты биокосмов (моллюски, рыба, макрофиты и т.д.) заменяются живыми с указанием времени гибели, количества погибших особей и варианта биокосма, и производится дополнительный отбор проб воды на биотест для выявления возможности десорбции вещества из погибших гидробионтов в раствор (вторичное загрязнение).

6. Обработка результатов дафниевого теста

Обработка результатов производится методами вариационной статистики. Для этого рассчитывают:

M – среднее арифметическое показателей выживаемости из трех повторностей для каждой пробы исследуемой воды конкретного варианта биокосмов:

$$M = \frac{\sum x}{n},$$

где n – количество повторностей;

$\sum x$ – сумма отдельных вариантов;

x – (варианта) количество выживших дафний в одной повторности.

σ – среднее квадратичное (стандартное) отклонение от выборочной средней (среднего показателя выживаемости – M):

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n} - M^2};$$

m_M – средняя ошибка средней арифметической показателей выживаемости:

$$m_M = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}.$$

Образец статистической обработки результатов представлен в Приложении 8.

2.2.2. Анализ полученных результатов

По результатам дафниевого теста построить гистограмму (рис. 5), отражающую изменение токсичности растворов – по изменению выживаемости цериодафний ($M \pm m_M$), ось Y – под действием тех или иных факторов среды (абиотических и биотических) в каждом из вариантов биокосмов за время экспозиции, ось X. Например: на 21-е сутки в пробе из варианта I биокосмов (контроль) из 5 цериодафний выжило 5 в каждой повторности (т.е. среднее из 3-х повторностей $M = 5 \pm 0$), в пробе из варианта II биокосмов выжило $2 \pm 0,5$ цериодафний, в пробе из варианта V – $4,6 \pm 0,3$.

Проанализировать полученные результаты и гистограмму и сделать выводы о:

- персистентности исследуемого вещества в различных условиях среды,
- влиянии продолжительности экспозиции микрокосмов на детоксикацию растворов,
- токсичности исследуемой концентрации вещества для различных гидробионтов,
- роли биотических и абиотических факторов в процессах самоочищения водоемов от исследуемого токсического вещества.

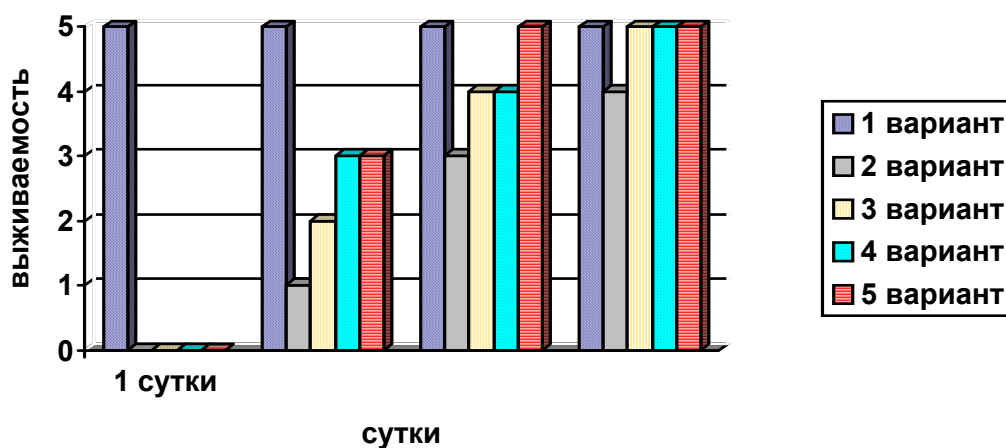


Рис. 5. Анализ изменения токсичности среды микрокосмов за период экспозиции по показателю выживаемости цериодафний

