



**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

БИОТЕСТИРОВАНИЕ

**Методические указания
по выполнению лабораторных работ
по профилю «Аквакультура»
направления подготовки 35.03.08
«Водные биоресурсы и аквакультура»**

Казань 2015

УДК 639.3
ББК 47.2
Б63

Б63 Биотестирование: методические указания по выполнению лабораторных работ / Сост.: С.Д. Борисова. – Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2015. – 64 с.

Приведены методические рекомендации по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Биотестирование».

Предназначены для студентов очной и заочной форм обучения по профилю «Аквакультура» направления подготовки 35.03.08 «Водные биоресурсы и аквакультура».

УДК 639.3
ББК 47.2

ВВЕДЕНИЕ

«Биотестирование» является учебной дисциплиной по выбору вариативной части профессионального цикла федерального государственного образовательного стандарта высшего профессионального образования.

Цель методических указаний по выполнению лабораторных работ состоит в том, чтобы заложить основы профессиональных знаний и навыков по:

- общим принципам биотестирования;
- использованию в контролируемых условиях биологических объектов в качестве средства выявления суммарной токсичности среды.

Задачами методических указаний являются изучение:

- требований к методам биотестирования;
- методик биотестирования вод;
- приемов использования тест-объектов и их тест-функций.

В процессе выполнения лабораторных работ у студентов формируются следующие **компетенции**:

- способность использовать профессиональные знания рыбоводства (аквакультуры);
- готовность использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа, логики и моделирования, теоретического и экспериментального исследования в информатике и гуманитарных науках;
- умение вести документацию полевых рыбохозяйственных наблюдений, экспериментальных и производственных работ;
- способность использовать современные информационные технологии; использовать сетевые компьютерные технологии и базы данных в своей предметной области;
- способность применять современные методы научных исследований в рыбоводстве (аквакультуре).

В результате выполнения лабораторных работ по дисциплине «Биотестирование» студент должен:

- **знать**: задачи и приемы биотестирования качества окружающей среды; требования к методам биотестирования; основные подходы биотестирования; современные методики биотестирования, применяемые в России и за рубежом;
- **уметь**: грамотно выбирать тест-объект в зависимости от поставленной задачи; использовать методики биотестирования окружающей среды;
- **владеть**: основными методиками биотестирования; информационными технологиями для обработки результатов биотестирования.

Биотестированием называется частный случай биоиндикации, когда у свободно живущих организмов, находящихся в стандартизованных условиях, исследуются повреждения или отклонения от нормы, вызванные воздействием неблагоприятных факторов (токсических веществ).

Так, например, при использовании в качестве биотеста люминисцентных бактерий снижение уровня их люминисценции на 50 % и более в опыте по сравнению с контролем через 30 минут после воздействия анализируемой пробой оценивается как токсическое воздействие пробы.

Также токсичной считается проба, если при использовании в качестве тест-объекта одноклеточных водорослей произошло снижение их численности на 50 % и более в опыте по сравнению с контролем за 72 часа биотестирования и т.д.

Предоставляя мало информации о природе токсического агента, биотестирование дает возможность с большой достоверностью определять степень общей токсичности объекта исследований. Методы биотестирования отличаются высокой чувствительностью и позволяют определять токсические вещества в концентрации до 10^{-8} %. Объектом исследований может быть любой объекты внешней среды (вода, почва), отходы промышленного производства и т.д.

Так, например, в связи с возрастающим антропогенным загрязнением воды на Земле возникает необходимость в экспресс-анализе ее качества. В настоящее время оценку качества воды, включающую содержание физиологически вредных примесей, принято контролировать дифференцированными химическими анализами, а пригодность – сравнением с существующими ГОСТами. Однако число известных токсикантов сейчас уже превысило 40000, а гостировано лишь около 1000. Все это ограничивает возможности применения химических способов исследования и делает систему биологического тестирования все более привлекательной.

Для интегральной оценки применяют различные биотесты, известно их более 100. В качестве тест-объектов используют представителей основных трофических звеньев водной экосистемы: бактерии, водоросли, простейшие, ракообразные, рыбы.

Лабораторная работа № 1.

Основные понятия, задачи и методы биотестирования

(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Научиться выбирать тест-объект в зависимости от задач биотестирования; познакомиться с основными методами биотестирования.

Оборудование и материалы

Методики биотестирования, нормативные документы.

Теоретическое введение

Биотестирование – оценка токсичности объекта внешней среды по его воздействию на биологическую тест-систему.

Тест-система – это пространственно ограниченная совокупность чувствительных элементов (тест-организмов) и среды, в которой они находятся. Тест-система может состоять из группы организмов одного вида сообщества нескольких биологических видов, целой экосистемы.

Тест-объект – организм, используемый при оценке токсичности химических веществ, природных и сточных вод, почв, донных отложений, кормов и др. Тест-объекты, по определению Л.П. Брагинского – «датчики» сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) водной среды («да» или «нет»), независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ, какой обычно представляют собой сточные воды. Тест-объекты с известной степенью приближения дают количественную оценку уровня токсичности загрязнения водной среды – сточных, сбросных, циркуляционных и природных вод.

Для биотестирования используются различные гидробионты – водоросли, микроорганизмы, беспозвоночные, рыбы. Наиболее популярные объекты – ювенальные формы планктонных ракообразных-фильтраторов *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*. Семидневный тест на суточной молоди цериодафнии *Ceriodaphnia affinis* позволяет за более короткий срок (7 суток), чем на *Daphnia magna* (21 сутки) дать заключение о хронической токсичности воды.

В результате воздействия токсического вещества тест-объект или вся тест-система претерпевает определенную деформацию, что проявляется в виде ряда реакций тест-системы на различных уровнях ее функционирования. Эти реакции различаются по чувствительности, скорости проявления, легкости наблюдения. Одну из этих реакций выбирают в качестве **тест-реакции** – закономерно возникающей ответной реакции тест-системы на воздействие комплекса внешних факторов, выбранных для анализа состояния этой системы. Степень проявления тест-реакции оценивается по **тест-критерию**. Это показатель, на основании которого производится оценка изменения тест-системы. По степени проявления тест-реакции судят о токсичности исследуемого образца.

Важное условие правильного проведения биотестирования – использование генетически однородных лабораторных культур, так как они проходят проверки чувствительности, содержатся в специальных, оговоренных стандартами лабораторных условиях, обеспечивающих необходимую сходимость и воспроизводимость результатов исследований, а также максимальную чувствительность к токсическим веществам.

Токскиты – новое поколение биотестов, разработанных в лаборатории экологической токсикологии и водной экологии Университета Гент (Бельгия) под руководством профессора Г. Персоне. Они предназначены для проведения исследований острой токсичности природных сред и содержат все необходимые материалы для выполнения биотестирования или экотоксикологических исследований (тест-организмы в анабиотическом состоянии, эфиппиумы дафний, покоящиеся яйца коловраток, яйца артемии, культуры водорослей).

Тест-функция – это жизненная функция или критерий токсичности, используемые в биотестировании для характеристики отклика тест-объекта на повреждающее действие среды. Тест-функции, используемые в качестве показателей биотестирования для различных объектов:

- для инфузорий, ракообразных, эмбриональных стадий моллюсков, рыб, насекомых – выживаемость (смертность) тест-организмов;
- для ракообразных, рыб, моллюсков – плодовитость, появление аномальных отклонений в раннем эмбриональном развитии организма, степень синхронности дробления яйцеклеток;
- для культур одноклеточных водорослей и инфузорий – гибель клеток, изменение (прирост или убыль) численности клеток в культуре, коэффициент деления клеток, средняя скорость роста, суточный прирост культуры;
- для растений – энергия прорастания семян, длина первичного корня и др.

Длительность биотестирования зависит от задачи, поставленной исследователем.

Острые биотесты, выполняемые на различных тест-объектах по показателям выживаемости, длятся от нескольких минут до 24–96 часов.

Краткосрочные хронические тесты длятся в течение 7 суток и заканчиваются, как правило, после получения первого поколения тест-объектов.

Хронические тесты на общую плодовитость ракообразных, охватывающие 3 поколения, длятся до рождения молоди в F3.

Токсический эффект – изменение любого показателя жизнедеятельности или функций организма под воздействием токсиканта. Зависит от особенностей яда, специфики метаболизма организма, факторов внешней среды (содержания кислорода, уровня рН, температуры и др.).

Токсичность – свойство химических веществ проявлять повреждающее или летальное действие на живые организмы. Вещество, оказывающее токсическое действие, называется токсикантом, а процесс воздействия токсиканта на организм – токсикацией (на экосистему – токсификацией). По Н.С. Строганову, количественно токсичность вещества для отдельного организма определяется как величина, обратная медианной летальной концентрации: $T = 1/LC50$.

Токсичность водной среды – токсичность воды и донных отложений для гидробионтов, возникающая вследствие появления в ней токсических веществ природного или антропогенного происхождения (ксенобиотиков), загрязнения сточными водами, токсическими атмосферными осадками и пр. При возникновении токсичности водной среды вода из среды, поддерживающей жизнь, становится средой, губительной для жизни. Степень токсичности водной среды оценивается методами биотестирования, а также по превышению ПДК (предельно допустимых концентраций).

Острая токсичность выражается в гибели отравленного организма за короткий промежуток времени – от нескольких секунд до 48 часов. Хроническая токсичность среды проявляется через некоторое время в виде нарушений жизненных функций организмов и возникновения патологических состояний (токсикозов). У водных организмов хроническая токсичность выражается в гонадотропном и эмбриотропном действии токсиканта, что приводит к нарушению плодовитости (продуктивности), эмбриогенеза и постэмбрионального развития, возникновению уродств (мутаций) в потомстве, сокращению продолжительности жизни, появлению «карликовых» форм.

Интегральная токсичность, по определению Л.П. Брагинского, токсичность сложных смесей, сточных вод, многокомпонентных факторов для водных организмов.

Количественно интегральная токсичность определяется как величина, обратная максимальному разведению (1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 и т.д.), при котором не наблюдается каких-либо нарушений жизненно важных функций тест-организмов при 24–48 часовом биотестировании.

Выражается в баллах токсичности (Бти) целыми числами (2, 5, 10, 50, 100 и т.д.) соответственно величинам разведения.

Баллы токсичности могут быть четко ранжированы и позволяют выстраивать ряд исследуемых веществ или вод по снижению (повышению) уровня их токсичности.

Основные методы биотестирования

1. Биохимический метод.

Стрессовое воздействие среды можно оценивать по эффективности биохимических реакций, уровню ферментативной активности и накоплению определенных продуктов обмена. Изменение содержания в организме определенных биохимических соединений, показателей базовых биохимических процессов и структуры ДНК в результате биохимических реакций могут обеспечить необходимую информацию о реакции организма в ответ на стрессовое воздействие.

Каждый физиологический процесс требует определенных затрат энергии, поэтому любое изменение физиологического состояния немедленно сказывается на энергетическом обмене. Биоэнергетические показатели живых систем позволяют выявлять последствия стрессового воздействия среды до наступления необратимых изменений в организме.

Количество энергии, необходимое организму в единицу времени для обеспечения всех физиологических процессов, характеризует интенсивность энергетического обмена. На реализацию одного и того же физиологического процесса в неблагоприятных условиях организму требуется больше энергии, чем в оптимальных, из-за необходимости компенсации неблагоприятных воздействий среды.

В процессе жизнедеятельности всех аэробных организмов в ходе нормальных реакций кислородного метаболизма образуются свободные радикалы. В норме уровень свободных радикалов регулируется системой антиоксидантной защиты клетки, так как эти радикалы и продукты их превращения представляют серьезную угрозу:

- подавляют активность ферментов;
- разрушают нуклеиновые кислоты;
- вызывают деградацию биополимеров;
- изменяют проницаемость мембран.

