

Министерство сельского хозяйства РФ
ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного
Зауралья»
Агротехнологический институт
Кафедра экологии и рационального природопользования

ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие



Тюмень, 2018

ББК
УДК 574. 632

Рецензенты

Скипин Л. Н., доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры техносферной безопасности ТюмГАСУ

Малышкин Н.Г., к. с.-х. н., доцент каф. экологии и РП

Акатьева Т. Г. Экотоксикология. Учебно-методическое пособие. / Т. Г. Акатьева. – Тюмень: Вектор-Бук, 2018. – 99 с.

В учебно-методическом пособии рассматриваются правила отбора и подготовки к анализу проб образцов различных компонентов окружающей среды. Характеризуются экотоксикологические методы оценки качества природных объектов окружающей среды с использованием различных тест-организмов.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направлений: 05.03.06 «Экология и природопользование» (направленность «Экология и природопользование»), 35.03.03 «Агрохимия и агропочвоведение» (направленность «Агроэкология») как дневной, так и заочной форм обучения.

Рекомендовано к изданию Учебно-методической комиссией Агротехнологического института ГАУ СЗ Протокол № 5 от 18 января 2018 г.

Содержание

Введение	4
1 Методы экотоксикологических исследований	5
1.1 Отбор образцов для токсикологических исследований	5
1.2 Правила отбора проб	8
1.3 Подготовка проб к анализу. Методы исследований	14
2 Биотестирование и биоиндикация как методы биологического анализа объектов окружающей среды	19
2.1 Биотестирование – один из методов биологического анализа	19
2.2 Понятие о биоиндикации	25
3 Зависимость «доза, концентрация, время и эффект»	33
4 Математические методы в токсикологии	37
5 Оценка качества атмосферного воздуха г. Тюмени по морфометрическим показателям высшей растительности	39
6 Оценка качества воды природных водоемов	42
7 Изучение качества сточных и природных вод методом биотестирования	53
7.1 Биотестирование с помощью дафний (<i>Daphnia magna</i> Straus)	53
7.2 Биотестирование с использованием ряски (<i>Lemna minor</i> L.)	58
7.3 Биотестирование с использованием элодеи <i>Elodea canadensis</i> Rich.	61
8 Биотестирование токсичности субстратов по проросткам различных растений – индикаторов	66
8.1 Выращивание растений на испытуемом субстрате	66
8.2 Определение токсичности почв	67
8.3 Испытание воды и других жидких субстратов (вытяжка из почвы, осадки, растворы гербицидов и др.)	67
8.4 Метод полива проростков тест-растений испытуемой загрязненной водой	68
9 Определение загрязнения окружающей среды пылью (по её накоплению на листовых пластинках растений)	69
10 Влияние нефти на рост и развитие растений	71
Список использованных источников	73
Приложение А	77
Приложение Б	90

ВВЕДЕНИЕ

Экотоксикология – это наука, изучающая законы взаимодействия ядов с живыми организмами на различных уровнях их структурно-функционального развития в зависимости от различных экологических факторов. Она изучает токсические воздействия химических агентов на организмы, популяции, сообщества, входящие в определенные экосистемы, включая изучение путей переноса этих агентов и их трансформаций в ходе взаимодействия с окружающей средой.

«Экотоксикология» – одна из естественно-научных дисциплин при подготовке бакалавров направлений 05.03.06 «Экология и природопользование» и 35.03.03 «Агрехимия и агропочвоведение».

Изучение экотоксикологии будет способствовать формированию знаний у студентов в области экологии токсичных веществ, направленное на снижение и предотвращение загрязнения экосистем токсикантами и получение безопасной сельскохозяйственной продукции.

Данное методическое пособие рекомендовано для проведения практических занятий студентов указанных направлений как дневной, так и очно-заочной и заочной форм обучения.

Методическое пособие содержит темы теоретического характера, лабораторные работы и задания, ориентированные на индивидуальное выполнение.

Каждая тема содержит вопросы для самоконтроля, отвечая на которые студенты могут проверить степень усвоения материала.

При подготовке заданий к теме «Зависимость «доза, концентрация, время и эффект» (расчетно-графическая работа) использованы результаты исследований Акатьевой Т. Г., подробно отраженные в диссертации.

Задания к теме «Качество воды природных водоемов» составлены на основе экспериментальных исследований по оценке экологического состояния р. Туры коллективом научно-исследовательского центра «Экология» под руководством к.б.н. Михайловой Л. В. Автор выражает глубокое признание и благодарность за разрешение использования полученных результатов при составлении заданий по указанной тематике.

Практические занятия будут способствовать лучшему усвоению теоретического материала студентами и приобретению навыков изучения экотоксикологического состояния территорий и компонентов окружающей среды.

1 МЕТОДЫ ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1 Отбор образцов для токсикологических исследований

Цель занятия: изучить основные методы экотоксикологических исследований.

Задачи: ознакомиться с правилами выбора и описания места отбора проб; изучить основные правила отбора и подготовки к анализу образцов воды, донных отложений, почв и водных организмов.

Объектами для исследования могут быть различные вещества, а также образцы природной среды (пробы воды, почвы, растения и др.).

Комплексный подход к экологическим исследованиям предполагает изучение и описание таких основных абиотических составляющих экосистем как климат, почвы, подстилающие породы, поверхностные воды. Все эти параметры являются в равной степени важными факторами, определяющими как внешний облик той или иной экосистемы, так и внутренние, глубинные закономерности её функционирования.

Только тщательное изучение всех этих параметров соответствует требованиям комплексного экологического исследования.

Отбор проб – операция, от правильного выполнения которой во многом зависит точность получаемых результатов.

Место для первичной оценки или отбора пробы выбирается в соответствии с целью исследований и на основании внимательного изучения всей имеющейся предварительной информации (документации), а также натурного исследования местности или контролируемого объекта. При этом должны учитываться все обстоятельства, которые могли бы оказать влияние на состав взятой пробы или результат первичной оценки наличия и уровня загрязнения (воздействия). В зависимости от вида анализируемой среды данная процедура имеет некоторые особенности.

Водные объекты, а особенно реки, являются одной из важнейших экологически значимых составных частей экосистем и изучаются как при проведении комплексных экологических исследований, так и в качестве самостоятельного объекта при природоохранных исследованиях.

Пробы из рек и водных потоков отбирают для определения качества воды в бассейне реки, пригодности воды для пищевого использования, орошения, для водопоя скота, рыборазведения, купания и водного спорта, установления источников загрязнения.

При поиске точек отбора проб воды из поверхностных природных источников особенно внимательно надо обследовать притоки реки и возможные источники загрязнения выше по течению от предполагаемого места первичной оценки или пробоотбора.

Общий план изучения реки

1. *Подготовительный этап* (выполняется до начала полевых работ на основе картографических и литературных материалов):

- определение по карте основных гидрографических характеристик реки: к бассейну какой речной системы относится; приток какой реки и какого порядка; протяженность и извилистость реки; название и протяженность притоков; площадь водосборного бассейна и пр.;

- физико-географическая характеристика бассейна реки.

2. *Полевые исследования реки* начинаются с выбора и разметки пробных участков для проведения измерительных и других работ.

Затем производится описание места отбора проб.

План описания водоема

1. Местонахождение водоема (ориентиры на местности, опознавательные объекты и пр.).

2. Описание внешнего состояния берега.

3. Описание водной поверхности водоема (наличие пленки нефти, мусора, цветение воды и пр.).

4. Наличие водной растительности: полупогруженные растения (камышы, рогоз, осоки и др.); погруженные растения с плавающими листьями (кувшинки, кубышки, ряска); элодея, рдесты и др.

5. Наличие взвесей, их характер (глина, планктон и пр.).

6. Описание донных отложений: запах, цвет, наличие живых организмов.

Пробы из *природных и искусственных озер (прудов)* отбирают с той же целью, что и пробы воды из рек. Учитывая длительность существования озер, должен быть проведен мониторинг качества воды в течение нескольких лет, а также установление последствий антропогенных загрязнений воды. Следует принимать к сведению, что слабопроточные водоемы имеют значительную неоднородность воды в горизонтальном направлении. Качество воды в озерах часто сильно различается по глубине из-за термальной стратификации, причиной которой могут быть фотосинтез в поверхностной зоне, подогрев воды, воздействие донных осадков и пр. Кроме этого качество воды в водоемах носит циклический характер, причем наблюдается как суточная, так и сезонная цикличность. По этой причине ежедневные пробы следует отбирать в одно и то же время суток (например, в 12 часов дня), а продолжительность сезонных исследований должна быть не

менее одного года, включая исследования серий проб, отобранных в течение каждого времени года.