Литература

1. Виноградов, Г.А. Экспериментальная оценка экологического риска при загрязнении водной среды токсическими веществами. 3. Исследования на основе применения проточных экспериментальных экосистем / Г.А. Виноградов, А.К. Клерман // Водные ресурсы. 1999. – Т. 26, № 3. – С. 373 – 377.
2. ГОСТ Р 8.563-96 ГСИ Методики выполнения измерений.
3. ГОСТ 24481-80 Вода питьевая. Отбор проб.
4. ГОСТ 17.1.5.04-81 Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия.
5. ГОСТ 17.1.5.05-85 Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков.
6. Жмур, Н.С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний / Н.С. Жмур. – М. : АКВАРОС, 2001. – 52 с.
7. Методическое руководство к самостоятельной работе студентов 5-го курса факультета биологии в лаборатории водной токсикологии: Дафниевый тест / Сост. Т.В. Иваненко ; Яросл. гос. ун-т. – Ярославль, 1988. – 14 с.
8. Методическое руководство по биотестированию воды. РД 118-02-90. Москва, 1991 // Под ред. А.Н. Крайнюковой.
9. Методы биотестирования качества водной среды / Под ред. О.Ф. Филенко. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 124 с.
10. НВН 33-5.3.01-85 Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод.
11. Плохинский, Н.А. Математические методы в биологии. учебно-методическое пособие / Н.А. Плохинский. – М. : Изд-во МГУ, 1978. – 340 с.
12. СТ СЭВ 4710-84 Воды подземные. Общие требования к отбору проб.
13. Флеров, Б.А. Метод биотестирования природных и сточных вод с использованием рачка *Ceriodaphnia dubia* / Б.А. Флеров, Н.С. Жмур, М.Н. Очирова, И.В. Чалова // Методы биотестирования вод : сб. ст. / АН СССР. – Черноголовка, 1988. – С. 111 – 114.

Приложения

Приложение 1 (рекомендуемое)

Форма регистрации условий и результатов биотестирования в рабочем журнале

Таблица 8

1	Дата, время отбора проб	11 ³⁰ ч, 10 марта 1996 г.
2	Место отбора	Очистные сооружения г. Троицка. Очищенная сточная вода, выходящая из вторичного отстойника
3	Используемые тест-организмы, возраст	Цериодафнии, возраст менее 24 ч, разница между особями не более 8 ч
4	Место биотестирования и условия	Люминостат, $t = 19 - 24^{\circ}\text{C}$, фотопериод: 16 ч - световой, 8ч - ночной, освещенность искусственная (550 лк)
5	Время хранения пробы от отбора до начала биотестирования	4 ч
6	Режим кормления	0,2 см ³ суспензии водорослей <i>Chlorella</i> на 15 см ³ исследуемой воды ежедневно, в хроническом опыте дополнительно 1 раз в неделю 0,06 см ³ дрожжевой суспензии на 15 см ³ воды
7	Повторности для каждой концентрации	Десять
8	Смена растворов	В остром опыте растворы не менялись, в хроническом – смена растворов проводилась через 2 суток на третьи

9	Исследуемые концентрации сточных вод	3,12; 6,25; 12,5; 25; 100%
10	Соответствующая степень разбавления сточных вод по формуле: $x = \frac{100 \%}{\% . \text{сточной} . \text{воды} . \text{в.общем} . p - p_e}$	Разбавления в 32; 16; 8; 4; 1 (без разбавления) раз
11	t, pH, O ₂ ; в исследуемой воде	Все показатели в пределах, установленных в методике
12	Средняя летальная кратность разбавления в остром опыте ЛКР ₅₀₋₄₈	27,54%-ная концентрация сточных вод, или кратность разбавления в 3,63
13	Безвредное разбавление в остром опыте БР ₁₀₋₄₈	10%-ная концентрация сточных вод, или кратность разбавления в 10 раз
14	Кратность разбавления, вызывающая хроническую токсичность за 24 дня эксперимента	0,5%-ная концентрация сточных вод, или кратность разбавления в 200 раз
15	БКР, не вызывающая хроническую токсичность за 24 дня эксперимента	Не установлена
16	Данные гидрохимических анализов исследуемой воды	В приложении

**Форма записи результатов биотестирования
при определении острого токсического
действия воды на цериодафний**

Таблица 9

Вещество				Концентрация, мг/л				Дата опыта				Время от начала биотестирования, час				Количество выживших цериодафний, экз.				Процент к контролю (А)				Количество выживших цериодафний, экз.				Процент к контролю (А)				Острое токс. действие (есть/нет)				ЛТ ₅₀				ЛКр ₅₀₋₄₈				ЛКр ₀₋₄₈			
Контроль-ная вода				Тестируе-мая вода без разбав-ления				Повтор-ность				Повтор-ность				Тестируемая вода, разбав-ленная в n раз								Повторность																							
1	2	...	10	1	2	...	10	1	2	...	10	1	2	...	10	26	27	...	35																												

Примечание. Графы 38 – 40 заполняют в том случае, если определяют степень токсичности тестируемой воды.