Тем не менее, свободные радикалы играют важную роль в окислительно-восстановительных биохимических реакциях. Таким образом, стрессовая реакция биотестов может быть измерена по изменению в них уровня свободных радикалов по сравнению с контролем. Известно, что быстрые изменения интенсивности реакций с участием свободных радикалов в живых объектах типичны для начальных стадий разных патологических состояний, в том числе для первичных процессов лучевого поражения.

2. Генетический подход.

Наличие и степень проявления генетических изменений характеризует мутагенную активность среды, а возможность сохранения генетических изменений в популяциях отражает эффективность функционирования иммунной системы организма.

В норме большинство генетических нарушений распознаются клеткой, например путем апоптоза за счет внутриклеточных систем или посредством иммунной системы. Достоверное превышение спонтанного уровня таких нарушений является индикатором стресса. Генетические изменения могут выявляться на генном, хромосомном и геномном уровнях.

Типы мутаций:

- генные (точковые) – замена оснований ДНК или вставка или выпадения нуклеотидов;
- хромосомные – нарушения структурных хромосом;
- геномные – изменение количества хромосом в ядре.

Для выявления канцерогенов и мутагенов применяются краткосрочные генетические тесты, где вместо цельного организма млекопитающего (опыты могут проходить 2–3 года) используют другие биологические системы.

Исследование генетических изменений как на генном, так и на хромосомном уровне можно проводить на растениях без использования сложного лабораторного оборудования, необходимого для постановки других тестов, что при некоторых обстоятельствах может оказаться большим преимуществом. Возможным недостатком этих тестов является существенное различие метаболизма растений и млекопитающих. Следовательно, в настоящее время, еще рано ставить вопрос о возможности достоверной экстраполяции на человека результатов, полученных в экспериментах на растениях.

3. Морфологический метод.

В условиях техногенного воздействия на природные экосистемы снижение численности популяций происходит в значительной мере за счет эмбриональной и личиночной смертности. Эмбрионы и личинки – наиболее чувствительны к повреждающим факторам фазы жизненного цикла гидробионтов. Воздействие на организм стрессирующих факторов приводит к отклонениям от нормального строения различных морфологических признаков.

В водоемах, в последнее время, катастрофически возрос процент уродливых личинок лягушек и жаб. Отмечено появление рыб с нарушениями эмбрионального морфогенеза, то есть с различными аномалиями (ассиметрия тела и т.д.).

Для диагностики воздействия загрязнений на морфологические характеристики применяются методы оценки флуктуирующей асимметрии.

Флуктуирующая асимметрия является результатом неспособности организмов развиваться по точно определенному плану. Ассиметрия – это один из общих онтогенетических показателей, характеризующих стабильность индивидуального развития, дающий оценку состояния природных популяций и зависящий от состояния среды.

4. Физиологический подход.

Одна из наиболее важных характеристик, высокочувствительная к стрессовому воздействию среды, это энергетика физиологических процессов. Наиболее экономичный энергетический обмен имеет место лишь при строго определенных условиях среды, которые могут быть охарактеризованы как оптимальные. Интенсивность энергетического обмена аэробного организма может быть определена посредством измерения скорости потребления кислорода. При оптимальных условиях организм находится на самом низком энергетическом уровне, при любых негативных изменениях среды обитания потребность в кислороде будет увеличена.

Для характеристик энергетического обмена две величины являются фундаментальными:

- основной обмен – отражает минимальный уровень потребления энергии, необходимый для обеспечения нормального функционирования организма при отсутствии каких-либо внешних воздействий;
- максимальный обмен – соответствует предельному количеству энергии, которое организм способен выработать в случае необходимости.

Разность между этими величинами – это энергетический ресурс адаптации конкретного вида.

Другая базовая характеристика, перспективная для оценки стрессовых воздействий – темп и ритмика ростовых процессов.

Важной характеристикой физиологических процессов является поведенческая активность живых организмов.

В качестве тест-функций применяются физиологические параметры пресноводных беспозвоночных гидробионтов разных уровней филогенеза.

5. Биофизический подход.

Биофизические методы контроля качества среды всегда основаны на инструментальном определении нарушений биохимических и биофизических процессов тест-организмов. Одни из них регистрируют изменения функций мембранных структур клеток, другие оценивают показатели электропроводности тканей, третьи – способность генерировать электрические потенциалы и т.д.

Для контроля состояния важнейших функциональных систем организмов наибольшее распространение получили люминисцентные и флуориметрические методы. Они обладают высокой чувствительностью, позволяют проводить количественные измерения в режиме реального времени, а в ряде случаев и автоматизировать процесс измерения.

6. Иммунологический метод.

В дополнении к цитогенетическому подходу, характеризующему эффективность иммунной системы организма в отношении элиминации клеток с генетическими нарушениями, возможны развернутая оценка изменений иммунореактивности животного, исследование параметров иммунитета, таких как состав крови и гемолимфы, определение наличия антител в жидкостях организма, концентрации белков плазмы, перивисцеральной жидкости и гемолимфы, оценки динамики клеточного состава.

Иммунологический подход при оценке состояния окружающей среды заключается в изучении изменений врожденного и приобретенного иммунитета у беспозвоночных и позвоночных животных.

Предлагается использовать параметры иммунитета животных как критерий состояния организмов, их популяций и сообществ экосистем в норме и при техногенном воздействии.

Рабочее задание

1. Сделайте краткий конспект теоретической части.
2. Выделите из текстовой части основные термины. Выучить их.
3. Решите следующие задачи:

3.1. Укажите тест – объект, который необходимо использовать при оценке уровня загрязнения воздуха. Этот тест-объект представляет собой своеобразный симбиотический организм, слоевище которого образовано грибом и водорослью. Какие тест-функции организма, по вашему мнению используются при биотестировании атмосферного воздуха?

3.2. Сосна – это тест-объект для экспресс-оценки качества воздуха. Какой показатель используется в качестве тест-функции? Какой метод биотестирования используется в данном случае?

3.3. Для оценки качества среды использовались рыбы и лягушки. После отлова со всех рыб и лягушек сняли 5 признаков с левой и правой сторон, данные занесли в таблицу. После этого оценили сходство признаков и дали оценку качеству среды. Какой метод биотестирования при этом использовался? Ответ обоснуйте.

3.4. Назовите тест-объект, с помощью которого возможна оценка трофических свойств водоема. Этот тест-объект – наименее изученное звено среди организмов-индикаторов, хотя является весьма удобным для наблюдения, также дает возможность в первом приближении визуально оценить экологическое состояние водоема. Назовите методы биотестирования, которые могут быть применимы к этому тест-объекту. Ответы поясните.

3.5. Проба воды отобрана в понедельник. В среду утром необходимо дать оценку воде: токсична она или нет. Какой вид токсикологического эксперимента Вы предлагаете? Какой тест-объект можно использовать?

3.6. К какому методу биотестирования относится микробиологический метод оценки состояния водных биоценозов?

3.7. Какой метод биотестирования необходимо использовать при определении эмбриотоксичности воды, то есть при исследовании нарушений развития эмбрионов водных животных и применении при этом метаболического критерия?

3.8. Биотестирование проводилось в лаборатории, где рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение частот нарушений в волосках тычинок, потерю репродуктивной способности клеток. Какой тест-объект при этом использовался? Какой метод биотестирования применялся?

3.9. Биотестирование загрязнения воды проводится с помощью ряски. Какие тест-функции ряски могут использоваться? Какой метод биотестирования применяется?

3.10. Дайте название описанной ниже методике.

Биотестирование проводится на моллюсках, которые в процессе фильтрации извлекают из воды одноклеточные организмы, что ведет к снижению оптической плотности воды в сосуде с моллюсками.

3.11. Из приведенных ниже слов составьте название методики биотестирования:

1) активность – оценка – веществ – опасности – химических – потенциальной – их – по – снижать – гидробионтов – фильтрационную – снижать;

2) воздействие – исследование – врожденного – параметров – иммунитета – животных – в – ответ – беспозвоночных – неблагоприятное – на;

3) окружающей – транскация – использование – мутагенного – для – действия – токсического – и – факторов – среды – оценки.

4. Рассмотрите представленные на кафедре тест-объекты, определить какие тест-функции используются при биотестировании. Определить методы биотестирования, применяемые в лаборатории кафедры.

5. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест – объекта и методики биотестирования.
3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение следующим понятиям: «биотестирование», «тест-объект», «тест-функция», «токситы», «токсичность».
2. Перечислите основные методы и подходы биотестирования.
3. Как выполняются острые биотесты?
4. Как выполняются хронические биотесты?

Рекомендуемая литература

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288с.

2. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.

3. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.
4. Егорова Е.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: учеб. пособие / Е.И. Егорова. – Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 84 с.
5. Израэль Ю.А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю.А. Израэль. – Л.: Гидрометеоиздат, 2007. – 190 с.
6. Латенков В.П. Основы токсикологии для безопасности жизни и деятельности / В.П. Латенков, Л.Н. Скипин. – Тюмень: ТюмГУ, 2003. – 189 с.
7. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова. – М.: Академия, 2007. – 288 с.
8. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова, Е.И. Сарапульцева. – М.: Академия, 2010. – 288 с.

Лабораторная работа № 2.
Методика биотестирования по снижению уровня
биолюминесценции бактерий
(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Изучить методику биотестирования, где тест-объектом являются бактерии, а тест-функцией – их уровень люминесценции.

Оборудование и материалы

Биолюминометр с набором кювет; холодильник, обеспечивающий температуру от минус 15 до плюс 6 °С; дозаторы пипеточные вместимостью 20–1000 мм³; термометр; колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм³; цилиндры мерные вместимостью 10 см³; бумага фильтровальная; вода дистиллированная.

Теоретическое введение

Методика основана на установлении различия между уровнем люминесценции бактерий, помещенных в анализируемую пробу (опыт), и уровнем люминесценции бактерий, помещенных в 3 %-ный раствор натрия хлористого для биотестирования пресных вод или в морскую воду без токсических веществ (природную или искусственную) для биотестирования морских вод (контроль).

Критерием токсичности является снижение уровня люминесценции бактерий на 50 % и более в опыте по сравнению с контролем в течение 30 минут.

Люминесценцию бактерий измеряют при помощи специального прибора – биолюминометра и выражают в условных единицах.

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью $P = 0,95$, составляют ± 40 %.

Ход работы

Биотестирование проводят в помещении без вредных испарений и газов при температуре 20 ± 4 °С.

Объем пробы воды (водной вытяжки) для определения токсичности должен быть не менее 100 см³.

Для обеспечения оптимальных условий свечения бактерий в анализируемую пробу воды (водную вытяжку из донных отложений, в том числе морских) вносят навеску натрия хлористого в таком количестве, чтобы его концентрация в растворе составила 3 %.

Для контроля и приготовления разбавлений проб воды (водной вытяжки) используют 3 %-ный раствор натрия хлористого в дистиллированной воде.

Для биотестирования используют лиофилизированную культуру светящихся бактерий – *Photobacterium phosphoreum*(Cohn) Ford, которая поставляется в комплекте с биолюминометром. При хранении в морозильной камере холодильника в запаянных ампулах при температуре минус 15 °С культура пригодна для биотестирования в течение года.

До начала биотестирования флакон с охлажденной лиофилизированной культурой бактерий выдерживают в течение 30–40 минут при температуре $(20 \pm 4)^\circ\text{C}$.

Во флакон с культурой, объем которого составляет 10 см^3 , наливают 2 см^3 1,5 %-ного раствора натрия хлористого и содержимое флакона тщательно перемешивают. Этого объема полученной суспензии бактерий достаточно для 100 измерений.

Суспензию бактерий выдерживают при температуре $(20 \pm 4)^\circ\text{C}$ в течение 45 мин с целью ее реактивации и стабилизации люминесценции бактерий.