Место отбора проб *сточных вод* оценивается и выбирается только после подробного ознакомления с технологией производства, потреблением и сбросом воды, местоположением цехов объекта, системой его канализации, назначением и работой отдельных элементов систем очистки и т.д.

Пробы влажных осадков (дождя и снега) чрезвычайно чувствительны к загрязнениям, поэтому такие пробы не следует отбирать вблизи источников значительных загрязнений атмосферы – котельных, ТЭЦ, открытых складов материалов и удобрений, транспортных узлов и пр. В подобных случаях проба осадков будет испытывать значительное влияние локальных источников антропогенных загрязнений.

Образцы осадков собирают в специальные емкости, изготовленные из нейтральных материалов. Дождевая вода собирается при помощи воронки в мерный цилиндр (или непосредственно в ведро) и хранится в них до анализа.

Пробы воды из водопроводных сетей отбирают в целях определения общего уровня качества водопроводной воды, поиска причин загрязнения распределительной системы, контроля степени возможного загрязнения питьевой воды продуктами коррозии и др. для получения репрезентативных проб при отборе воды из водопроводных сетей соблюдают следующие правила:

- ◆ отбор проб проводят после спуска воды в течение 10 – 15 минут, времени, обычно достаточного для обновления воды с накопившимися загрязнителями;
- ◆ для отбора не используют концевые участки водопроводных сетей, а также участки с трубами малого диаметра (менее 1,2 см);
- ◆ при отборе вода должна медленно течь в пробоотборную емкость до её переполнения.

При выборе мест отбора *проб почвы* и их первичной оценки обычно учитывают два главных параметра:

- 1) размер (площадь) «элементарного» участка, с которого отбирают смешанный почвенный образец, отражающий средний уровень загрязнения почвы;
- 2) «ключевой» участок, являющийся наименьшей геоморфологической единицей ландшафта, в достаточной мере отражающей генезис (тип, подтип) свойств почв.

В пределах ключевого участка выделяют «элементарные участки», размеры которых зависят от расстояния до источника загрязнения почвы. Обычно руководствуются правилом: «чем дальше от источника, тем больше

должна быть площадь элементарного участка». Кроме того, в пределах определенного элементарного участка выбирают также «рабочую площадку», с которой и отбирают пробы почв для составления смешанного почвенного образца. Если размер элементарного участка сравнительно велик, а почвенный покров сложен, то в пределах этого участка выделяют несколько пробных рабочих площадок (обычно 2 – 3).

Данные параметры места пробоотбора выбирают индивидуально в зависимости от контурности почвенного покрова, рельефа местности, характера растительности и т.д. Ключевые участки ориентировочно намечают по карте (с учетом розы ветров), а затем уточняют их в поле. За оптимальный размер такой площадки обычно принимают площадь около 1 га (100 x 100 м).

1.2 Правила отбора проб

Отбор проб является существенным этапом при экоаналитическом контроле, так как результаты даже самого точного (и дорогостоящего) анализа теряют всякий смысл при неправильно проведенном отборе проб.

Для получения достоверной и надежной информации о содержании загрязняющих веществ отбор проб должен осуществляться так, чтобы анализируемые образцы были репрезентативными (представительными) для природных объектов. Представительными принято считать такие пробы, в которых содержание определяемых ингредиентов не изменяется при отборе проб, их хранении и транспортировке к месту анализа.

Проба, взятая для анализа, должна отражать типичные условия места и времени ее взятия. Отбор пробы, а также последующие хранение, транспортировка, пробоподготовка и аналитическая работа с ней должны проводиться так, чтобы не произошло заметных изменений в содержании определяемых компонентов или в свойствах содержащей ее среды (тары).

Соответственно цели анализа применяют *разовый* или *серийный* отбор проб.

При *разовом отборе* пробу берут один раз в определенном месте и рассматривают результат одного анализа. Этот способ применяется в редких случаях, когда результатов одного анализа достаточно для суждения о качестве исследуемой среды (при постоянстве ее свойств, например, в глубинных грунтовых водах или в случае первичных полевых оценок).

В большинстве случаев, когда этого недостаточно, применяют «*серийный отбор проб*», при котором каждая проба берется в связи с остальными. При анализе серии проб определяется изменение содержания наблюдаемых компонентов с учетом их места нахождения, времени отбора

или обоих этих факторов. В результате получают соответствующее количество результатов, которые статистически обрабатывают и оценивают. Полученные данные являются более правильными по сравнению с результатами разового отбора, а их точность зависит от числа проб в серии.

Особый тип серийного отбора представляют так называемые «согласованные пробы», которые отбирают в различных местах по течению реки или сточных вод с учетом времени прохождения воды от одного пункта до другого.

Отбор проб любых образцов должен производиться в соответствии с нормативными документами – рекомендациями, ГОСТами и пр., которые существуют отдельно для каждого объекта исследований (воды, атмосферного воздуха, почв). Так, например, для отбора проб воды – ГОСТ 31861-2012 Вода. Общие требования к отбору проб; для отбора проб почв – ГОСТ 28168-89.

Пробы подразделяются на *простые* и *смешанные*.

Простую пробу получают путем однократного отбора всего требуемого количества образца анализируемой среды. Анализ простой пробы дает сведения о составе среды в данный момент в одном месте.

Смешанную пробу получают, объединяя простые пробы, взятые в одном и том же месте через определенные промежутки времени или отобранные в различных местах обследуемого объекта. Ее получают смешением равных частей простых проб, взятых через равные промежутки времени в таком количестве, чтобы окончательный объем смешанной пробы соответствовал требованиям анализа. Однако этот простой способ пригоден только в том случае, если все точки исследуемого объекта равноценны, а его динамика равномерна.

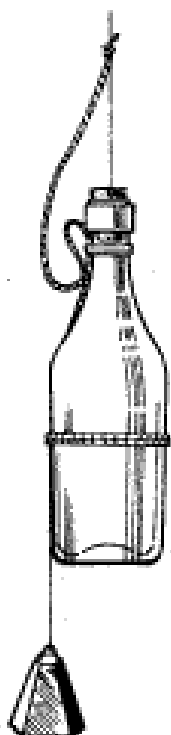
При взятии проб должны быть учтены количества, необходимые для исследования (*материала должно быть достаточно!*).

Количества направляемого материала для исследования различны - в зависимости от того, что подлежит исследованию: почвы – около 1 кг; воды – не менее 1,5 – 2 л и т.д.

Для отбора и хранения *проб воды* используются полиэтиленовые или стеклянные бутылки из прозрачного, бесцветного, химически стойкого стекла. Используемая посуда тщательно моется концентрированной соляной кислотой, синтетическими моющими средствами, водопроводной водой, а затем ополаскивается дистиллированной водой. Прежде чем брать пробу, посуду несколько раз споласкивают водой, подлежащей отбору.

Пробы воды на химический анализ отбирают с глубины 0,2– 0,5 м от поверхности воды эмалированным ведром, затем уже из ведра наполняют

сосуды для проведения химического анализа, биологических исследований. *Пробы для определения нефтепродуктов, СПАВ, фенолов, тяжелых металлов отбирают в отдельные емкости!*



При отборе проб воды на глубине используют батометры. Наиболее простой, который можно изготовить самим, – бутылочный. Для этого берут бутылку, и закрывают её пробкой. К пробке привязывают шнур, размеченный на метры, к которому привязывают ещё один шнур, другой конец которого завязывают вокруг горлышка бутылки. К бутылке подвешивается груз. Опустив бутылку на необходимую глубину, выдергивают из неё пробку. Бутылка заполняется водой из того слоя, в который она помещена. При поднятии бутылки вверх вода из вышележащих слоев войти в нее уже не сможет (Рис. 1.1).

Рис. 1.1 – Бутылочный батометр

Широкое применение нашли и батометры заводского изготовления — для отбора водных проб из озер, скважин, колодцев и т.д.

При отборе проб *донных отложений* пользуются дночерпателями различного объема (Рис. 1.2).

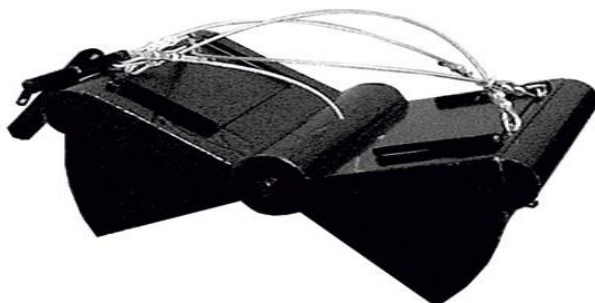


Рис. 1.2 – Дночерпатель для отбора проб донных отложений

Устройство состоит из ковша со стальными створками (от 2 до 40) и

дополнительного груза. Под действием веса дночерпатель заглубляется в грунт на 0,2 – 0,4 м, створки смыкаются и удерживают пробу.