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

Таблица 10

Концен- трация исследуе- мой воды	Время от начала биотестирования, сутки						
	Гибель цериодафний, %; число молоди в каждом стакане						
	1	2	3	4	5	6	7
100.00 %	70 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
50.00 %	10 %	60 %	70 %	70 %	70 %	70 %	80 %
25.00 %	10 %	10 %	30 %	30 %	40 %	40 %	40 %
12.50 %	0 %	0 %	0 %	0 %	10 %	10 %	10 % 1-2
6,25 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 % 3-6
3.12 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
				1-2	5-2	1-4	1-6 6-8
				1-4	6-2	3-2	2-4 7-2
				3-4	7-4	4-4	3-4 8-6
					8-6	5-6	4-2 9-7
					9-6	10-4	5-6 10-2
					10-2		
Контроль	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
				1-4	3-4	1-6	1-2 6-2
				2-6	4-4	2-8	2-2 7-7
				9-4	5-4	3-2	3-2 8-6
				10-2	6-2	4-2	4-2 9-8
					7-4	5-2	5-4 10-6
					8-2	6-2	

Примечание: Отмечается первой цифрой номер стакана, второй - количество молоди в этом стакане.

Приложение 4 (рекомендуемое)

**Общее количество родившейся молоди
в 7-дневном эксперименте**

Таблица 11

	<i>Концентрация сточной воды, %</i>			
	<i>12,5</i>	<i>6,25</i>	<i>3,12</i>	<i>контроль</i>
<i>№ ста- кана</i>	<i>Общее количество родившейся молоди по истечении 7 суток</i>			
1	2	0	12	12
2	0	0	8	16
3	0	6	10	8
4	0	0	6	8
5	0	0	14	10
6	0	0	10	6
7	0	0	6	11
8	0	0	12	8
9	0	0	13	12
10	0	0	8	8

Приложение 5 (рекомендуемое)

**Сводные результаты биотестирования
сточных вод для статистической обработки**

Таблица 12

<i>Концентрация сточных вод, %</i>	<i>Смертность цериодафний, %</i>	<i>Среднее число пометов на 1 самку</i>	<i>Среднее число родившейся молоди на 1 самку, экз.</i>
100,00	100	0	0
50,00	80	0	0
25,00	40	0	0
12,50	10	0,1	0,2
6,25	0	0,1	0,6
3.12	0	2,4	9,0
Контроль	0	2,6	9,9

Статистическая обработка результатов хронического эксперимента на церидафниях

По результатам экспериментов составляется сводная таблица, куда заносят все результаты биотестирования для статистической обработки (п. 1.8.2).

По результатам, полученным в каждой серии разбавлений и контроле, производят расчеты и строится таблица. В таблице 13 приведены расчеты для серии исследуемой концентрации сточных вод 6,25 % (табл. 11).

Таблица 13

i	x_i	$x - x_i$	$(x - x_i)^2$
1	0	0,6	0,36
2	0	0,6	0,36
3	6	-5,4	29,16
4	0	0,6	0,36
5	0	0,6	0,36
6	0	0,6	0,36
7	0	0,6	0,36
8	0	0,6	0,36
9	0	0,6	0,36
10	0	0,6	0,36
	$\sum_{i=1}^n x_i = 6$	$\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i) = 0^*$	$\sum_{i=1}^n (x - x_i)^2 = 32,67$

Сумма слагаемых третьего столбца всегда должна равняться нулю, что является проверкой правильности расчетов отклонений от среднего арифметического.

В первом столбце таблицы указывается i — номер стакана, во втором столбце x_i — количество молоди в i -ом стакане. Столбцы 3 и 4 рассчитываются. Определяется среднее арифметическое (\bar{x}) родившейся молоди на одну самку: $\sum_{i=1}^n x_i = 6$, поскольку $n = 10$, то

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{6}{10} = 0,6.$$

Сумма слагаемых четвертого столбца таблицы 13 используется при вычислении средне-квадратичных отклонений:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x)^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{32,67}{9}} = \sqrt{3,63} = 1,91.$$

Определяется ошибка среднего арифметического:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{1,91}{\sqrt{10}} = 0,60.$$

Итак, получили:

$$\bar{x}_i = 0,6; \sigma_1 = 1,91; m_1 = 0,60.$$

(Индекс 1 использован, чтобы показать, что мы рассмотрели тест 1).