Для сохранения активности суспензию бактерий помещают в ледяную баню.

При биотестирования выполняют следующие операции:

- в три контрольные кюветы наливают по 1 см^3 3 %-ного раствора натрия хлористого (морской воды природной или синтетической);
- в три другие кюветы (опыт) наливают по 1 см^3 анализируемой пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ);
- в каждую кювету прибавляют по 20 мм^3 суспензии бактерий;
- содержимое кювет тщательно перемешивают;
- кюветы помещают в биолюминометр и через 30 минут измеряют уровень люминесценции суспензии бактерий в условных единицах.

На основании результатов трех параллельных определений люминесценции бактерий в контроле и опыте находят среднее арифметическое уровней люминесценции бактерий в контроле (X_k) и в опыте (X_{on}).

$$X_k = \frac{\sum_{i=1}^I X_{ki}}{I} \cdot 100,$$

$$X_k = \frac{\sum_{i=1}^I X_{on}}{I} \cdot 100,$$

где X_k , X_{on} , – результат i -го измерения уровня люминесценции бактерий в контроле и опыте соответственно;

i – номер измерения уровня люминесценции бактерий в контроле (опыте);

$$i = 1, \dots, I;$$

I – количество параллельных измерений уровня люминесценции бактерий в контроле (опыте); $I = 3$.

Снижение уровня люминесценции бактерий в опыте по сравнению с контролем (P) рассчитывают в процентах по формуле:

$$P = \frac{X_k - X_{on}}{X_k} \cdot 100$$

Вывод о наличии или отсутствии токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины P . Проба воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) считается токсичной, если величина P составляет 50 % и более. В этом случае для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки) устанавливают ее среднее эффективное разбавление –ЭР₅₀.

Рабочее задание

1. Составьте схему проведения эксперимента.
2. Проанализируйте научные статьи и патентные исследования в области применения бактерий для биотестирования.
3. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Анализ научных статей и патентов.
4. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования, где тест-объектом являются бактерии.
3. Проводятся ли в настоящее время экспериментальные исследования определения токсичности почв на бактериях?
4. Какие патентные разработки вы анализировали по данной тематике?
5. Какое оборудование необходимо для проведения биотестирования на бактериях?

Рекомендуемая литература

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288 с.
2. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.
3. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.
4. Егорова Е.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: учеб. пособие / Е.И. Егорова. – Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 84 с.
5. Израэль Ю.А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю.А. Израэль. – Л.: Гидрометеиздат, 2007. – 190 с.
6. Латенков В.П. Основы токсикологии для безопасности жизни и деятельности / В.П. Латенков, Л.Н. Скипин. – Тюмень: ТюмГУ, 2003. – 189 с.
7. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова. – М.: Академия, 2007. – 288 с.

Лабораторная работа № 3.
Методика биотестирования по снижению прироста
количества инфузорий
(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Изучить методику биотестирования, где тест-объектом являются инфузории, а тест-функцией – их прирост.

Оборудование и материалы

Весы лабораторные, микроскоп, стерилизатор, термометр, термостат, центрифуга, шкаф сушильный, камера Горяева, колбы плоскодонные, колбы мерные, пробирки, пипетки, бумага фильтровальная.

Теоретическое введение

Методика определения токсичности основана на установлении различия между количеством инфузорий в анализируемой пробе (опыт) и количеством инфузорий в 0,1 % растворе натрия хлористого (контроль).

Критерием токсичности является достоверное снижение коэффициента прироста инфузорий в опыте по сравнению с контролем за 24 часа (условно «острая токсичность») и 96 часов (условно «хроническая токсичность») биотестирования.

Биотестирование проводят в помещении безвредных испарений и газов при температуре воздуха $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Объем пробы воды (водной вытяжки) для определения токсичности должен быть не менее 100 см^3 .

Для контроля и приготовления разбавлений проб воды (водной вытяжки) используют 0,1 % раствор натрия хлористого в дистиллированной воде.

Результаты биотестирования учитывают, если ЭК₅₀ за 24 часа калия двухромовокислого ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) для культуры инфузорий находилась в диапазоне его концентраций $0,1\text{--}0,5 \text{ мг/дм}^3$.

Для биотестирования используют лабораторную культуру инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff.

Культивируют инфузорий в стерильных условиях в пробирках в термостате. Тщательно вымытые и высушенные пробирки предварительно стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 2 часов с момента достижения указанной температуры.

Перед стерилизацией пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и заворачивают в бумагу. Пипетки для посева инфузорий стерилизуют так же, предварительно завернув в бумагу. Инфузорий культивируют на питательной среде следующего состава:

- глюкоза – $5,0 \text{ г/дм}^3$ дистиллированной воды;
- пептон бактериальный – $20,0 \text{ г/дм}^3$ дистиллированной воды;
- натрий хлористый – $1,0 \text{ г/дм}^3$ дистиллированной воды;
- дрожжевой экстракт – $1,0 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ дистиллированной воды.

Для биотестирования используют 3-суточную культуру инфузорий, выращенную на питательной среде. Плотность суспензии клеток в культуре должна составлять $(6-8 \cdot 10^4)$ кл/см³.

Ход работы

В три пробирки вместимостью 10–15 см³ наливают по 5 см³ пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) – это опытные пробирки. Другие три пробирки заполняют таким же объемом 0,1 % раствора натрия хлористого – это контроль.

В каждую из опытных и контрольных пробирок капиллярной пипеткой добавляют 0,04 см³ (2 капли) 3-х суточной культуры инфузорий и считают исходное количество клеток в контроле и опыте.

Подсчет инфузорий проводят под микроскопом в камере Горяева. Можно использовать гемоцитометр или любой другой прибор для подсчета частиц. Подсчет инфузорий в камере Горяева выполняют в следующей последовательности. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, продувая воздух через пипетку. Этой же пипеткой отбирают суспензию инфузорий из пробирки, наносят по одной капле на сетки в счетной камере и фиксируют клетки 5 %-м спиртовым раствором йода. Для этого конец стеклянной палочки смачивают раствором йода и затем касаются им капле суспензии на сетках камеры. Затем камеру накрывают покровным стеклом, которое притирают по бокам до появления колец интерференции. Через 1–2 минуты начинают подсчет инфузорий в пяти больших (или восьмидесяти малых квадратах), расположенных по диагонали сетки счетной камеры. Из каждой контрольной и опытной пробирки подсчитывают не менее трех капель.

После определения исходного количества инфузорий пробирки помещают в термостат при температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Биотестирование может длиться 24 или 96 часов. В конце биотестирования подсчитывают количество инфузорий в контроле и опыте.

На основании результатов подсчета клеток в каждой капле определяют количество инфузорий (кл/см³) в контроле и опыте по формуле:

$$X_{k(on)ij} = \frac{m_{k(on)ij}}{nV} \cdot 1000,$$

где $m_{k(on)ij}$ – количество подсчитанных инфузорий в камере в контроле (опыте) для i -той капли и j -го параллельного определения;

i – номер капли суспензии;

j – номер параллельного определения;

V – объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата;

n – количество подсчитанных квадратов.

Для каждого параллельного определения в опыте и контроле выявляют среднее арифметическое количества инфузорий в 1 см³ по формуле:

$$X_{k(on)j} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)ij}}{I},$$

где I – количество капель суспензии.

Для определения токсичности пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) рассчитывают для каждого параллельного определения коэффициент прироста инфузорий в контроле и опыте по формуле:

$$K_{k(on)j} = \frac{X_{k(on)j}(t)}{X_{k(on)j}(0)},$$

где $X_{k(on)j}(t)$ – количество инфузорий в j -ом параллельном определении в контроле (опыте) через промежуток времени t , кл/см³;

$X_{k(on)j}(0)$ – исходное количество инфузорий в j -ом параллельном определении в контроле (опыте), кл/см³.

Вывод о наличии или отсутствии токсичности пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании установления достоверности снижения коэффициента прироста инфузорий в опыте по сравнению с контролем.

Для этого рассчитывают среднее арифметическое коэффициентов прироста инфузорий в опыте и контроле, среднее квадратическое отклонение коэффициентов прироста, ошибку среднего арифметического, критерий достоверности.

Среднее арифметическое коэффициентов прироста инфузорий определяют по формуле:

$$K_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^J K_{k(on)j}}{J},$$

где J – количество параллельных определений, $J = 3$.

Среднее квадратическое отклонение коэффициентов прироста инфузорий в контроле (опыте) определяют по формуле:

$$S_{k(on)} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J (K_{k(on)j} - K_{k(on)})^2}{J-1}}.$$

Ошибку среднего арифметического коэффициентов прироста инфузорий в контроле (опыте) определяют по формуле:

$$\bar{S}_{k(on)} = \frac{S_{k(on)}}{\sqrt{J}}.$$

Критерий достоверности (t_d) различия между коэффициентами прироста инфузорий в опыте и контроле определяют по формуле:

$$t = \frac{K_{(on)} - K_k}{\sqrt{S_{(on)}^2 + S_k^2}}.$$

Рассчитанную величину t сравнивают со значением критерия Стьюдента (t_{st}) для уровня значимости 5 % и степени свободы $f = 2(J - 1) = 4$, ($t_f = 4 = 2,78$). Если рассчитанная величина t больше значения критерия Стьюдента или равна ему, то различие между коэффициентами и прироста в опыте и контроле достоверно. В этом случае считают, что анализируемая проба воды (водная вытяжка) или раствор вещества (смеси веществ) токсична (токсичен).

Для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки) устанавливают ее эффективное разбавление (ЭР), то есть максимальное разбавление, при котором наблюдается достоверное различие между коэффициентами прироста инфузорий в контроле и опыте за 24 или 96 ч биотестирования (ЭР за 24 ч или ЭР за 96 ч).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают эффективную концентрацию (ЭК) вещества (смеси веществ), то есть минимальную концентрацию, при которой наблюдается достоверное различие коэффициентов прироста количества инфузорий в контроле и опыте за 24 или 96 часов биотестирования (ЭК за 24 часа или ЭК за 96 часов).

Рабочее задание

1. Составьте схему проведения эксперимента.
2. Поставьте биотоксикологический эксперимент по определению токсичности сточной воды.
3. Проанализируйте результаты.
4. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования, где тест-объектом являются инфузории.
3. Как обрабатываются результаты биотестирования на инфузориях?
4. Как подготовить тест-объект к биотесту?
5. Какое оборудование необходимо для проведения биотестирования на инфузориях?

Рекомендуемая литература

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288с.

2. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.

3. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.

4. Егорова Е.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: учеб. пособие / Е.И. Егорова. – Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 84 с.

5. Израэль Ю.А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю.А. Израэль. – Л.: Гидрометеоиздат, 2007. – 190 с.

6. Латенков В.П. Основы токсикологии для безопасности жизни и деятельности / В.П. Латенков, Л.Н. Скипин. – Тюмень: ТюмГУ, 2003. – 189с.

7. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова. – М.: Академия, 2007. – 288 с.

Лабораторная работа № 4.

Определение токсичности воды

по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла

(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Познакомиться с методикой биотестирования, где тест-объектом является хлорелла, провести острый токсический эксперимент и определить токсичность сточной воды.

Оборудование и материалы

Культиватор КВ-05, прозрачная бутылка, среда Тамия, измеритель оптической плотности ИПС-05, многоцветный культиватор КВМ-05, флаконы.

Теоретическое введение

Для определения токсичности сточной воды применяется «Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла» ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04.

Методика определения острой токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности тест-культуры зеленой протококковой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) в лабораторных условиях. Оптическая плотность тест-культуры водоросли после 22 часов роста измеряется с помощью фотоэлектроколориметра или спектрофотометра в красной области спектра.

Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и тестируемых проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов (опыт), в которых эти вещества могут присутствовать. Измерение оптической плотности суспензии водоросли позволяет оперативно контролировать изменение численности клеток в контрольном и опытном вариантах острого токсикологического эксперимента, проводимого в специализированном многоцветном культиваторе. Критерием токсичности воды является снижение на 20 %

и более (подавление роста) или увеличение на 30 % и более (стимуляция роста) величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течении 22 часов на тестируемой воде по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде.

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают токсичную концентрацию отдельных веществ или токсичную кратность разбавления вод и водных вытяжек, содержащих смеси веществ, вызывающие снижение на 20 % и более или увеличение на 30 % и более величины оптической плотности тест-культуры водоросли по сравнению с контролем за 22 часа световой экспозиции.

Контроль качества оценки токсичности воды проводится один раз в квартал. Он осуществляется посредством определения чувствительности используемого тест-организма (водоросли хлорелла) к «эталонному» токсиканту – сульфату кадмия ($\text{CdSO}_4 \times 8 \text{H}_2\text{O}$). При хорошем состоянии культуры водоросли и правильно поставленном эксперименте после 22 часов культивирования 50 % подавление прироста по сравнению с контролем должно наблюдаться в диапазоне концентраций сульфата кадмия 0,06–0,24 мг/дм³. При этом оптическая плотность культуры водоросли в контрольном варианте за этот период должна достигнуть величины $0,15 \pm 0,03$.

Это же показатель может быть использован для текущего контроля состояния тест-культуры водоросли.

Выращивание культуры водоросли производится в культиваторе КВ-05. В качестве реактора используется прозрачная бутылка из бесцветного стекла емкостью 400 см³, широко используемая в медицине при переливании препаратов. В реактор заливается суспензия водоросли в объеме 150 ± 10 см³. Для обеспечения углекислым газом емкость с суспензией непрерывно вращается вокруг своей продольной оси. Благодаря этому поддерживается близкое к равновесному содержание CO_2 в культуральной среде за счет активного растворения содержащейся в воздухе углекислоты.

В процессе культивирования суспензия водоросли облучается светом лампы накаливания 40 Вт, 220 В, установленной в приборе над реактором. Постоянная температура среды, равная $36,0 \pm 0,5$ °С, поддерживается автоматическим включением и выключением встроенного вентилятора по команде блока термостабилизации прибора.

Культура водоросли выращивается на 50 % питательной среде Тамия, состав которой представлен в таблице. Питательная среда и растворы всех солей готовятся на дистиллированной воде. Для избежания образования

осадка навеску каждого вещества сначала растворяют в небольшом количестве воды (50–100 см³), а затем растворы сливают вместе в указанной последовательности и доливают воду до объема 1 дм³.

Засев водоросли в культиватор КВ-05 производится с начальной оптической плотностью $0,020 \pm 0,002$ (кювета 1 см, $\lambda = 670$ нм). Для этого в 135 ± 10 см³ 50 % питательной среды вносится 15 ± 1 см³ суспензия водоросли с оптической плотностью $0,220 \pm 0,020$, профильтрованной через 3-4 слоя марли. Культура выращивается в полустационарном режиме, который достигается ее ежедневным пересевом в свежую среду. Такой режим культивирования позволяет без соблюдения условий стерильности поддерживать альгологически чистую культуру водоросли. При перерывах в работе свежевывращенную культуру водоросли можно хранить в холодильнике при температуре 2–4 °С в течение 2-4 месяцев. При возобновлении работ по биотестированию хранящуюся культуру водоросли следует активировать одни сутки в культиваторе КВ-05, как указано выше.

В качестве тест-организма используется термофильный штамм одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer.

Отдел:	Chlorophyta
Класс:	Euchlorophyceae
Порядок:	Chlorococcales
Семейство:	Chlorellaceae
Подсемейство:	Chlorelloideae
род:	Chlorella Beijer
вид:	Chlorella vulgaris Beijer

Это широко распространенная одноклеточная зеленая водоросль. Клетки шаровидные или эллиптические диаметром 2–10 мкм (иногда больше), с тонкой оболочкой без слизи, одним или двумя ядрами и одним чашеобразным хлоропластом. Размножение бесполое – автоспорами, образующимися в результате деления содержимого материнской клетки. Количество автоспор от 2 до 32 в зависимости от условий выращивания. Деление происходит, как правило, один раз в сутки, однако в условиях интенсивной культуры она способна и к более активному размножению (4–6 делений в сутки). В таких условиях регулярно пересеваемая культура водоросли хлорелла за счет опережающего роста ее клеток может на протяжении длительного времени сохраняться альгологически чистой без применения специальных приемов очистки и стерилизации.

Ход работы

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 с окружающих предметов или среды в исследуемую воду или в водные вытяжки из почв, осадков сточных вод и отходов.

Перед биотестированием культура водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенная на 50 % среде Тамия в культиваторе КВ-05, профильтровывается через 4 слоя марли и разбавляется до оптической плотности $0,125 \pm 0,005$ (кювета 1 см^3) 50 % средой Тамия. Измерение оптической плотности культуры тест-объекта проводится с помощью измерителя оптической плотности ИПС-05 или аналогичного в кювете толщиной 1 см^3 , при длине волны 670 нм. Поскольку суспензия культуры водоросли, наряду с прямым поглощением света, обладает свойством его ослабления в результате светорассеивания, то устанавливать кювету в фотокалориметр или спектрофотометр надо всегда в одном и том же месте, наиболее удаленном от светоприемного блока прибора. В этом случае между величиной оптической плотности и количеством клеток в суспензии водоросли будет прямопропорциональная зависимость. Линейная зависимость сохраняется в диапазоне значений оптической плотности 0,000–0,350. Если накопительная культура, выращенная в культиваторе КВ-05, имеет большую плотность, то ее сначала следует разбавить 50 % средой Тамия до указанного диапазона, а затем, разделив на величину 0,125, определить степень ее дальнейшего разбавления для получения культуры водоросли с требуемой для засева в тестируемую воду оптической плотностью ($0,125 \pm 0,005$).

Общий объем засеваемой суспензии водоросли данной плотности должен быть не менее 20 см^3 на каждый используемый в работе многокюветный культиватор КВМ-05. Если одновременно планируется проведение биотестирования нескольких проб воды, то количество культиваторов КВМ-05 должно соответствовать их числу, а объем тест-культуры водоросли необходимо увеличить кратно числу анализируемых проб воды.

Приготовленная тест-культура водоросли вносится по 2 см^3 в 6 приготовленных стаканов с 48 см^3 контрольной и тестируемых проб. При этом в результате 25-кратного разбавления засеваемой культуры содержание элементов питания в тестируемой воде, необходимых для обеспечения роста клеток водоросли, будет соответствовать 2 % среде Тамия, а исходная оптическая плотность тест-культуры водоросли будет равна 0,005.

Для биотестирования используют альгологически чистую культуру водорослей *Chlorella vulgaris* Beijer, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (через одни сутки после пересева в культиватор KB-05). Для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей пересев осуществляется ежедневно.

В 24 чистых флакона-реактора вносят: в первые четыре по 6 см^3 приготовленной согласно тест-культуры водоросли с контрольной пробой, а в остальные – по 6 см^3 и также в четырех повторностях все 5 приготовленных для биотестирования вариантов тестируемой пробы.

Ростовые характеристики культуры водоросли хлорелла определяются в многокуветном культиваторе KBM-5. Прибор позволяет в одинаковых и контролируемых условиях по температуре, интенсивности света, снабжению CO_2 (0,03 %) и перемешиванию одновременно выращивать 24 пробы культуры водорослей. При оптимальном режиме ($T = 35\text{--}36 \text{ }^\circ\text{C}$, средней интенсивность света – 60 Вт/м^2) увеличение оптической плотности контрольной культуры водоросли и, следовательно, численности клеток за 22 часа составляет 25–35 раз ($D_{\text{конечная}} = 0,150 \pm 0,03$). Таким образом, за это время действия загрязняющих веществ проб проявится примерно в пяти поколениях клеток водоросли.

Все 24 заправленных флакона закрываются чистыми полиэтиленовыми пробками, в которых для обеспечения оптимального газообмена со средой и предотвращения излишнего испарения культуральной жидкости сделаны отверстия диаметром 6 мм. Перед использованием пробки необходимо залить кипящей водой, выдержать в ней 10 минут, а затем, слив воду, просушить. После этого флаконы с пробками строго по вариантам устанавливаются в предварительно включенный в сеть культиватор KBM-05. Флаконы устанавливаются в приостановленную кассету по ходу ее вращения, т.е. против часовой стрелки. В конце первого часа эксперимента после стабилизации температуры во флаконах проверяется ее значение в контрольном варианте. Для этого термометр вводится через отверстие в пробке внутрь одного из контрольных флаконов. Чтобы точнее и быстрее произвести замер температуры необходимо сделать несколько помешивающих движений в измеряемой среде. Если температура оказалась ниже или выше рекомендованной ($36 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$), то прибор необходимо настроить на поддержание требуемой температуры с помощью регулятора, имеющего выход на боковую стенку прибора. Измерение температуры надо проводить в одном и том же флаконе, не выключая сам культиватор.

Через 22 часа культивирования выключить культиватор КВМ-05 из сети и провести измерение оптической плотности суспензии водоросли во всех флаконах. Для этого флаконы надо извлечь из культиватора и установить в штатив. Затем, вынув пробки и последовательно переливая содержимое флаконов в кювету толщиной 1 см, провести замеры оптической плотности культуры тест-объекта в красной области спектра (для КФК-3 длина волны 670 нм) во всех вариантах проведенного опыта по биотестированию. Эксперимент можно считать успешным, если величины оптической плотности в контрольных флаконах были не ниже 0,120.

О степени воздействия на водоросли в опыте по сравнению с контролем судят по изменению оптической плотности тест-культуры водоросли за 22 часа от начала биотестирования.

При определении острого токсического действия для каждого разведения по результатам четырех параллельных определений вычисляют среднее значение оптической плотности по формуле:

$$X = \sum X_i / n,$$

где X – среднее значение оптической плотности;

X_i – значения оптической плотности в i -том параллельном определении;

n – количество параллельных определений.

Если для одного из флаконов конкретного варианта опыта получено явно выпадающее значение оптической плотности (чаще всего из-за недостаточной чистоты флакона), то оно может быть отброшено, а средняя величина плотности определяется из трех оставшихся значений.

Рассчитывают относительное (в %) изменение величины оптической плотности для каждого разведения по сравнению с контролем (I):

$$I = (X_k - X_0) / X_k \cdot 100 \%,$$

где X_k и X_0 – средние значения оптической плотности в контроле и в опыте соответственно.

Критерием токсичности пробы воды является снижение средней величины оптической плотности по сравнению с контрольным вариантом на 20 % и более в случае подавления роста тест-культуры или ее повышение на 30 % и более – при стимуляции ростовых процессов.

Качество воды устанавливается на основе ее токсикологических характеристик через величину биологически безопасного разбавления согласно таблицы 1. Для этого из результатов биотестирования разведений пробы воды, кратных трем выбирают то разбавление, для которого

рассчитанный индекс отклонения (I) превысил критерий токсичности воды. При этом процент отклонения в величине оптической плотности по сравнению с контролем, проявляющийся в виде подавления роста приводятся со знаком (+), а его стимуляции со знаком (-).

Таблица 1

Токсикологические характеристики качества испытуемой воды

Величина разбавления тестируемой воды, при которой превышен критерий токсичности	Качество воды
1	слаботоксичная
3	среднетоксичная
9	токсичная
27	сильнотоксичная
81	гипертоксичная

Если в ряду разбавлений имеются отклонения в оптической плотности как в ту, так и другую сторону, то качество воды устанавливается по наибольшей величине разбавления, для которой превышен критерий токсичности. Если критерий токсичности не превышен ни при одном разбавлении воды, то проба считается нетоксичной.