При отборе *планктонных организмов* применяют планктонные сетки – конусовидный мешок из мельничного газа или капрона, нейлона. Сверху он прикрепляется к металлическому кольцу диаметром 25 см, снизу в отверстие конуса вставляется металлический стаканчик, заканчивающийся краником или резиновой трубкой с зажимом (Рис. 1.3).

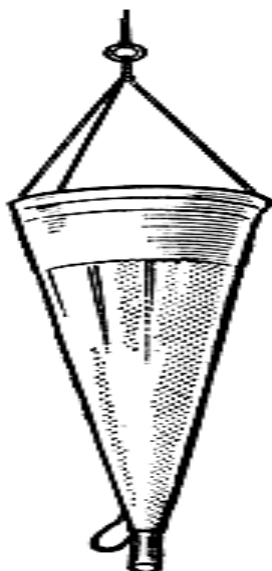


Рис. 1.3- Планктонная сеть

Для сбора организмов бентоса можно использовать плотный сачок. Диаметр входного отверстия сачка должен быть не менее 25 – 30 см, а длина матерчатого конуса — в 2,5 раза больше. Для изготовления сачка удобно использовать синтетический тюль с мелкой ячейей. Обыкновенная марля не годится из-за своей недостаточной прочности. Место крепления матерчатого конуса к обручу сачка рекомендуется обшить полоской плотной ткани – это продлит срок его службы. Сачок надёжно насаживается на рукоятку длиной 1,5 – 2 метра. После работы в водоёме его обязательно надо хорошо просушить (Рис. 1.4).

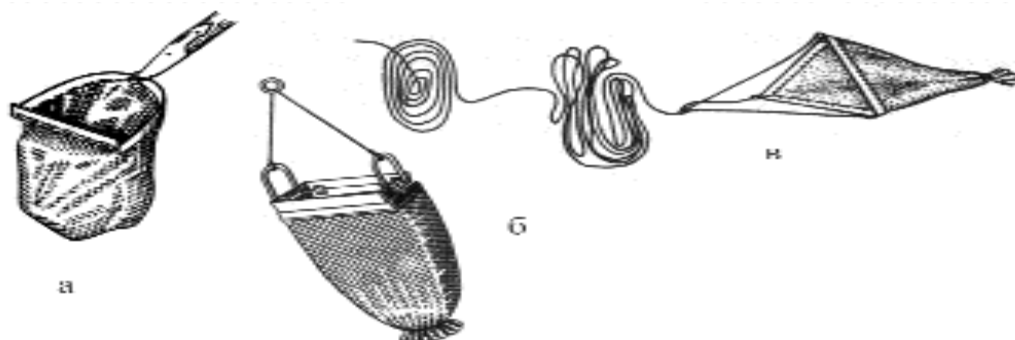


Рис. 1.4 – Скребок (а) и драги (б, в) для взятия проб грунта

Отбор *проб снега* проводят, вырезая керны на всю глубину (до земли), причем делать это целесообразно в конце периода обильных снегопадов. Для этого используются следующие вспомогательные устройства и материалы: снегомер, снегомерная рейка, полиэтиленовые пакеты вместимостью 10 – 12 дм³ или полиэтиленовое ведро с крышкой для проб снега; полиэтиленовая пленка – подкладка под крышку ведра.

Проба снега на каждом участке объединяет отдельные керны снега, взятые для определения в нескольких точках. Необходимо выбирать точки отбора так, чтобы пробы приблизительно характеризовали среднюю высоту снежного покрова на данном участке. При высоте покрова более 60 см количество кернов в пробе не должно быть меньше трех. Каждый керн снега вырезается на полную глубину снежного покрова. Следует избегать захвата снегомером частиц грунта. Перед ссыпанием снега в полиэтиленовое ведро или пакет необходимо тщательно очистить снежный конец снегомера и снежный керн от грунта и растительных включений. Разрешается уплотнение снега в ведре или пакете руками через полиэтиленовую пленку.

При отборе на участке фиксируются следующие данные: место отбора пробы (название участка), средняя высота снега, количество кернов, наличие или отсутствие проталин или оголенных участков вблизи места отбора пробы.

Для растапливания снег переносят в стаканы, при этом из него пинцетом выбирают и отбрасывают веточки, листья, хвою, траву и другие растительные остатки. Выбирать их с поверхности фильтра нельзя. Крупные одиночные растительные включения следует извлечь из талой воды в стакане, так как они не являются составной частью антропогенного загрязнения. Растапливание снега производится при комнатной температуре. Для ускорения процесса первые порции снега в стаканах можно слегка подогреть на водяной бане при температуре не выше 40 градусов. По мере накопления талой воды в стаканах ее сливают на фильтр. При этом необходимо следить, чтобы воронка была заполнена водой не более чем на $\frac{3}{4}$ высоты. Заполнение ее до краев и переливание не допустимы. При сливе воды следует придерживать снежный ком в стакане ложкой или стеклянной палочкой.

Фильтрованную воду разливают в полиэтиленовые бутылки и в таком виде талая вода готова к анализу.

Отбор проб почвы, предусматривающий получение характерного для контролируемого объекта (района) статистически усредненного образца, в принципе не представляет сложной задачи и редко является специфичной процедурой. Программу отбора составляют в зависимости от целей

исследования. Точечные пробы отбирают методом «конверта по диагонали» или другим способом, следя за тем, чтобы каждая проба представляла собой часть почвы, типичной для исследуемых почвенных горизонтов и ключевых участков.

Метод «конверта» является наиболее распространенным способом отбора смешанных почвенных образцов и чаще всего применяется для исследования почвы гумусового горизонта. При этом из точек контролируемого «элементарного» участка (или каждой рабочей пробоотборной площадки) берут 5 образцов почвы. Точки должны быть расположены так, чтобы мысленно соединенные прямыми линиями, давали рисунок запечатанного конверта (длина стороны квадрата может составлять от 2 до 5-10 м). Обычно при изучении почвы отбирают пробы гумусового горизонта с глубины около 20 см, что соответствует штыку лопаты. Из каждой точки отбирают около 1 кг (по объему около 0,5 л), но не менее 0,5 кг почвы. Точечные пробы обычно отбирают с помощью трубчатого пробоотборника послойно на глубине 0, 5 и 20 см массой до 0,2 кг (Рис. 1.5).

При оценке загрязнения почвы летучими соединениями или веществами с высокой способностью к вертикальной миграции (хлорорганические соединения, нитрозамины и т.п.) пробы отбирают по всей глубине почвенного профиля и помещают в герметично закрывающиеся емкости.



Рис. 1.5 – Пробоотборник штырьевой для отбора почвенных образцов

При отборе образцов должны быть соблюдены условия, ограждающие направляемый материал от загрязнения. Материал и образцы следует брать чистыми инструментами, закрывать склянки прокипяченными корковыми пробками и т.д. Вся тара с образцами снабжается этикетками и сопроводительной описью каждого пакета, банки и т.д.

Особое внимание обращается на фиксирование (сохранение от разложения) патологического материала. Если представляется возможным

(холодная погода, быстрая доставка в летнее время и т.д.), патологический материал лучше вообще не фиксировать. При необходимости фиксации материал заливают только ректифицированным спиртом и прилагают в таком случае «образец» фиксатора в количестве до 100 мл. Применение других фиксирующих веществ не допускается, т.к. они сами являются ядами (хлороформ) или разрушают некоторые яды (формалин).

Весь материал, подлежащий направлению на химико-токсикологическое исследование, должен быть упакован в чистую тару (стеклянную, глазурованную, деревянную, бумажную и др.). Объемистые образцы (сено, солома) могут быть упакованы в пакеты (если этот материал следует и для ботанического анализа, желательно, чтобы растения сохранили свою структуру). Обязательным условием упаковки является опечатывание всего направляемого материала с составлением одновременно акта отбора и отправления проб. О принятии материала лабораторией выдается расписка, а результаты анализа сообщаются в письменной форме через соответствующее время.

1.3 Подготовка проб к анализу. Методы исследований

Подготовка проб воды к проведению химического анализа включает:

- ✓ измерение температуры воды;
- ✓ определение прозрачности и цвета;
- ✓ определение запаха;
- ✓ определение рН.

Подготовка проб воды к определению нефтепродуктов состоит из следующих этапов:

- ✓ экстрагирование;
- ✓ разделение;
- ✓ определение на приборе.