Аналогичные расчеты выполняются с экспериментальными данными, полученными при исследовании 3,12 %-ной концентрации сточных вод (табл. 11), и заносятся в таблицу 14.

Таблица 14

i	x_i	$x - x_i$	$(x - x_i)^2$
1	12	-2,1	4,41
2	8	1,9	3,61
3	10	-0,1	0,01
4	6	3,9	15,21
5	14	-4,1	16,81
6	10	-0,1	0,01
7	6	3,9	15,21
8	12	-2,1	4,41
9	13	-3,1	9,61
10	8	1,9	3,61
	$\sum_{i=1}^n x_i = 99$	$\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i) = 0$	$\sum_{i=1}^n (x - x_i)^2 = 72,90$

Соответствующие таблице 11 среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение и ошибка среднего арифметического: $\bar{x}_2 = 9,9$; $\sigma_2 = 2,85$; $m_2 = 0,90$ (индекс 2 показывает, что полученные характеристики относятся к тесту 2).

Аналогичные расчеты для серии контроля приведены в таблице 15.

Таблица 15

i	x_i	$x - x_i$	$(x - x_i)^2$
1	12	-2,1	4,41
2	16	-6,1	37,21
3	8	1,9	3,61
4	8	1,9	3,61
5	10	-0,1	0,01
6	6	-3,9	15,21
7	11	-1,1	1,21
8	8	1,9	3,61
9	12	-2,1	4,41
10	8	1,9	3,61
	$\sum_{i=1}^n x_i = 99$	$\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i) = 0$	$\sum_{i=1}^n (x - x_i)^2 = 72,90$

$$\bar{x}_K = 9,9; \sigma_K = 2,92; m_K = 0,92.$$

Все рассчитанные величины (средние арифметические, среднеквадратичные отклонения и ошибки средних арифметических) отличаются от теста к тесту и от аналогичных характеристик в контрольных опытах.

Для того чтобы выявить, достоверны ли эти отличия или носят случайный характер, определяется достоверность полученных результатов.

Определим показатель достоверности:

$$t_d = \frac{\bar{x}_K - \bar{x}_T}{\sqrt{m_K^2 + m_T^2}}$$

В качестве \bar{x}_T и m_T следует взять \bar{x}_1 и m_1 , или же \bar{x}_2 и m_2 . Для каждой пары чисел рассчитать показатели достоверности t_{d1} и, соответственно, t_{d2} .

Согласно ранее полученным вычислениям $\bar{x}_K = 9,9$, $m_K = 0,92$.

$$\bar{x}_1 = 0,60; m_1 = 0,60,$$

$$\bar{x}_2 = 0,99; m_2 = 0,90.$$

Рассчитываются соответствующие показатели достоверности:

$$t_{д1} = \frac{\bar{x}_K - \bar{x}_1}{\sqrt{m_K^2 + m_1^2}} = \frac{9,9 - 0,6}{\sqrt{(0,92)^2 + (0,60)^2}} = \frac{9,3}{\sqrt{1,21}} = 8,45,$$

$$t_{д2} = \frac{\bar{x}_K - \bar{x}_2}{\sqrt{m_K^2 + m_2^2}} = \frac{9,9 - 9,9}{\sqrt{(0,92)^2 + (0,90)^2}} = 0.$$

Полученные величины сравниваются с критерием Стьюдента (табл. 4). Критерий Стьюдента при числе степеней свободы $f = 18$, найденный по таблице 4, составляет $t_{СТ} = 2,10$.

Поскольку $t_d > t_{СТ}$ в концентрации сточных вод 6,25 %, снижение плодovitости цериодафний в сравнении с контролем достоверно. Исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие.

Из неравенства $t_{д2} < t_{СТ}$ следует, что в концентрации сточных вод 3,12% снижение плодovitости в сравнении с контролем носит случайный характер. Исследуемая вода не оказывает хронического токсического действия на цериодафний.