Пример № 1: Значения отклонения в % от контроля средней величины оптической плотности тест-культуры водоросли для 1-, 3-, 9-, 27- и 81-кратного разбавления тестируемой воды составили соответственно: 83, 65, 37, 25 и 7. Тогда, руководствуясь таблицей 2, качество воды определяется как «сильнотоксичная», поскольку критерий токсичности (20 % подавление) превышен для 27-кратного разбавления.

Пример № 2: Значения отклонения в % от контроля средней величины оптической плотности тест-культуры водоросли для 1-, 3-, 9-, 27- и 81-кратного разбавления тестируемой воды составили соответственно: 24, – 5, –36, – 22, и – 8. Тогда, согласно таблицы 1, качество воды определяется как «токсичная», поскольку критерий токсичности (30 % стимуляция) превышен для 9-кратного разбавления.

Рабочее задание

1. Сделайте краткий конспект теоретической части.
2. Составьте схему проведения острого токсикологического эксперимента определения токсичности воды по оптической плотности хлореллы.
3. Поставьте острый токсикологический эксперимент по определению токсичности сточной воды.
4. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования по оптической плотности хлореллы.
3. Как обрабатываются результаты биотестирования на хлорелле?
4. Как подготовить тест-культуру к биотесту?
5. Какие приборы используются при проведении биотестирования на хлорелле?

Рекомендуемая литература

1. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова. – М.: Академия, 2007. – 288 с.
2. Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-90 Утвержден Госкомприроды СССР от 06.08.1990.
3. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИЯ, НИА-Природа, 2002.
4. Григорьев Ю.С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 16.1:2.3:3.7-04; ФР.1.31.2009.06642), 2004 (издание 2007 г).

Лабораторная работа № 5.

Определение токсичности воды по смертности *Daphnia Magna Straus* (Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Познакомиться с методикой биотестирования, где тест-объектом являются дафнии, провести острый токсический эксперимент и определить токсичность сточной воды.

Оборудование и материалы

Климатостаты, батарейные стаканы, устройство для экспонирования рачков.

Теоретическое введение

В качестве тест-объекта используется *Daphnia magna Straus*. Относится к низшим ракообразным, отряду ветвистоусых. Дафнии обитают в планктоне стоячих и слабопроточных пресноводных водоемов, широко распространены на территории России.

Морфология. Тело дафний овальной формы, сжато с боков, заключено в прозрачный панцирь. Тело нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы.

Голова покрыта щитом, передний край которого вытянут, образуя рострум. Под рострумом расположены две пары конечностей: антеннулы и антенны, последние сильно развиты, служат для скачкообразного перемещения в толще воды. Пять пар грудных конечностей сильно расчленены, снабжены щетинками, служат для фильтрации воды, питания, дыхания.

Брюшной (абдоминальный) отдел туловища заканчивается постабдоменом, дорсальный край которого имеет выемку, характерную для дафний данного вида. В головном отделе, не покрытом раковиной, расположена пара глаз: большой – сложный, маленький – простой. Под панцирем дафний легко различимы сердце, кишечник, выводковая камера, которая находится в спинной части туловища. В выводковой камере протекает эмбриональное развитие дафний.

Рост, развитие и размножение. Наиболее интенсивно дафния растет первые дни после рождения, при каждой линьке сбрасывая старый панцирь. Оптимальное питание обеспечивает удвоение размеров рачков в промежутке между линьками. После наступления половой зрелости рост дафний

замедляется, снижается и частота линек. Всего в течение жизни дафния может линять до 24 раз. Выметанная молодь имеет в длину 0,7–0,9 мм, половозрелые самки – 2,2–2,4 мм, самцы – 2,0–2,1 мм. Максимальные размеры самок – 6,0 мм (при сыром весе 7–10 мг). В природе в летнее время, а в лаборатории при оптимальных условиях культивирования круглый год дафнии размножаются без оплодотворения – партеногенетически (рождаются только самки). При резком изменении условий существования или культивирования (похолодание, голод, перенаселенность и т.п.) в культуре появляются самцы. Самцы отличаются от самок меньшими размерами, видоизмененной формой тела, антеннул, постабдомена. Резкое изменение условий существования вызывает переход к половому размножению, дафнии откладывают «зимние яйца», размещающиеся в эффипиуме, образованном из части створок панциря. При очередной линьке эффипиум отделяется (в природе – осенью), падает на дно водоема, где яйца проходят стадию зимнего покоя. Весной из них появляются самки, снова переходящие к партеногенетическому размножению.

Период созревания рачков при оптимальной температуре ($+ 20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) и хорошем питании – 5–8 суток, длительность эмбрионального развития – 3–4 суток, а при повышении температуры до $25 \text{ }^\circ\text{C}$ – 46 часов. Затем происходит вымет молодки (партеногенетических самок) каждые 3–4 суток. Количество молодки у молодых самок – 10–15, у зрелых – 30–40 особей. В природе дафнии живут в среднем 20–25 суток, а в лаборатории при оптимальном режиме 3–4 месяца и более. При температуре выше $25 \text{ }^\circ\text{C}$ продолжительность жизни дафний может сокращаться до 25 суток. Голодание увеличивает продолжительность жизни, но задерживает рост и наступление линек.

Питание и отношение к содержанию кислорода. По характеру питания относятся к фильтраторам, в природе дафнии питаются взвешенными в воде бактериями, одноклеточными водорослями, детритом, растворенными органическими веществами. Пища поступает с потоком воды, направленным грудными конечностями, через выросты – в брюшной желоб вдоль основания конечностей и ко рту рачка. Оптимальное для жизнедеятельности дафний содержание растворенного в воде кислорода – $6\text{--}7 \text{ мг/дм}^3$.

Однако дафния достаточно устойчива к изменению кислородного режима и снижению растворенного в воде кислорода до 2 мг/дм^3 и ниже, что связано с ее способностью синтезировать гемоглобин. Повышенное содержание гемоглобина в крови дафний при ухудшении кислородного режима сопровождается окрашиванием рачков в красный цвет.

Методика основана на определении смертности дафний (*Daphnia magna Straus*) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль).

Острое токсическое действие исследуемой воды или водной вытяжки из почв, осадков сточных вод и отходов на дафний определяется по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50 % и более дафний за 48 часов в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте все рачки сохраняют свою жизнеспособность.

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают:

- среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления вод или водной вытяжки из почв, осадков сточных вод и отходов, содержащих смеси веществ), вызывающую гибель 50 % и более тест-организмов (ЛК50-48, ЛКР50-48);
- безвредную кратность разбавления вод, водных вытяжек, вызывающую гибель не более 10 % тест-объектов за 48-часовую экспозицию (БКР10-48).

Ход работы

Биотестирование проводится в лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150, помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

Температура окружающего воздуха в лаборатории 17–27 °С. Атмосферное давление 84–106 кПа, 630–800 мм в. ст. Освещение помещения может быть естественным или искусственным и не ограничено особыми требованиями.

Температура в климатостате Р1 для биотестирования 20 ± 2 °С.

Освещение в климатостате Р1 или эквивалентном приспособлении обеспечивается лампами дневного света. Освещенность для дафний 500–1000 лк.

Культуру дафний выращивают в климатостате Р-1 или эквивалентном приспособлении, обеспечивающем поддержание искусственного освещения лампами дневного света с интенсивностью света от 500 до 1000 лк, 12-часовой световой и ночной (без освещения) периоды; температуру 20 ± 2 °С.

Выращивание культуры производится согласно «Методике определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний»; ФР.139.2001.00283. В качестве культиваторов используют чашки кристаллизационные толстостенные, или батарейные стаканы объемом $2-5 \text{ дм}^3$, которые наполняют на $3/4$ объема культивационной водой, сажают туда

самок дафний среднего размера с выводковыми камерами, заполненными эмбрионами, и неплотно прикрывают культиваторы (от попадания пыли и для уменьшения испарения) пластинами из стекла или оргстекла толщиной не менее 6 мм. Для пересадки в культиваторы можно отобрать взрослых самок с помощью фильтрации культуры через крупное сито (размер ячеек 1800–2200 мкм).

Маточная культура дафний 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.

Один или два раза в неделю осуществляется пересадка культуры в свежую культивационную воду (частота пересадки определяется содержанием растворенного кислорода в культиваторах). Плотность маточной культуры 20–25 особей на 1 дм³ культивационной воды. Не допускается использование молоди маточной культуры для биотестирования.

Биотестирование воды и водных вытяжек проводят только на синхронизированной культуре дафний. 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. Получение синхронизированной культуры производится в климатостате согласно «Методике определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний»; ФР.139.2001.00283. Для этого отбирают одну самку средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, и помещают в химический стакан объемом 250 см³, заполненный культивационной водой на 200 см³. Появившаяся молодь переносится в кристаллизатор (25 особей на 1 дм³ воды) и культивируется указанным способом. Полученная третья генерация является синхронизированной культурой и может быть использована для биотестирования в возрасте 6–24 часов.

Чтобы отобрать для опытов одновозрастную культуру, дафний фильтруют с помощью комплекта сит. Взрослые дафнии задерживаются на крупном сите (размер ячеек 1000–2200 мкм), а молодые, в возрасте от 6 до 24 часов, на самом мелком (размер ячеек 450–560 мкм).

Для непрерывного осуществления массовых анализов на токсичность различных сред при большом количестве проб необходимо культивирование 4–5 генетически однородных синхронизированных культур, отличающихся друг от друга по возрасту. Таким образом, обеспечивается постоянный приток тестовых организмов.

Пересадка плодоносящих самок в свежую культивационную воду осуществляется один раз в неделю. Родившуюся молодежь ежедневно отсаживают и используют для биотестирования.

Дафний в опыте не кормят.

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 необходимый 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 предварительно подобранными пробками и снабжены надписями о приготовленной концентрации исследуемых вод. Приготовление растворов, разбавлений, проведение биотестирования выполняются при комнатной температуре. 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 см^3 используются мерные пипетки. Для объемов более 10 см^3 – 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 разведении 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 разведения. Чем выше предполагаемая токсичность, тем большей должна быть кратность разбавлений исходной пробы.

После получения предварительных результатов биотестирования при необходимости готовятся и анализируются дополнительные разбавления. Если при первичном токсикологическом испытании разбавление сточных вод делается в стандартных (предложенных выше концентрациях) или наугад, то при повторном исследовании разбавления готовят, исходя из полученных результатов проведенных исследований.

В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают.

При выполнении практического биотестирования используют в основном два (наиболее важных) показателя, характеризующих содержание исследуемой воды в разбавленном (культивационной водой) растворе: во сколько раз исследуемая вода разбавлена и каково ее процентное содержание в разбавлении. Данные показатели заносят в рабочий журнал.

Ход работы

Для определения острого токсического действия проводится биотестирование исходной исследуемой воды или водной вытяжки из почв, осадков сточных вод, отходов и нескольких их разбавлений.

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводится в трех параллельных сериях. В качестве контроля используется три параллельные серии с культивационной водой.

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

Биотестирование проводится в пробирках объемом 100 см^3 , которые заполняются 50 см^3 исследуемой воды. В пробирки помещают по десять дафний в возрасте 6–24 часов. Чувствительность дафний к токсикантам зависит от возраста рачков, поэтому в протоколе отмечают возраст используемой молодежи. Возраст определяется по размеру рачков. Дафний отлавливают из емкостей, в которых выращивается синхронизированная культура. В отдельный химический стакан отсаживают одно-возрастных рачков, а затем отлавливают по одному пипеткой (с отпиленным и оплавленным концом) объемом 2 см^3 с резиновой грушей. Помещают рачков по одному на сачок, через который вода сливается в отдельный химический стакан, после чего дафний сачком вносят в пробирки с исследуемой водой.