К предварительной обработке проб снега предъявляют следующие основные требования:

- растапливанию и фильтрованию подлежит весь объем пробы,
- выполнение операции фильтрования следует проводить непосредственно в момент растапливания снега, так как при хранении талой воды в течение 4 – 5 часов на стенках сосуда, у поверхности, образуется несмываемая жирная пленка углеводородных соединений, захватывающая часть тонкодисперсной фракции твердых частиц, что приводит к непригодности пробы для анализа на углеводородные соединения и искажает истинное содержание в пробе других ингредиентов. Фильтр должен плотно прилегать к стенке воронки, во время фильтрования к нему прикасаться

нельзя. Во избежание повреждения фильтра следует предохранять его от попадания комков нарастающего снега.

Подготовка проб почв и грунтов

Свежеотобранная почва доводится до воздушно сухого состояния путем просушивания в хорошо проветриваемом (вентилируемом) помещении в течение 3 – 4 дней при комнатной температуре на рассеянном свете. Высушенная почва освобождается от посторонних включений (камни, корни растений и пр.) и просеивается через сито с диаметром отверстий 2 – 3 мм.

Методы исследований – это способы выделения и анализа структуры природных соединений.

Существуют следующие методы анализа:

- ✓ химические;
- ✓ физические;
- ✓ физико-химические;
- ✓ биологические.

Методы извлечения ядовитых веществ

Основные методы извлечения ядов – экстракция жидкостями, изоляция минерализацией и отгонкой с водяным паром.

В зависимости от растворимости ядовитых веществ для *экстракции* используют воду, ацетон, хлороформ, н-гексан и другие органические растворители.

Минерализацию осуществляют серной кислотой и пергидролем, соляной кислотой и калия хлоратом, а также методом сухого озоления.

Отгонку с водяным паром применяют для извлечения синильной кислоты, формальдегида, фенола, некоторых ХОС, ФОС и других веществ.

Перегонный аппарат состоит из парообразователя (круглодонная колба со стеклянной трубкой в пробке), отгонной колбы с двумя трубками в пробке (одна идет почти до дна от парообразователя, другая – короткая соединена с холодильником), водяного холодильника и приемной колбы. Навеску измельченного материала помещают в отгонную колбу, подкисляют слабой органической кислотой (щавелевой) и подключают кипящий парообразователь, после чего начинают подогревать отгонную колбу. Дистиллят собирают в приемную колбу. В первых его порциях можно определить синильную кислоту, в последующих – другие вещества.

Для количественного определения берут точную навеску материала и отгонку продолжают до тех пор, пока перестанет проявляться специфическая качественная реакция на ядовитое вещество. Полученный дистиллят объединяют, замеряют его объем и количественно определяют содержание вещества.

В основе метода *тонкослойной хроматографии* лежит разделение ядовитых веществ (хроматография), выполняемое на слое адсорбента, который нанесен на подложку (стеклянную пластинку). Это один из простых, достаточно чувствительных и доступных для практических лабораторий методов.

Основные этапы тонкослойной хроматографии включают:

- экстракцию (извлечение) ядовитых веществ из различных образцов;
- очистку экстрактов от посторонних примесей;
- концентрирование их;
- разделение на пластинке;
- проявление и количественное определение.

Экстракция – это процесс переноса растворенного вещества из одной жидкой фазы в другую (несмешивающуюся с ней). В качестве экстрагирующего растворителя берут обычно органические вещества, в которых хорошо растворяется яд. Например, для экстракции ХОС используют ацетон, н-гексан, петролейный эфир, бензол, хлороформ или их смеси; для ФОС – спирты, хлороформ, этилацетат.

Берут навеску измельченного объекта, заливают растворителем и проводят экстракцию в аппарате Сокслета, при помощи смесителей или путем простого настаивания в течение 12 – 14 часов (для разделения жидкостей используют делительные воронки различного объема).

Очистку экстрактов проводят методом омыления, сульфирования, распределения между двумя несмешивающимися жидкостями, осаждения жиров, восков и белков, колоночной хроматографии. Точность исследования зависит от правильно выбранного в каждом конкретном случае метода очистки экстрактов.

Омыление применяют при определении устойчивых к щелочному гидролизу препаратов. Например, нельзя омылять гексахлорциклогексан (ГХЦГ), ДДТ, производные мочевины, некоторые ФОС.

Сульфирование осуществляют в делительной воронке, где н-гексановый экстракт осторожно встряхивают с концентрированной серной кислотой или насыщенным раствором безводного сульфата натрия в концентрированной серной кислоте. Органический слой обрабатывают до тех пор, пока раствор сульфата натрия в серной кислоте не будет бесцветным.

Метод распределения между двумя несмешивающимися жидкостями основан на различии коэффициентов распределения ядовитых веществ и сопутствующих веществ между двумя несмешивающимися растворителями.

Для этого обычно используют н-гексан и диметилформаид или ацетонитрил.

Осаждение жиров и восков основано на плохой их растворимости в холодном ацетоне, для чего экстракт вымораживают в холодильнике или в приготовленных охлаждающих смесях со льда (снега) и различных солей (хлорида натрия, сульфата и карбоната натрия, нитрата аммония и натрия).

Осаждение белков осуществляют коагулирующей смесью, состоящей из 5г аммония, 10мл 85 %-ного раствора ортофосфорной кислоты и до 1л дистиллированной воды.

Колоночная хроматография проводится при помощи стеклянных колонок, заполненных силикагелем или диоксидом кремния.

Концентрирование экстрактов осуществляют при помощи вакуум - ротационного испарителя, испарением с капилляром под вакуумом на водяной бане, в токе воздуха на водяной бане.

Требование: не повышать температуру водяной бани выше 40⁰С и не упаривать досуха очищенные экстракты!

Разделение ядовитых веществ, содержащихся в концентрированном экстракте, проводят на пластинках с тонким слоем сорбента в хроматографических камерах с подвижным растворителем.

С этой целью можно использовать готовые пластинки отечественного и зарубежного производства («Диафол» – отечественные; «Силуфол» и «Силуфол УФ₂₅₄» – Чехия и др.) или приготовленные в лабораторных условиях. Стеклянные пластинки размером 9 x12, 13x18 или 20x20 см тщательно моют раствором кальцинированной соды, затем хромовой смесью, водопроводной и дистиллированной водой, затем сушат в вертикальном положении. Перед нанесением сорбционного слоя обрабатывают спиртом и эфиром.

Сорбционную массу готовят из силикагеля или окиси алюминия, которые закрепляют на пластинках крахмалом или гипсом.

Для получения слоя сорбента стандартной толщины используют специальные приборы или берут две чайные ложки сорбционной массы, наносят на пластинку и покачиванием равномерно распределяют по поверхности. Пластинки сушат при комнатной температуре и хранят в эксикаторе.

В качестве хроматографических камер используют стеклянные сосуды с плотно закрывающейся крышкой или эксикаторы, на дно которых наливают подобранный для каждого вещества подвижный растворитель (для разделения ХОС берут н-гексан, петролейный эфир, бензол, гептан и их смеси; для ФОС – хлороформ, гексан, ацетон и их смеси).

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте общий план изучения реки.
2. План описания водоема.
3. Правила отбора проб воды и донных отложений.
4. Правила отбора проб почвенных образцов.
5. Отбор проб водных организмов (фито- , зоопланктон, бентос).
6. Транспортирование проб в лабораторию.
7. Подготовка проб воды к проведению химического анализа.
8. Подготовка проб почв и грунтов к анализу.
9. Методы извлечения ядовитых веществ.
10. Суть тонкослойной хроматографии.

2 БИОТЕСТИРОВАНИЕ И БИОИНДИКАЦИЯ КАК МЕТОДЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ

2.1 Биотестирование – один из методов биологического анализа

Цель занятия: изучить особенности метода биотестирования.

Задачи: ознакомиться с целями и задачами метода биотестирования; правилами проведения биотестирования; основными группами тест-организмов, используемых в биотестировании.

Под *биотестированием* в узком смысле слова понимается экологическая оценка качества воды по реакции тест-организмов, помещаемых в испытываемую водную среду. В последнее время под биотестированием стали понимать регистрацию изменений любых биологических показателей (тест-функций) при действии токсических веществ на выбранные тест-объекты не только в лабораторных, но и в полевых условиях.

Биотестирование – это оценка вредоносности вод по выживаемости тест-организмов в лабораторных условиях.

Биотестирование позволяет оценить биологическую полноценность воды, её пригодность для жизни гидробионтов, обеспечивающих процессы самоочищения в водоеме. Биотестирование основано на определении изменения тест-реакции (показателей токсичности) у гидробионтов при экспозиции их в воде, отобранной в зоне влияния источника загрязнения (испытываемая вода) по сравнению с тест-реакциями гидробионтов при

экспозиции в воде, отобранной на условно чистом участке водного объекта (контроль). Результаты биотестирования природной воды указывают на наличие или отсутствие её токсичности для гидробионтов.