Приложение 7 (образец)

**Результаты биотестирования проб воды
биоэкосмов за время экспозиции**

Таблица 16

№ группы ЭК-4(1)	Вариант биокосма V B	Повторность	Забор пробы исследуемого раствора (сутки)/ Дата начала/окончания Дафниевого теста							
			1	7		14		21		
			19-21.02.	25-27.02.		4-6.03.		11-13.03.		
			Результаты Дафниевого теста (через 48 ч)							
№ рабочей группы 3	Дата формиро- вания биокосма 19.02.05 г.		Жив	M±m _M	Жив	M±m _M	Жив	M±m _M	Жив	M±m _M
		1	2		2		4		5	
		2	2	2±0	1	2±0,5	3	4±0,5	4	4,6±0,3
		3	2		3		5		5	
Контроль		1	5	5±0	5	5±0	5	5±0	5	5±0

Статистическая обработка результатов экспериментов на биокосмах

Обработка результатов производится методами вариационной статистики. Для этого рассчитывают:

M – среднее арифметическое показателей выживаемости из трех повторностей для каждой пробы исследуемой воды конкретного варианта биокосмов:

$$M = \frac{\sum x}{n},$$

где n – количество повторностей;

$\sum x$ – сумма отдельных вариантов;

x – (варианта) количество выживших дафний в одной повторности.

Если количество выживших цериодафний в 1, 2 и 3-й повторностях составило

$$x_1 = 10,$$

$$x_2 = 9,$$

$$x_3 = 10,$$

$$n = 3,$$

$$\text{то } M = \frac{\sum x}{n} = \frac{10 + 9 + 10}{3} = \frac{29}{3} = 9,66,$$

σ – среднее квадратичное (стандартное) отклонение от выборочной средней (среднего показателя выживаемости – M):

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n} - M^2};$$

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum 10^2 + 9^2 + 10^2}{3} - 9,66^2} = \sqrt{\frac{281}{3} - 93,31} = \sqrt{93,66 - 93,31} = \sqrt{0,35} = 0,59;$$

m_M – средняя ошибка средней арифметической показателей выживаемости:

$$m_M = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad m_M = \pm \frac{0,59}{\sqrt{3}} = \pm \frac{0,59}{1,73} = \pm 0,34.$$

Следовательно, $M = 9,66 \pm 0,34$.

Содержание

Тема 1. Токсикологический контроль качества водной среды методами биотестирования.....	3
1.1. Метод определения токсичности водной среды по смертности и изменению плодовитости цериодафний	3
1.2. Назначение и область применения методики	3
1.3. Принцип методики.....	3
1.4. Характеристика тест-объекта	5
1.5. Условия проведения биотестирования	7
1.6. Подготовка к проведению биотестирования.....	7
1.6.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования	8
1.6.2. Подготовка культивационной воды	8
1.6.3. Получение исходного материала, транспортировка, содержание и кормление цериодафний, выращивание культуры.....	9
1.6.4. Подготовка корма и кормление.....	12
1.6.5. Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб воды.....	17
1.7. Процедура биотестирования.....	22
1.7.1. Эксперименты по установлению острого токсического действия.....	22
1.7.2. Эксперименты по установлению хронического токсического действия.....	24
1.8. Обработка, оценка и оформление результатов	27
1.8.1. Острые токсикологические эксперименты.....	27
1.8.2. Хронические токсикологические эксперименты	30
1.9. Контроль погрешности методики токсикологического анализа	33
1.9.1. Контроль качества оценки токсичности воды.....	33
1.9.2. Процедура определения диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант.....	33
1.10. Форма представления результата анализа.....	34

Тема 2. Экспериментальная оценка изменения качества среды в процессе самоочищения модельных водоемов от токсических веществ.....	35
2.1. Биотестирование модельного раствора токсиканта с использованием цериодафний	38
2.1.1. <i>Выявление летальных концентраций исследуемого вещества в остром опыте по показателю выживаемости Ceriodaphnia</i>	<i>39</i>
2.2. Выявление роли факторов среды в ПРОЦЕССАХ самоочищения модельных водоемов (микрокосмов) от токсических веществ методами биотестирования	44
2.2.1. <i>Выявление роли абиотических и биотических факторов в процессах детоксикации химических веществ в модельном эксперименте</i>	<i>44</i>
2.2.2. <i>Анализ полученных результатов</i>	<i>49</i>
Литература.....	50
Приложения	51

Учебное издание

Биотестирование

**Биологические методы определения
токсичности водной среды**

Составители: **Рябухина** Елена Валерьевна
Зарубин Сергей Леонидович

Редактор, корректор А.А. Антонова
Компьютерная верстка Е.Л. Шелеховой

Подписано в печать 22.05.2006 г. Формат 60х84/16.
Бумага тип. Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 2,5.
Тираж 100 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Отпечатано на ризографе.

Ярославский государственный университет.
150000 Ярославль, ул. Советская, 14.

Биотестирование

Биологические методы определения
токсичности водной среды