Посадку рачков начинают с контрольной серии. В исследуемые растворы дафний 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 дм³ с культивационной водой. Для работы с серией контроля должен быть отдельный сачок.

Для каждой серии исследуемой воды используется 3 пробирки. Общее количество пробирок, используемых в опытах, равно утроенной сумме всех разбавлений плюс 3 для исходной воды и 3 для контроля.

В экспериментах по определению острой токсичности дафний кормят только перед началом эксперимента, до отсадки рачков в пробирки с тестируемой водой. Во время опыта корм в пробирки с тестируемой водой не добавляют.

Пробирки с пробами воды и тест-организмами помещаются во вращающуюся кассету устройства для экспонирования рачков УЭР-02. Благодаря вращению кассеты происходит непрерывная и одинаковая аэрация всех тестируемых проб. При этом выбранная скорость вращения (10–12 оборотов в минуту) не создает стрессовой ситуации для самих рачков.

Учет смертности дафний в опыте и контроле проводят каждые 24 часа. Опыт прекращается, если в течение 24 часов во всех вариантах (разбавлениях тестируемой воды) наблюдается гибель более 50 % рачков.

Неподвижные особи считаются погибшими, если не начинают двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания пробирки. В экспериментах по определению острой токсичности растворы не меняют. Результаты наблюдений заносят в рабочий журнал.

Если наблюдается гибель дафний в контроле, результаты опыта не учитывают, и он должен быть повторен.

После того, как результаты эксперимента учтены, в каждой пробирке проводят измерения рН. Температура в пробирках должна соответствовать (20 ± 2) °С, а рН 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.

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 кратность разбавления вод, водных вытяжек, вызывающую гибель 50 % тест-объектов за 48-часовую экспозицию (ЛКР50-48);
- безвредную кратность разбавления вод, водных вытяжек, вызывающую гибель не более 10 % тест-объектов за 48-часовую экспозицию (БКР10-48).

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

Если экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления, вызывающей 50 %-ную гибель дафний за 48 часов экспозиции, то для получения точного значения ЛКР50-48 без выполнения дополнительных экспериментов, используется графический или неграфический метод определения. Чтобы получить на графике линейную зависимость, используется пробит-анализ.

Рабочее задание

1. Сделайте краткий конспект теоретической части.
2. Составьте схему проведения острого токсикологического эксперимента определения токсичности воды по смертности дафний.
3. Поставьте острый токсикологический эксперимент по определению токсичности сточной воды.
4. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования на дафниях.
3. Как обрабатываются результаты биотестирования на дафниях?
4. Как подготовить тест-культуру к биотесту?
5. Какие приборы используются при проведении биотестирования на дафниях?

Рекомендуемая литература

1. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.

2. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.

3. Григорьев Ю.С., Шашкова Т.Е. Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной, природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna Straus* (ПНД Ф 14.1:2:4.16-09 16.1:2.3.3.14-09; ФР.1.31.2009.06643), 2006 г.

4. Моргалев Ю.Н., Григорьев Ю.С. Методика определения индекса токсичности нанопорошков, изделий из наноматериалов, нанопокровов, отходов и осадков сточных вод, содержащих наночастицы, по смертности тест-организма *Daphnia magna Straus* (ФР.1.39.2010.09102), 2010 г.

Лабораторная работа № 6.
Методика биотестирования по гибели рыб *Poecilia reticulata* Peters
(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Познакомиться с методикой биотестирования, где тест-объектом являются рыбы *Poecilia reticulata* Peters, провести токсический эксперимент и определить токсичность сточной воды.

Оборудование и материалы

Аквариумы емкостью 50 и 200 дм³, микрокомпрессор аквариумный, оксиметр, рН-метр, приспособление для термостатирования, весы лабораторные, термометр с ценой деления шкалы 1°С, холодильник, поддерживающий температуру 4 ± 2 °С, колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм³, бумага фильтровальная, пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см³, посуда для транспортирования и хранения проб воды вместимостью 5 дм³, сачок для отлова рыбы, стеклянные палочки, цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм³, вода дистиллированная, вода питьевая, калий двуххромовокислый.

Теоретическое введение

Методика основана на установлении различия между количеством погибших рыб в анализируемой пробе (опыт) и воде, которая не содержит токсических веществ (контроль). Критерием острой летальной токсичности является гибель 50 % рыб и более в опыте по сравнению с контролем за 96 часов биотестирования.

Объем пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, вещества (смеси веществ) для определения острой летальной токсичности должен быть не менее 30 дм³. Температура анализируемой пробы должна равняться 25 ± 1 °С, концентрация растворенного кислорода не менее 4 мг/дм³. Если концентрация растворенного кислорода меньше, пробу аэрируют микрокомпрессором.

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

Результаты учитывают, если при биотестировании концентрация растворенного кислорода была не менее 4 мг/дм³, температура составляла 25 ± 1 °С, количество погибших рыб в контроле не превышало 10 %, ЛК₅₀ за 24 часа калия двуххромовокислого (K₂Cr₂O₇) для рыб находилась в диапазоне концентраций 106–175 мг/дм³.

В качестве тест-объекта используют мальков гуппи в возрасте не более двух суток (от 24 до 48 часов). Для получения тест-объекта выбирают рыб не старше двух лет (продолжительность жизни гуппи 3–3,5 года), без каких-либо признаков заболевания.

Отобранных самцов и самок рекомендуется содержать в отдельных аквариумах. При совместном содержании самцы растут медленнее и имеют меньшие размеры. Половозрелые гуппи имеют хорошо развитые половые признаки, что облегчает их сортировку. Самцы, как правило, мельче (3–4 см) и имеют более яркую окраску, чем самки. У них преобладают серовато-коричневые тона с очень яркими красными, голубыми, зелеными и черными пятнами. Самки больше самцов, до 6 см в длину, чаще желтовато-зеленые. Анальный плавник у самок округлый. У молодых самцов он имеет ту же форму, но со временем, в период полового созревания, он начинает удлиняться и превращается в подвижный гоноподий.

Для содержания производителей пригодны любые термостатируемые аквариумы, которые обеспечивают температуру воды 25 ± 1 °С. Плотность посадки самцов 1–2 дм³ воды на экземпляр, самок – не менее 4 дм³. Перед размещением рыб аквариумы засаживают растениями без жестких, режущих кромок. Предпочтение следует отдавать густым мелколистным и, обязательно, плавающим растениям (риччия, сальвиния). Спереди или в центре аквариума должно быть свободное пространство для плавания. Аквариумы освещают верхним светом не менее 8 ч в сутки. В качестве источника света используют обычные лампы дневного света. Для содержания производителей используют питьевую воду, которую отстаивают на протяжении 7 сут. Воду аэрируют, фильтруют и термостатируют при температуре 25 ± 1 °С. Содержание растворенного в воде кислорода должно быть не менее 4 мг/дм³. Один раз в месяц 1/3 часть воды заменяют на свежую. Добавляемая вода должна быть той же температуры, что и в аквариуме. Вместо испарившейся воды добавляют дистиллированную воду.

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

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

нерестовую посудину. Вместимость ее должна быть не менее 4 дм^3 с большим количеством мелколистных растений. Нерестовые посудины заполняют водой такого же качества, как и для содержания производителей, и термостатируют при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Самок после нереста удаляют, так как они поедают мальков. Мальков рекомендуется кормить «пылью», состоящей из инфузорий, эвглен, коловраток, молоди ветвистоусых рачков и науплиусов веслоногих рачков.

При отсутствии «пыли» молодь гуппи можно кормить перетертой сухой дафнией или каким-либо другим сухим кормом. На 100 рыб его необходимо не более 1 г в сутки. По мере того, как растут рыбы, в их рацион вводят резаный трубочник, мотыль, коретру и другие живые корма. Одно-двухнедельных мальков кормят до 5 раз в день, более взрослых – 2–3 раза. Мальков сортируют, чтобы избежать неравномерности развития, и постепенно переводят из нерестовых посудин в аквариумы сначала вместимостью 50 дм^3 , а далее 200 дм^3 . Аквариумы заполняют водой такого же качества, как и для производителей гуппи.

Тест-организмы (возрастом 1–2 суток) перед серией экспериментов проверяют на пригодность для биотестирования. Для определения пригодности рыб для биотестирования устанавливают среднюю летальную концентрацию раствора эталонного вещества калия двуххромовокислого ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) за 24 часа биотестирования (ЛК_{50} за 24 часа). Для этого готовят исходный раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ концентрацией 10 г/дм^3 , используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ от 100 до 200 мг/дм^3 с интервалом 25 мг/дм^3 , используя культивационную воду. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 24 часа. На основании полученных результатов рассчитывают ЛК_{50} за 24 часа калия двуххромовокислого.

Если полученная величина $\text{ЛК}_{50} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ за 24 часа находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта $106\text{--}175 \text{ мг/дм}^3$, гуппи пригодны для биотестирования. Если ЛК_{50} за 24 часа $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры.

Ход работы

Разбавления пробы воды (водной вытяжки), буровых растворов и растворы с разными концентрациями вещества (смеси веществ) готовят прибавлением определенного объема анализируемой пробы в дехлорированную питьевую воду.

Приготовленные пробы воды (водных вытяжек) или растворы с различными концентрациями вещества (смеси веществ) наливают в сосуды по 5 дм³ (опыт). Другие сосуды наполняют таким же объемом дехлорированной питьевой водой (контроль). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

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

Продолжительность биотестирования составляет 96 часов. Во время биотестирования рыб не кормят.

Ежедневно подсчитывают количество живых рыб и удаляют погибших. Погибшими считают рыб, которые не подают признаков движения или дыхания при прикосновении к ним стеклянной палочкой.

На основании результатов трех параллельных определений количества живых рыб в контроле и опыте находят среднее арифметические количества живых рыб в контроле (опыте) по формуле:

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

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

i – номер измерения количества живых рыб в контроле (опыте);

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

Рассчитывают в процентах количество погибших рыб в опыте по отношению к контролю по формуле:

$$A = \frac{X_k - X_{on}}{X_k} \cdot 100.$$

Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы воды (водной вытяжки) делают на основании величины A . Если величина A составляет 50 % и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки) устанавливают ее среднее летальное разбавление за 96 часов биотестирования (ЛР₅₀ за 96 часов).

Для количественной оценки токсичности раствора вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 96 часов биотестирования (ЛК₅₀ за 96 часов).

Рабочее задание

1. Сделайте краткий конспект теоретической части.
2. Составьте схему проведения острого токсикологического эксперимента определения токсичности воды по гибели гуппи.
3. Поставьте токсикологический эксперимент по определению токсичности сточной воды.
4. Сделайте выводы по практической работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования, где тест-объектом являются гуппи.
3. Как обрабатываются результаты биотестирования на инфузориях?
4. Как подготовить тест-объект к биотесту?
5. Какое оборудование необходимо для проведения биотестирования на инфузориях?

Рекомендуемая литература

1. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.
2. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.
3. Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-90 Утвержден Госкомприроды СССР от 06.08.1990.
4. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИЯ, НИА-Природа, 2002.

Лабораторная работа № 7.

Методика биотестирования по гибели ракообразных *Artemia Salina L.*

(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Познакомиться с методикой биотестирования, где тест-объектом являются *Artemia Salina L.*, провести токсический эксперимент и определить токсичность сточной воды.

Оборудование и материалы

Лампы дневного света, аквариумный микрокомпрессор, оксиметр любого типа с погрешностью измерения не более $0,5 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$, прибор для измерения солености воды, оксиметр любого типа с погрешностью измерения не более $0,5 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$, прибор для измерения солености воды, рН-метр, осветитель, холодильник, поддерживающий температуру $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$, кристаллизаторы, бумагу фильтровальную, бумагу черную, пипетки мерные вместимостью 0,1; 1,0, 2,0 и $5,0 \text{ см}^3$, пипетки пастеровские, стаканы химические вместимостью 50, 100 и 500 см^3 , цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и $1,0 \text{ см}^3$, чашки Петри, вода дистиллированная, соль морская.