При оценке биологического действия веществ, загрязняющих водную среду, интактные гидробионты или их сообщества специально вводятся в испытываемую среду. Режим воздействия задается заранее.

Методы биотестирования оперативно сигнализируют об опасном воздействии химического загрязнения на жизнедеятельность водных организмов, причем не по отдельным компонентам, а по их смеси, часто неизвестной природы и не выявляемых другими методами анализа токсических веществ. Таким образом, они дают возможность наиболее полной информации при минимальных затратах на выполнение контрольных операций.

Задача биотестирования природной воды заключается в установлении наличия токсичности испытываемой пробы воды, отобранной на определенных участках водного объекта (пунктах, створах).

Биотестирование проводят для оценки токсикологического состояния водных объектов или их участков на основе систематических данных биотестирования отдельных проб воды, проверяют соответствие качества воды установленным нормам.

Для исследования общетоксикологических закономерностей применяются различные методы практически из любой сферы биологии и смежных научных областей. Обобщающей основой таких исследований оказывается воздействие химического агента на систему биологического происхождения. Это может быть биохимическая система, выделенный элемент клеточной структуры организма, различные показатели функции и структуры организма, интегральные характеристики организма, параметры, характеризующие состояние популяций, сообществ, организмов и экосистем. Активность переноса и трансформации токсического агента и последствия его действия определяются с применением химико-аналитических и биохимических методов, микроскопической, электрометрической техники, визуальными и вычислительными методами. Степень изменения каждого из параметров служит фактическим показателем токсического действия. Однако ценность каждого из показателей различна. Некоторые изменения со временем исчезают, значение параметра нормализуется. Изменение других хотя и сохраняется, для судьбы особи или популяции существенного значения может и не иметь.

Биотестирование включает:

— изучение связи «доза-эффект» на тест-объектах;

— изучение порога отклика, острые, подострые, хронические (короткие и продолжительные) опыты на генетическом, клеточном, организменном уровнях, зависимость продолжительности жизни от дозы вещества, влияние на плодовитость и потомство;

— изучение механизмов токсичности и процессов детоксикации.

Полученные в ходе реализации программ данные используются для:

а) установления степени загрязнения биотических компонентов среды токсическими веществами;

б) оценки нарушения состояния биотических компонентов и определения опасности для здоровья людей, животных, растений;

в) разработки мер контроля, стандартов качества, предельно допустимых концентраций (ПДК), предельно допустимых нагрузок (ПДН).

Методы биотестирования должны соответствовать следующим требованиям:

- быть применимыми для оценки любых экологических изменений среды обитания живых организмов;

- характеризовать наиболее важные параметры жизнедеятельности биоты;

- быть достаточно чувствительными для выявления даже начальных обратимых экологических изменений;

- быть адекватными для любого вида живых существ и любого типа воздействия;

- быть достаточно простыми и не слишком дорогостоящими для широкого использования.

Тест-объекты (тест-организмы) – это организмы, которые используются при биотестировании (водоросли, дафнии, инфузории и др.).

Тест-организмы должны удовлетворять ряду требований:

— быть легкодоступными в течение года и иметь экологическое или промысловое значение;

— должны быть одного размера и возраста, так, чтобы снизить возможные различия чувствительности, связанные с этими показателями.

Для целей токсикологического нормирования применяются системы организмов и их характеристики, отбираемых по строго обоснованным принципам.

В схему должны быть включены представители таких групп гидробионтов, которые играют ведущую роль в общем круговороте вещества в водоеме. Сюда относятся организмы, ответственные за самоочищение, производящие первичную продукцию, осуществляющие трансформацию вещества и энергии в водных экосистемах.

Для биотестирования используют лабораторные культуры гидробионтов и природные популяции. Чтобы получить надежную токсикологическую оценку, биотестирование следует проводить с помощью набора биотестов. Это связано с различной чувствительностью тест-объектов к загрязняющим веществам. Пробу воды считают токсичной, если токсическое действие на гидробионтов обнаружено хотя бы на одном биотесте.

Приступая к опытам, важно знать параметры гидрохимического режима водоема: рН, O₂, жесткость, отношение ионов кальция к ионам магния и др.

Результаты биотестирования надежны только при соблюдении оптимальных условий жизнедеятельности используемых гидробионтов. При несоответствии параметров целесообразно проводить биотестирование на природных популяциях, которые адаптированы к гидрохимическим параметрам воды данного водного объекта.

Существенную роль в биотестировании играет выбор не только тест-организма, но и *тест-реакции* – того параметра организма, который регистрируется при наблюдении.

Наиболее распространенные тест-объекты среди гидробионтов:

1. Редуценты, участвующие в самоочищении (ответственные за самоочищение):

— микроорганизмы (сапрофиты, олиготрофы, денитрификаторы, аммонификаторы и др.);

— простейшие (инфузория-туфелька *Paramecium caudatum*; тетрахимена *Tetrachymena pyriformis*)

2. Продуценты:

а) 1-клеточные водоросли: хлорелла *Chlorella vulgaris*; сценедесмус *Scenedesmus quadricauda*;

б) высшие растения: ряска *Lemna minor*; элодея *Elodea canadensis*.

3. Консументы:

а) зоопланктон: дафнии *Daphnia magna*; *Ceriodaphnia affinis*; гаммарусы *Gammarus lacustris*;

б) зообентос: черви-олигохеты *Limnodrilus hoffmeisteri*; личинки насекомых – хирономиды *Chironomus plumosus*; моллюски: *Planorbis planorbis*, *Lymnaea stagnalis*.

4. Рыбы: гуппи *Lebistes reticulata*; карп *Cyprinus carpio*; данио *Branchydanio rerio*.

Кроме воды методом биотестирования можно изучить фитотоксические свойства *почвы*. Для этого используют семена различных овощных (лук, редис, кресс-салат), зерновых культур (овес), травянистых злаковых растений (овсяница луговая, тимофеевка луговая и др.) (Рис. 2.1 – 2.3).

Помимо растений, для определения токсичности почв можно использовать и животных. Хорошо разработанным является тест, в котором в качестве тест – организма используется компостный червь *Eisenia foetida*. Вместо этого вида можно использовать также обычного дождевого червя (Рис. 2.4).



Рис. 2.1 – Кресс-салат *Lepidium sativum*



Рис. 2.2 – Овсяница луговая *Festuca pratensis*



Рис. 2.3 – Тимофеевка луговая *Phleum pratense*



Рис. 2.4 – Дождевой червь *Lumbricus castaneus* (поверхностно-обитающий)
Lumbricus rubellus (почвенно-подстилочный)

2.2 Понятие о биоиндикации

Цель занятия: изучить особенности метода биоиндикации.

Задачи: ознакомиться с основными видами биоиндикации и биоиндикаторов; изучить морфологические изменения растений, используемых для биоиндикации.

Понятие о биоиндикации

Метод оценки абиотических и биотических факторов местообитания при помощи биологических систем называют *биоиндикацией*. В основу метода биоиндикации положена зависимость живых организмов от условий окружающей среды.

Лабораторные эксперименты при контролируемых условиях необходимы для получения основных сведений, касающихся ответной реакции организма, который должен быть использован для биомониторинга (длительный контроль за биологическими показателями – состав видов, численность, биомасса, темп роста и т.д.). Может производиться индикация природных условий местообитания в целом, в сельском хозяйстве или лесном по присутствию растений, характерных для определенного экотопа.

Виды биоиндикаторов и требования к их отбору

В соответствии с этим организмы или сообщества организмов, жизненные функции которых так тесно коррелируют с определенными факторами среды, что могут применяться для их оценки, называют *биоиндикаторами*.

Многие тест-организмы служат биоиндикаторами, которые в естественных условиях обнаруживают присутствие в какой-либо изучаемой среде загрязняющих веществ.

Выделяют *два типа биоиндикаторов:*

— весьма чувствительные, реагирующие очень резко (у них наблюдаются видимые повреждения или особое поведение);

— более устойчивые, но способные к аккумуляции значительных количеств загрязняющих веществ.

Биоиндикатор может реагировать либо специфическим образом на некоторый существующий тип имиссии, либо неспецифически на ряд или комплекс загрязнителей.

Чувствительные биоиндикаторы – организмы, у которых наблюдаются значительные отклонения жизненных проявлений от нормы.

Аккумулятивные биоиндикаторы – организмы, накапливающие антропогенные воздействия без быстро проявляющихся изменений.

Кроме этого, различают также *прямые* и *косвенные биоиндикаторы*.

Прямые индикаторы непосредственно связаны с объектом индикации, т.е. с конкретным условием среды и зависят от него. Например, крапива двудомная может произрастать только на плодородных почвах, содержащих достаточное количество азота, а такие растения как верблюжья колючка, солодка – в засушливых зонах. Их корневая система показывает глубину залегания грунтовых вод, направление их движения, степень минерализации воды.

Косвенные индикаторы напрямую не связаны с объектом индикации, но они указывают на условия, сближенные с интересующим человека объектом. Так, в ореоле рассеяния урановых месторождений лепестки кипрея узколистного (иван-чая) вместо розовых становятся белыми. Растущие в тех же условиях астрагалы являются прямыми индикаторами селена. Но обычно селен приурочен к урановым рудам, поэтому астрагалы – косвенные индикаторы последних.

Абсолютно достоверным индикатором считается тот, которому в 100% случаев соответствует объект индикации. Индикатор надежен, если это отношение 90%, а показатель больше 9. Если показатель в пределах 3 – 9, то это удовлетворительный индикатор; 1,5 – 3 – сомнительный; меньше 1,5 – индикация невозможна.

Биоиндикаторы должны обеспечить получение информации о количестве имиссионной нагрузки и изменениях её уровня с течением времени.

Наиболее важными *требованиями при отборе таких индикаторов* являются:

- широкое географическое распространение: если данный вид не встречается по всей территории района, проводится мониторинг, то следует использовать аналогичный вид или сообщество с одинаковыми экологическими потребностями;

- обеспечение достаточного количества для получения результатов, имеющих статистическую значимость;

- знание аутэкологии и синэкологии;

- желательно генетическое однообразие;

- необходимо учитывать функцию в экосистеме, в частности, роль в пищевой цепи.

Внутри организма наблюдается определенное соподчинение реакций, возникающих в ответ на какой-либо антропогенный фактор – основа для первичной биоиндикации.

В зависимости от времени развития биоиндикационных реакций выделяют 6 типов чувствительности:

1 тип – биоиндикатор проявляет реакцию спустя определенное время, в течение которого он никак не отвечал на воздействие, одноразовую сильную реакцию и теряет чувствительность;

2 тип – реакция внезапная и сильная, продолжается известное время, а затем резко исчезает;

3 тип – биоиндикатор реагирует с момента появления нарушающего воздействия с одинаковой интенсивностью в течение длительного времени;

4 тип – после сильной немедленной реакции наблюдается её затухание, сначала быстрое, потом медленное;

5 тип – при появлении нарушающего воздействия начинается реакция, становящаяся все более интенсивной, пока не достигает максимума, а затем постепенно затухает;

6 тип – реакция пятого типа неоднократно повторяется.

Виды биоиндикации

Биоиндикация возможна на различных стадиях развития организмов – на внутриклеточном, клеточном уровнях, тканях, отдельных органах, организмах, популяциях, биоценозах, экосистемах.

В природе все виды биоиндикации включены в цепочку реакций или процессов. Если антропогенный фактор действует непосредственно на биологический элемент, то речь идет о *прямой биоиндикации*; если под влиянием других затронутых элементов – о *косвенной биоиндикации*.

При биоиндикации изменения биологической системы всегда зависят от антропогенных и природных факторов среды. Эта система реагирует в соответствии со своей предрасположенностью (условия питания, возраст).

Формы биоиндикации:

- *специфическая* – происходящие изменения можно связать с одним фактором;

- *неспецифическая* – две одинаковые реакции вызываются различными антропогенными факторами или одна и та же реакция наблюдается под воздействием многих факторов (загрязнителей).

Среди большого разнообразия объектов, использующихся в биоиндикации почвенной среды, наибольшее применение находят дождевые черви, моллюски, многоножки, жуки и т. д. Наряду с ними используют растения – лишайники, мхи, грибы. Так, например, эпифитные лишайники –

традиционный объект экологического мониторинга и биоиндикации химического загрязнения окружающей среды. Их высокая чувствительность к загрязнению определяется большой продолжительностью жизни отдельного слоевища, отсутствием органов водо- и газообмена, сильной зависимостью от физических свойств среды. Например, применение лишайников, грибов, мхов для оценки степени загрязнения зоны Чернобыльской АЭС Sr_{90} , $Cs_{134,137}$. По присутствию тяжелых металлов используются почвенные беспозвоночные – (дождевые черви, моллюски, многоножки, жуличицы); они отражают фактический уровень содержания металлов в среде обитания независимо друг от друга.

При оценке влияния токсического загрязнения на водные биосообщества непосредственно на водоеме наиболее широко применяются приемы, основанные на учете видового состава сообщества водоема.

Разнообразие по числу видов или по соотношению численности увеличивается по мере удаления от источника загрязнения и по мере возрастания стабильности условий среды. Видовое разнообразие сообщества рассматривается как мера его структуры и устойчивости. Иногда под видовым разнообразием подразумевают просто число видов.

Для оценки содержания в воздухе токсичных примесей наиболее целесообразно использовать различные растения, как травянистые, так и древесные. Они осуществляют в десятки раз более интенсивный газообмен в сравнении с животными и человеком, обладают большой чувствительностью и стабильностью реакций в ответ на воздействие внешних факторов. Установлено, что высокую чувствительность к атмосферным загрязнителям имеют растения, которые поселяются на стволах деревьев (эпифиты). К ним относятся многие виды лишайников, мхов. Они погибают даже при минимальном содержании в воздухе газообразных и пылевидных примесей, на которые высшие растения не реагируют. Способность поглощать из воздуха и накапливать различные вещества способствовало развитию такого направления биоиндикации как лишайноиндикация – определение степени загрязнения природной среды с помощью лишайников. Пылегазовое загрязнение атмосферы оказывает заметное влияние на цвет, форму, структуру слоевищ лишайников. К примеру, вдали от источников загрязнения многие лишайники окрашены ярко. По мере приближения к источнику загрязнения цвет лишайника тускнеет, появляются серые, коричневые или фиолетовые оттенки. Наиболее уязвимы при загрязнении воздуха кустистые лишайники, за ними следуют листоватые. Самыми выносливыми являются накипные (Рис. 2.5 – 2.7).



Рис. 2.5 – Кустистый лишайник Кладония оленья *Cladonia rangiferina*



Рис. 2.6 – Листоватый лишайник Пармелия бороздчатая *Parmelia sulcata*



Рис. 2.7 – Накипный лишайник Леканора разнообразная *Lecanora allopurana* (Ach.)

Индикация с помощью лишайников позволяет эффективно и без особых затрат оценить качество среды обитания и создать систему «экологических требований» на разных уровнях. Исчезновение лишайников – это сигнал, указывающий на неудовлетворительное качество атмосферного воздуха.

Морфологические изменения растений, используемых для биоиндикации

Макроскопические изменения растений

• Изменение окраски листьев (неспецифическая реакция на различные стрессоры):

* хлороз – бледная окраска листьев между жилками (сосна хвой при действии различных газов);

* пожелтение краёв или определенных участков листьев (у лиственных деревьев под влиянием хлоридов);

* покраснение (у смородины под действием SO_2);

* побурение или побронзовение (у сосен, елей – дымовые повреждения);

* серебристая окраска поверхности листьев.

• *Некрозы* – отмирание ограниченных участков ткани:

* точечные и пятнистые – отмирание тканей листовой пластинки в виде точек или пятен (у табака под воздействием озона);

* межжилковые – отмирание листовой пластинки между боковыми жилками (воздействие SO_2);

* краевые некрозы (у лип под действием соли, применяемой для таяния льда);

* сочетание межжилковых и краевых некрозов (приводит к появлению узора типа «рыбьего скелета»);

* верхушечные некрозы (у однодольных и хвойных – темно-бурые некрозы кончиков хвой пихты и сосны после воздействия SO_2);

* некрозы околоплодника (на семячковых плодах, вблизи цветков после воздействия SO_2) (Рис. 2.8).

При развитии некрозов сначала наблюдаются изменения в окраске (при действии SO_2 чаще всего образуются грязно-зеленые, пероксиацетилнитрата – пропитанные водой, O_3 – металлически блестящие пятна, хлоридов – хлорозы). После гибели клеток пораженные участки оседают, высыхают и могут за счет выделения дубильных веществ окрашиваться в бурый цвет (часто у деревьев) или спустя несколько дней выцветать до беловатой окраски (тюльпаны, лук, гладиолусы, зерновые культуры). Количественная оценка некрозов – определение процентной доли поврежденной листовой поверхности.