Теоретическое введение

Для определения токсичности воды применяется методика подсчета количества погибших ракообразных *Artemia Salina L.* Методика основана на установлении различия между количеством погибших личинок артемий – науплиусов в анализируемой пробе (опыт) и воде, которая не содержит токсических веществ (контроль).

Критерием острой летальной токсичности воды (водной вытяжки), раствора вещества (смеси веществ) является гибель 50 % науплиусов и более в опыте по сравнению с контролем за 72 часа биотестирования, буровых растворов – за 96 часов биотестирования.

Биотестирование проводят при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, освещении не более 1000 лк, естественном световом периоде.

Объем пробы воды (водной вытяжки), раствора вещества (смеси веществ) должен быть не менее $0,5 \text{ дм}^3$, бурового раствора – $1,0 \text{ дм}^3$. Контрольная природная или искусственная вода должна иметь необходимую величину рН 8,0–8,5. До начала биотестирования контрольную воду аэрируют на протяжении 1–2 суток при помощи микрокомпрессора.

Науплиусы артемий для биотестирования должны быть в возрасте до 1 суток. Плотность посадки науплиусов – 20 экземпляров на объем пробы 40–50 см³, при трех – пятикратной повторности.

Результаты биотестирования учитывают, если температура воздуха и пробы воды во время биотестирования составляла $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$, ЛК₅₀ за 72 часа К₂Cr₂O₇ для науплиусов артемий находилась в диапазоне его концентраций 6,5–8,0 мг/дм³, количество погибших науплиусов в контроле не превышало 10 %.

В качестве тест-объекта используют односуточных науплиусов ракообразных *Artemia salina* L. Чтобы получить исходный материал для биотестирования 0,1 г сухих яиц артемий помещают в химический стакан объемом 500 см³ и заливают дехлорированной питьевой водой, которую предварительно отстаивают и аэрируют на протяжении суток. Через 30 минут, не взбалтывая содержимое стакана, сливают слой воды над яйцами, которые осели, удаляя таким образом погибшие яйца и пустые оболочки. Процедуру повторяют не менее трех раз. Затем отмытые яйца заливают морской водой необходимой солености, рН 8,0–8,5, с концентрацией кислорода не менее 7 мг/дм³ и при слабой аэрации выдерживают до выклева. Используют природную морскую воду, которая не содержит токсических веществ, или искусственную морскую воду.

Предварительной адаптации артемий к нужной солености не проводят, так как рачек эвригалинный и может переносить соленость в широком диапазоне.

При аэрации и температуре воды $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ выклев науплиусов происходит через 48 часов. При температуре 25° С – через 24 часов. Науплиусы артемий в течение 3–4 суток после выклева из яиц не нуждаются в кормлении в связи с эндогенным питанием. Поэтому в эксперименте их не кормят.

Каждую новую партию яиц проверяют на выклев. Используют яйца при выклеве 60-90 %. Для получения синхронизованного материала первых науплиусов тщательно отбирают укороченной пастеровской пипеткой, концентрируя их возле одной из стенок направленным источником света (новорожденные науплиусы имеют положительный фототаксис). За час в стакане накапливаются новые науплиусы, их также переносят при помощи пипетки в отдельный сосуд с морской водой и используют для биотестирования.

Односуточных науплиев проверяют на пригодность к биотестированию. Для этого устанавливают среднюю летальную концентрацию за 72 ч

биотестирования (ЛК₅₀ за 72 часа) эталонного вещества калия двухромово-кислого (K₂Cr₂O₇). Готовят исходный раствор K₂Cr₂O₇ с концентрацией 1 г/дм³, используя дистиллированную воду. Далее готовят серию растворов K₂Cr₂O₇ с концентрациями от 4,0 до 10,0 мг/дм³, используя контрольную природную (из условно чистого района) или искусственную морскую воду. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 72 часа. На основании полученных результатов рассчитывают ЛК₅₀ за 72 часа для K₂Cr₂O₇. Если найденная ЛК₅₀ за 72 часа находится в диапазоне реагирования тест-объекта, который равен 6,5-8,0 мг/дм³ K₂Cr₂O₇, науплиусы пригодны для биотестирования (существуют разные по чувствительности для артемий).

Если ЛК₅₀ за 72 часа K₂Cr₂O₇ не находится в указанном диапазоне реагирования, проверяют науплиусов артемий из новой порции яиц той же партии, или заменяют партию яиц.

Ход работы

В чашки Петри наливают по 40 см³ различных разбавлений исследуемых проб воды (водной вытяжки), бурового раствора или различные концентрации раствора вещества (смеси веществ) и контрольную воду. В каждый из контрольных и опытных сосудов пастеровской пипеткой помещают по 20 науплиусов в возрасте до 1 суток. Повторность в контроле и опыте трехкратная. Контролем служит природная или искусственная морская вода необходимой солености. Продолжительность биотестирования составляет 72 часа. На протяжении этого времени науплиусов не кормят. Биотестирование буровых растворов проводят 96 часов.

Подсчет науплиусов, которые выжили в контроле и опыте, проводят визуально на лабораторном столе под бинокуляром МБС-9 или МБС-10. Особей считают живыми, если они свободно двигаются в толще воды или находятся вблизи дна, но при этом не перестают интенсивно двигать конечностями. Мертвых науплиусов удаляют.

На основании результатов трех параллельных определений количества живых науплиусов артемий в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых науплиусов артемий в контроле (опыте) по формуле:

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

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

i – номер измерения количества живых науплиусов артемий в контроле (опыте);

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

Рассчитывают в процентах количество погибших науплиусов артемий в опыте по отношению к контролю по формуле:

$$A = \frac{X_k - X_{on}}{X_k} \cdot 100.$$

Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового вещества или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины A . Если величина A составляет 50 % науплиусов и более, считают, что проба воды (водная вытяжка), буровой раствор или раствор вещества (смеси веществ) проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности анализируемой пробы устанавливают ее среднее летальное разбавление за 72–96 часов биотестирования (ЛР₅₀ за 72–96 часов).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 72 часа биотестирования (ЛК₅₀ за 72 часа).

Рабочее задание

1. Сделайте краткий конспект теоретической части.
2. Составьте схему проведения острого токсикологического эксперимента определения токсичности воды по гибели ракообразных *Artemia Salina L.*
3. Поставьте острый токсикологический эксперимент по определению токсичности сточной воды.
4. Сделать выводы по практической работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Рекомендуемая литература

1. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.
2. Егорова Е.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: учеб. пособие / Е.И. Егорова. – Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 84 с.
3. Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-90 Утвержден Госкомприроды СССР от 06.08.1990.
4. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИЯ, НИА-Природа, 2002.

Лабораторная работа № 8.
Биотестирование на дождевых червях
(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Познакомиться с методикой проведения биотестирования на дождевых червях, изучить тест-объект, проанализировать научные исследования в данной области.

Оборудование и материалы

Дождевые черви, научные статьи, микроскопы, методическое пособие.

Теоретическое введение

Для биотестирования почвенных образцов чаще всего применяют дождевых червей, олигохет (кольчатых червей) и различных насекомых. В Германии за период 1996–2001 гг. было апробировано более 20 биотестов с целью определения наиболее чувствительных и адекватных. В зависимости от того, какая функция почвы оценивается, используют тот или иной биотест. В этом списке биотестов дождевые черви выступают в качестве индикаторов функции почвы как естественной среды обитания. Такими тестами являются тест на острую токсичность, репродуктивный тест, тест на биомассу.

Биотестирование проводят для определения интегральной токсичности почвы с целью проверки соответствия качества почвы нормативным требованиям. Исследуемая почва не должна оказывать острого и хронического токсического действия на тест-объекты.

Промышленные линии навозного червя используются для круглогодичной переработки органических отходов. Культуру дождевых червей выращивают в деревянных или пластмассовых ящиках, находящихся в теплом помещении, не содержащем токсических паров или газов. Оптимальная температура для культивирования дождевых червей и биотестирования – 18–24 °С, освещенность – 200–400 лк. Для выращивания дождевых червей используют смесь навоза крупного рогатого скота с растительными отходами.

Биотестирование проводят в деревянных или пластмассовых ящиках размером 30х30 см и высотой 15–20 см. Ящики должны иметь снизу дренажные отверстия для слива излишков воды. Тестируемую и контрольную почву помещают в ящики и увлажняют отстоянной водопроводной водой до влажности 75–85 %. В качестве контроля используют почву с территории заповедника или лесного массива, заведомо не содержащую токсичные вещества.

Методика основана на определении выживаемости и поведенческих реакций дождевых червей при воздействии токсических веществ, содержащихся в тестируемой почве по сравнению с контролем.

Кратковременное биотестирование – до 2-х суток – позволяет определить острое токсическое действие почвы на дождевых червей по их выживаемости и поведенческим реакциям. Показателем выживаемости служит среднее количество тест-объектов, выживших в тестируемой почве или в контроле за определенное время. Критерием токсичности является гибель 50 и более процентов дождевых червей за 2 суток в тестируемой почве по сравнению с контролем. Показателем поведенческих реакций тест-объектов является скорость зарывания в субстрат. Критерием токсичности является отсутствие зарывания дождевых червей в тестируемую почву, активное ползание по поверхности земли и попытки к выползанию из ящика. Этот прием (тест на избегание) хорошо известен всем червеводам при выборе субстрата для культивирования червей. Достоинством скринингового теста являются высокая чувствительность, надежность, простота постановки, экономия времени и средств. Он достаточно сильно коррелирует с репродуктивным тестом.

Длительное биотестирование – до 30 суток – позволяет определить хроническое токсическое действие почвы на дождевых червей по снижению их выживаемости и плодовитости. Показателем выживаемости служит среднее количество тест-объектов, выживших в тестируемой почве в течение биотестирования. Показателем плодовитости – среднее количество молоди (включая и количество коконов, умноженное на два, то есть число зародышей) в пересчете на одну особь выживших дождевых червей.

Большое значение метод биотестирования на дождевых червях приобретает при оценке результатов рекультивации (биоремедиации) территорий, загрязненных токсичными химическими веществами. Биотестирование позволяет достаточно быстро и эффективно оценить интегральную токсичность почвы до, во время и после биоремедиации, оценить эффективность технологии биоремедиации, а также показать, что продукты разложения поллютантов являются малотоксичными для окружающей среды. Это обеспечивает оперативный контроль за экологической безопасностью технологий, применяемых для биоремедиации.

Не менее важным аспектом использования дождевых червей в качестве биотестов мог бы стать выбор наименее токсичных пестицидов, от которых, к сожалению, современное сельское хозяйство пока не может отказаться.

Однако на сегодня данный тест не внесен в список тестов, используемых при токсикологической оценке пестицидов.

Рабочее задание

1. Составьте схему проведения эксперимента.
2. Проанализируйте научные статьи и патентные исследования в области применения дождевых червей для биотестирования.
3. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Анализ научных статей и патентов.
4. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования, где тест-объектом являются дождевые черви.
3. Проводятся ли в настоящее время экспериментальные исследования определения токсичности почв на дождевых червях?
4. Какие патентные разработки вы анализировали по данной тематике?
5. Какое оборудование необходимо для проведения биотестирования на дождевых червях?

Рекомендуемая литература

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288с.
2. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.
3. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.

4. Егорова Е.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: учеб. пособие / Е.И. Егорова. – Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 84 с.

5. Израэль Ю.А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю.А. Израэль. – Л.: Гидрометеоиздат, 2007. – 190 с.