			
<u>Точечные</u>	<u>Пятнистые</u>	<u>Межжилковые</u>	<u>Краевые</u>
			
<u>Тип «Рыбьего скелета»</u>	<u>Верхушечные</u>	<u>Верхушечные</u>	<u>Параллельные</u>

Рис. 2.8 – Виды некрозов листовых пластинок и хвои

- Преждевременное увядание (под действием этилена в теплицах).
- Опадение листьев (дефолиация) – после появления некрозов или хлорозов (у крыжовника, смородины – SO_2 , осыпание хвои у ели). Дефолиация приводит к сокращению ассимилирующей поверхности, к сокращению прироста, а иногда к растормаживанию почек и преждевременному образованию новых побегов. У хвойных пород легко определить возраст хвои, т.к. прирост побегов у них идёт строго ритмично (оценивается процент сохранившейся хвои на участке побега, соответствующем данному годичному приросту).
- Изменение формы, количества и положения органов (аномальная конфигурация листьев (лиственные деревья после радиоактивного облучения). В результате некрозов возникает уродливая деформация, искривление побегов, сращение или расщепление отдельных органов, увеличение или уменьшение в числе частей цветка, смена пола и другие аномалии.
- Изменение направления, формы роста и ветвления – изменение направления роста корней у одуванчика при изменении уровня грунтовых вод, изреживание кроны поврежденных дымом хвойных пород.
- Изменение прироста – измеряют главным образом изменение радиального прироста древесных стволов, прироста в длину побегов и листьев, длины корней, диаметр таллома лишайника.
- Изменение плодовитости – уменьшение образования плодовых тел у лишайников, продуктивности у черники и ели в загрязненной газообразными выбросами атмосфере.

Микроскопические изменения

- изменения размеров клетки – уменьшение клеток эпидермиса листьев (газообразное загрязнение);
- изменения субклеточных структур – блокирование плазмодесм,
- расширение цистерн ЭПС (в различных мембранах фасоли под действием цинка);
- плазмолиз – отслаивание плазмы от клеточной стенки (действие кислоты и SO₂ на еловую хвою);
- изменение степени ксероморфизма листьев – увеличение числа устьиц, толщины кутикулы, густоты опушения при воздействии газообразных выбросов;
- изменение структуры древесины – исчезновение годичных колец у мягкодревесных пород под влиянием NaCl; одревеснение корней злаков при обработке гербицидами.

По степени устойчивости к антропогенному воздействию среди древесных пород можно выделить:

- ◆ неустойчивые – сосны (все виды), пихта сибирская, ель обыкновенная, ель сибирская;
- ◆ малоустойчивые – можжевельник обыкновенный, барбарисы (все виды);
- ◆ относительно устойчивые – береза повислая, береза пушистая, осина, яблони и др.;
- ◆ устойчивые – калины (все виды), липа мелколистная, туя западная, дуб обыкновенный и др.
- ◆ весьма устойчивые - ясень зеленый, роза морщинистая и др.

Вопросы для самоконтроля

1. Дать определение метода биотестирования.
2. Охарактеризовать цели и задачи биотестирования.
3. Правила проведения биотестирования.
4. Перечислить основные тест-организмы, используемые при биотестировании.
5. Дать определение метода биоиндикации.
6. Перечислить основные типы биоиндикации и видов-биоиндикаторов.
7. Охарактеризовать морфологические изменения растений-биоиндикаторов.
8. Дать характеристику микроскопическим изменениям растений-биоиндикаторов.

3 ЗАВИСИМОСТЬ «ДОЗА, КОНЦЕНТРАЦИЯ, ВРЕМЯ И ЭФФЕКТ»

(расчетно-графическая работа)

Цель занятия: изучить зависимости «доза, концентрация, время и эффект».

Задачи: изучить зависимость эффекта от концентрации; зависимость эффекта от времени воздействия токсиканта; научиться по графику определять диапазон концентраций и время наступления гибели организмов.

Для количественной оценки химических соединений решающее значение имеют *3 вида зависимостей*: доза-эффект; доза-время; время-эффект. Наиболее изученная – доза-эффект. Ее прослеживают от верхней границы токсичности (смертельных доз и концентраций) до невызывающих регистрируемого эффекта. Важно установить степень зависимости при разных уровнях воздействия. С возрастанием дозы и увеличением времени действия вещества эффект обычно возрастает.

Действие двух или нескольких различных доз или концентраций вещества на один и тот же показатель сравнивается на один и тот же срок воздействия.

Под временем или сроком воздействия подразумевается период, в течение которого организм находится под воздействием токсического вещества. Изменение показателя во времени прослеживается обычно при действии одной и той же дозы или концентрации. Однако в связи с практической необходимостью все чаще используются воздействия переменными концентрациями. Возможны прерывистые воздействия, при которых организм оказывается то в растворе вещества, то в чистой среде; интермиттирующие воздействия, при которых концентрация вещества то снижается, то повышается; а также воздействия с постоянно либо нарастающей, либо снижающейся концентрацией.

С уменьшением дозы или концентрации для получения равного токсического эффекта обычно необходимо увеличение времени воздействия. Исключение составляют яды, которые действуют по пороговому принципу, действие которых проявляется лишь по достижении определенного порога накопления вещества в тканях. Срок наступления эффекта при этом остается более или менее постоянным. Второе исключение представляет так называемый *парадоксальный эффект* – частичное ослабление токсического эффекта при возрастании срока действия токсиканта в некотором временном диапазоне или при повышении его концентрации.

Для описания связи между эффектом E , концентрацией C и временем T предлагались уравнения различного вида, имеющие вид различных кривых (гипербола, парабола и пр.).

Кривые «доза-эффект» и «время-эффект» представляют собой вариации кривой распределения организмов или отдельных функций по их устойчивости к токсическому воздействию в интегральной форме. В таком распределении в первые сроки или при наименьших концентрациях выявляется эффект для наименее чувствительных особей. Более устойчивые особи или показатели оказываются подверженными воздействию больших доз или в более отдаленный период времени.

При построении графических изображений связи этих параметров используют обычно пару параметров при постоянном значении третьего. Они могут выражать *зависимость эффекта от концентрации* действующего фактора при учете на один и тот же срок (например, на 30 сутки).

Зависимость эффекта от времени может быть описана для одной и той же концентрации. В системе координат «концентрация-время» графически может быть показан срок наступления определенного эффекта токсического вещества (например, гибели 50 % организмов).

Кривые «доза-эффект» и «время-эффект» представляют собой вариации кривой распределения организмов или отдельных функций по их устойчивости к токсическому воздействию в интегральной форме. В таком распределении в первые сроки или при наименьших концентрациях выявляется эффект для наименее чувствительных особей. Более устойчивые особи или показатели оказываются подверженными воздействию больших доз или в более отдаленный период времени.

При построении графических изображений связи этих параметров используют обычно пару параметров при постоянном значении третьего. Они могут выражать *зависимость эффекта от концентрации* действующего фактора при учете на один и тот же срок (например, на 10 сутки) (Рис. 3.1).

Зависимость эффекта от времени может быть описана для одной и той же концентрации. В системе координат «концентрация-время» графически может быть показан срок наступления определенного эффекта токсического вещества (например, гибели 50 % организмов) (Рис. 3.2).

Помимо нормальных шкал в таких графиках используются шкалы логарифмические и пробит-координаты. В логарифмах чаще всего выражаются концентрационные зависимости эффекта. Предполагается, что в лог-пробитных координатах кривая зависимости эффекта от концентрации превращается в прямую и эта уверенность дает возможность выявлять такую связь лишь по двум точкам, полученным в эксперименте.

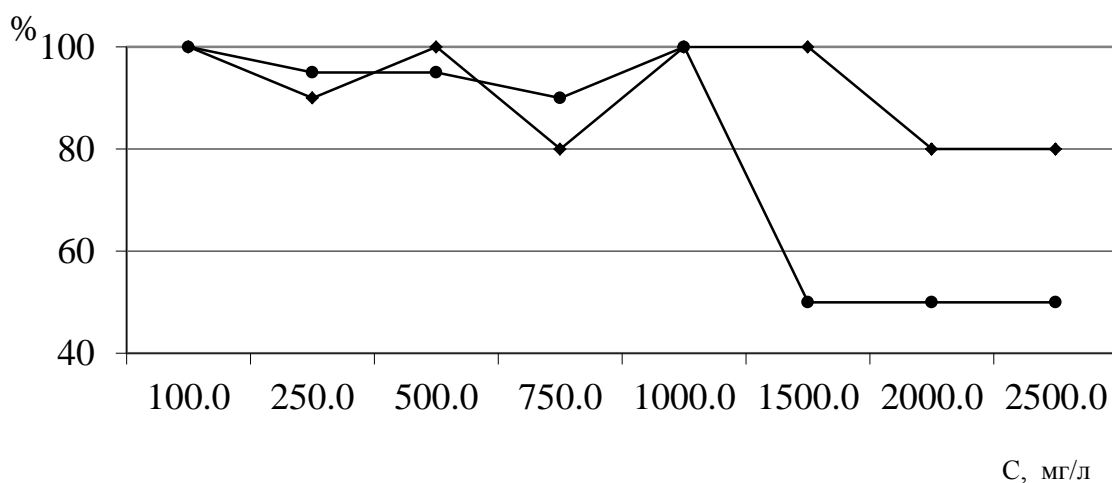


Рис 3.1 – Выживаемость *Planorbis planorbis* в опытах с ингибитором коррозии ИКБ-2-2