6. Латенков В.П. Основы токсикологии для безопасности жизни и деятельности / В.П. Латенков, Л.Н. Скипин. – Тюмень: ТюмГУ, 2003. – 189с.

7. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова. – М.: Академия, 2007. – 288 с.

Лабораторная работа № 9.
Определение токсичности воды, содержащей
хлорорганические пестициды
(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Познакомиться с методикой биотестирования, где тест-объектом являются гуппи (*Poecilia reticulata*) и данио (*Brachydanio rerio*), произвести оценку токсического действия воды, содержащей хлорорганические пестициды.

Оборудование и материалы

Аквариумы объемом 200, 50 и 10 л, микрокомпрессоры; рыбы – гуппи и данио; сачки, корм для рыб; 50 мл исходного раствора пестицида (например, гексохлоран, симазин) в концентрации 10^{-3} – 10^{-4} (0,001 – 0,0001 %) в 2 %-й сахарозе.

Теоретическое введение

Принцип метода основан на сравнении выживаемости рыб в воде, содержащей токсические вещества, и в водопроводной воде.

Кратковременное биотестирование (до 96 ч) позволяет определить острое токсическое действие воды на рыб по их выживаемости. Показателем выживаемости служит среднее количество тест-объектов, выживших в тестируемой воде или контроле за определенное время. Критерием токсичности является гибель 50 % и более рыб за период до 96 ч в тестируемой воде по сравнению с контролем.

Длительное биотестирование (до 30 суток) позволяет определить хроническое токсическое действие воды на рыб по их выживаемости.

В качестве тест-объектов используют рыб, широко применяемых в международных и национальных стандартах по биотестированию воды, – гуппи (*Poecilia reticulata*) или данио (*Brachydanio rerio*).

Систематическое положение гуппи как тест-объекта: тип *Chordata*, класс *Piscea*, отряд *Cyprinodontiformes*, семейство *Poeciliae*, род *Poecilia*, вид *Poecilia reticulata* Peters.

Гуппи – один из самых распространенных видов аквариумных рыб. В природе они обитают в тропических водоемах, где играют важную экологическую роль, уничтожая личинок moskitов и комаров. Гуппи – мелкие рыбы, с ярко выраженным половым диморфизмом. Самцы (3–4 см) обычно мельче самок и окрашены в более яркие цвета. В их окраске преобладают серовато-коричневые тона с очень яркими

красными, голубыми, зелеными и черными вкраплениями и точками. Самки достигают 6 см в длину, обычно желтовато-зеленые.

Систематическое положение данио как тест-объекта: класс *Pisces*, отряд *Cypriniformes*, семейство *Cyprinidae*, род *Brachydanio*, вид *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan).

Данио – широко распространенная аквариумная рыбка. В природе она обитает в медленно текущих водоемах Юго-Восточной Азии, длина тела взрослых рыб около 4,5 см. Тело имеет цилиндрическую форму, серебристое, с 7–9 темно-синими горизонтальными полосками. Эти полосы идут к хвостовому и анальному плавникам. Спина оливково-зеленая.

Для успешного проведения анализа следует выполнять ряд требований по содержанию тест-объектов и условиям биотестирования.

Использовать термостатируемые аквариумы, обеспечивающие плотность посадки рыб из расчета 1–2 л воды на 1 экз., производителей – 4 л на 1 экз. (для гуппи) и не более одного на 3,5 л (для данио). Размещать аквариумы в помещениях, не содержащих токсичных паров или газов; заполнять водопроводной водой (27 °С), отстоянной трое суток. Поддерживать первоначальный объем воды. Менять $\frac{1}{5}$ воды еженедельно.

Содержать в аквариуме мелколиственные и плавающие растения. Аквариум освещать дневным светом не менее 8 ч в сутки для гуппи, для данио достаточно естественной смены дня и ночи.

Кормить тест-объекты 1–2 раза в сутки, производителей – 3–5 раз сухим (дафнии, циклопы) или живым (мотыль, трубочник дафнии, циклопы) кормом. Необходим дополнительно растительный корм (водоросли, листья аквариумных растений, салат и т.д.).

Используют для биотестирования гуппи в возрасте 1–3 недель и половозрелых данио.

Биотестирование проводить при естественной смене дня и ночи, концентрация кислорода в воде должна быть не менее 4 мг/л.

В аквариумы налить по 10 л тестируемой и контрольной воды. Повторность двукратная. Проводить аэрацию компрессором, воду менять через двое суток. Рыб переносить при помощи сачка, ежедневно подсчитывать выживших и удалять умерших рыб. При кратковременном биотестировании рыб не кормить.

Ход работы

1. Приготовьте растворы пестицида в концентрациях 0,1; 1 и 10 ПДК.
2. В аквариумы налейте по 10 л контрольной и тестируемой воды, содержащей пестициды, и поместите по 10 рыб. Воду аэрируйте с помощью микрокомпрессора.

Внимание! Так как исследуемое вещество плохо растворимо в воде, разрешается использование растворителей (спирта, ацетона и др.) с целью получения раствора или устойчивой эмульсии. В случае использования этанола его концентрация должна быть не более 10,0 мг/л для острых опытов и 1,0 мг/л для хронических. При использовании растворителя следует ставить второй контроль с растворителем.

3. Основным показателем токсичности среды является выживаемость рыб. Наблюдения за выживаемостью проводить раз в сутки в течение 96 часов, подсчитывая выживших и удаляя погибших.

4. Время гибели рыб отмечать по наступлению неподвижности (иммобилизации): рыбы не подадут признаков жизни в течение 5 мин после прикосновения к ним стеклянной палочкой. Данные выживаемости рыб во времени при разных концентрациях пестицидов записать в таблицу.

Если в любой учитываемый период времени гибнет 50 % и более рыб, то биотестирование прекращается. При кратковременном биотестировании рыб не кормить.

5. При обработке результатов эксперимента провести сравнение показателей подопытных и контрольных рыб. Определение достоверности отклонения от контроля осуществить стандартными методами вариационной статистики.

6. Можно сделать вывод о наличии хронического токсического действия воды на основании достоверности различия выживаемости рыб в контроле и тестируемой воде через 30 суток. Результаты биотестирования занести в таблицу.

7. При гибели более 50 % рыб, как в остром, так и в хроническом экспериментах вода считается токсичной.

Рабочее задание

1. Сделайте краткий конспект теоретической части.
2. Составьте схему проведения острого токсикологического эксперимента определения токсичности воды на гуппи.
3. Поставьте острый токсикологический эксперимент по определению токсичности сточной воды.
4. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.

3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования на гуппи.
3. Как обрабатываются результаты биотестирования на гуппи?
4. Как подготовить тест-культуру к биотесту?
5. Какие приборы используются при проведении биотестирования на гуппи?

Рекомендуемая литература

1. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.
2. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.

Лабораторная работа № 10.

Определение токсичности воды по проращиванию семян

(Продолжительность работы – 4 часа)

Цель работы

Познакомиться с методикой биотестирования, где тест-объектом являются семена растений, а тест-функцией – длина корня.

Оборудование и материалы

Семена редиса красного, круглого, белого или белой горчицы, фильтровальная бумага, чашки Петри, термостат, линейка.

Ход работы

30 или 50 штук семян редиса красного круглого с белым кончиком или белой горчицы (*Sinapis alba*) укладывают равномерно на фильтровальную бумагу в чашке Петри диаметром 10 см. В каждую чашку Петри наливают по 5 мл исследуемой и чистой воды. Повторность 4–8-кратная. Уровень жидкости в чашках должен быть ниже поверхности семян. Чашки покрывают и помещают в термостат при температуре 20 °С. При отсутствии термостата эксперимент возможен в комнатных условиях, но тогда из-за колебаний температуры затрудняется сопоставление результатов, проводимых в различное время.

Перед использованием чашки Петри необходимо стерилизовать в автоклаве при 2 атм. в течение 10 минут или в кипящей воде 30 минут.

Эксперимент заканчивается через 72 часа. Измеряют длину корней, исключая из ряда данных пять наименьших значений, включая и непроросшие семена.

Если, по сравнению с контрольными, семена в исследуемой воде вообще не проросли или же длина корней в процентах от контроля ниже 70, то вода не пригодна для орошения.

Порог 70 % обосновывается тем, что почва, благодаря сорбционной способности, снижает ингибирующее воздействие исследуемой воды.

При длине корней в опыте свыше 120 % от контроля предполагается, что вода обладает стимулирующими свойствами.

Рабочее задание

1. Составьте схему проведения эксперимента.
3. Поставьте биотоксикологический эксперимент по определению токсичности сточной воды.
4. Проанализируйте результаты.
5. Сделайте выводы по лабораторной работе.

Требования к оформлению отчета о лабораторной работе

Отчет должен содержать:

1. Название и цель работы.
2. Краткое описание тест-объекта и методики биотестирования.
3. Описание эксперимента.
4. Обработку результатов эксперимента.
5. Анализ полученных результатов и выводы по лабораторной работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите объект тестирования.
2. Расскажите о процедуре биотестирования, где тест-объектом являются семена растений.
3. Как обрабатываются результаты биотестирования на семенах растений?
4. Как подготовить тест-объект к биотесту?
5. Какое оборудование необходимо для проведения биотестирования на семенах растений?

Рекомендуемая литература

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288с.
2. Ашихмина Т.Я. Биоиндикация и биотестирование – методы познания экологического состояния окружающей среды / Т.Я. Ашихмина и др. – Киров: РПС, 2005. – 164 с.
3. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А.Г. Бубнов и др. / под ред. В.И. Гриневича. – Иваново, 2007. – 112 с.

4. Егорова Е.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: учеб. пособие / Е.И. Егорова. – Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 84 с.
5. Израэль Ю.А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю.А. Израэль. – Л.: Гидрометеоиздат, 2007. – 190 с.
6. Латенков В.П. Основы токсикологии для безопасности жизни и деятельности / В.П. Латенков, Л.Н. Скипин. – Тюмень: ТюмГУ, 2003. – 189 с.
7. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова. – М.: Академия, 2007. – 288 с.

Содержание

Введение	3
Лабораторная работа № 1. Основные понятия, задачи и методы биотестирования	5
Лабораторная работа № 2. Методика биотестирования по снижению уровня биолюминесценции бактерий	15
Лабораторная работа № 3. Методика биотестирования по снижению прироста количества инфузорий	19
Лабораторная работа № 4. Определение токсичности воды по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла	25
Лабораторная работа № 5. Определение токсичности воды по смертности <i>Daphnia Magna Straus</i>	33
Лабораторная работа № 6. Методика биотестирования по гибели рыб <i>Poecillia reticulate Peters</i>	42
Лабораторная работа № 7. Методика биотестирования по гибели ракообразных <i>Artemia Salina L</i>	47
Лабораторная работа № 8. Биотестирование на дождевых червях	52
Лабораторная работа № 9. Определение токсичности воды, содержащей хлорорганические пестициды	56
Лабораторная работа № 10. Определение токсичности воды по проращиванию семян	60

Учебное издание

БИОТЕСТИРОВАНИЕ

Методические указания по выполнению
лабораторных работ

Для студентов очной и заочной форм обучения
по профилю «Аквакультура»
направления подготовки 35.03.08
«Водные биоресурсы и аквакультура»

Составитель: **Борисова Светлана Дмитриевна**

Кафедра водных биоресурсов и аквакультуры КГЭУ

Редактор редакционно-издательского отдела *Н.И. Оморова*
Компьютерная верстка *Т.И. Лунченкова*

Подписано в печать 12.11.15.

Формат 60×84/16. Бумага ВХИ. Гарнитура «Times». Вид печати РОМ.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 4,12. Тираж 500 экз. Заказ 39/эл.

Редакционно-издательский отдел КГЭУ,
420066, Казань, Красносельская, 51