◆ 4 сутки ● 10 сутки

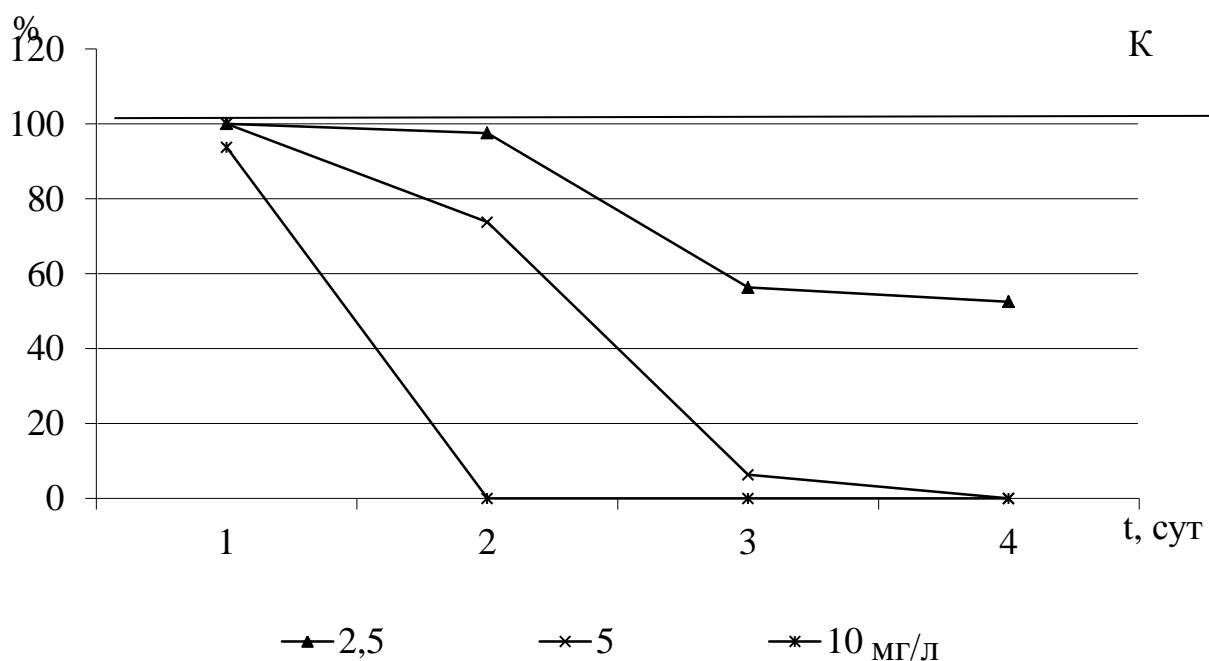


Рис. 3.2 – Выживаемость *Planorbis planorbis* в остром опыте с ингибитором коррозии ИКБ-6-2

Описываемая связь эффекта с концентрацией и временем действия в токсикологии часто нарушается. В реальности эта закономерность имеет более сложный характер и выражается в фазности. В диапазоне относительно

малых концентраций или кратковременных воздействий отмечаются диапазоны как угнетающие, так и стимулирующие. Выявляются следующие фазы реакции организма на токсическое воздействие со временем:

- период безразличия или некоторого нарушения функций;
- период нормализации или даже стимуляции;
- период финальных нарушений.

Эта последовательность реакций перекликается с концепцией адаптивного синдрома, в котором выделяются фазы «тревоги, компенсации, истощения» в ответе организма на неблагоприятное воздействие.

Указания к выполнению расчетно-графической работы

Расчетно-графическая работа выполняется каждым студентом самостоятельно по индивидуальному заданию, предложенному преподавателем. Каждое задание включает табличный материал и предполагает построение графиков зависимости выживаемости тест-организмов или изменение какой-либо тест-функции при действии токсикантов: ингибиторов коррозии - ингибитор коррозии башкирский: ИКБ-6-2 и ИКБ-2-2 – используемых для обработки оборудования при нефтедобыче и транспортировке нефти; буровых шламов – отходов бурения; органических соединений – толуоловой и бензойной кислот, диоксалана. В таблицах указаны данные экспериментов, которые сравниваются с данными контрольного варианта. В качестве контроля использована водопроводная вода, отстаиванная не менее 7 – 10 суток.

Последовательность выполнения задания заключается в следующем:

1. Значения любых показателей (выживаемость, количество клеток водорослей, изменение длины побега растения и пр.) следует выразить в процентах по отношению к контролю и занести в таблицу.
2. Построить график зависимости эффекта от концентрации.
3. Построить график зависимости эффекта от времени.
4. На основании выполненных графиков определить диапазон концентраций (максимально допустимую, пороговую, эффективные или летальные (LC_0 , LC_{50} , LC_{100} или EC_0 , EC_{50} , EC_{100} – в зависимости от изучаемой функции) на последние сутки опыта (4, 7, 10 или 30 – в зависимости от задания).
5. Определить время наступления гибели (или изменения какой-либо тест-функции) организмов - LT_{50} , LT_{100} (или EC_{50} , EC_{100}).
6. Сделать соответствующие выводы.

Для точности выполнения расчетов построение графиков целесообразно выполнять на миллиметровой чертежной бумаге. При выполнении графиков

для обозначения различных величин допускается использование разнообразных видов штриховки, а также изображение линий цветными карандашами, тушью, фломастерами и пр.

Вопросы для самоконтроля

1. Что понимают под временем или сроком воздействия?
2. Что означает понятие «парадоксальный эффект»?
3. Что представляет собой зависимость «доза-эффект»?
4. Что представляет собой зависимость «время-эффект»?

4 МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ТОКСИКОЛОГИИ

Цель занятия: ознакомиться с основными математическими методами, используемыми в токсикологии.

Задачи: изучить метод вариационной статистики.

Биометрия – наука о статистическом анализе массовых явлений в биологии, т.е. таких явлений, в массе которых обнаруживаются закономерности, не выявленные на единичных случаях наблюдений.

Термин «биометрия» ввел в науку Ф. Гальтон в 1889 г., имея в виду новое научное направление в биологии, связанное с применением математических методов в исследовательской работе.

Содержанием биометрии является планирование наблюдений и статистический анализ их результатов.

Предметом биометрии служит любой биологический объект, если проводимые над ним наблюдения получают количественное выражение.

Наблюдения над биологическими объектами проводят по тем или иным признакам, т.е. таким характерным особенностям в строении и функциях живого, по которым можно отличить одну единицу от другой, сравнивая их между собой.

Все биологические признаки варьируют, т.е. изменяются, от случая к случаю в определенных пределах. Колебания величины одного и того же признака, наблюдаемые в общей массе его числовых значений, называется *вариациями*, а отдельные числовые значения варьирующего признака – *вариантами*.

В токсикологии наиболее часто используют метод статистики, основанный на вычислении критерия достоверности, сравниваемого затем с табличными данными (критерием достоверности Стьюдента).

Для этого рассчитывают:

- среднюю арифметическую X , являющуюся центром распределения, вокруг которого группируются все варианты статистической совокупности

$$X = \sum X_i/n; \quad (4.1)$$

где X -среднее арифметическое,

X_i – различные варианты,

n – общее количество вариантов;

- среднее квадратическое отклонение G , представляющее корень квадратный из дисперсии:

$$G = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{n-1}}, \quad (4.2)$$

где G – среднее квадратичное отклонение,

n – общее число вариантов;

- ошибку выборочной среды m – величину отклонения выборочного показателя от его генерального параметра:

$$m = \pm \frac{G}{\sqrt{N}}, \quad (4.3)$$

где m – ошибка средней;

- критерий достоверности различий, наблюдаемых между выборочным средним опыта и контроля:

$$t = \frac{(X - X)}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}, \quad (4.4)$$

где t – критерий достоверности сравнивают с теоретическим t – критерием Стьюдента.

В исследовательских работах обычно принимается 5 %-ный уровень значимости, который отвечает вероятности $P = 0,05$. В более ответственных случаях применяются 1% и 0,1%-ный уровни значимости, соответствующие $P = 0,01$ и $P = 0,001$ соответственно.

Уровень значимости – это значение вероятности, при котором различия, наблюдаемые между выборочными показателями, можно считать несущественными, случайными.

Задание. Провести математическую оценку результатов исследований токсичности ингибиторов коррозии по отношению к ветвистоусым рачкам *Daphnia magna*, используя данные таблицы 4.1.

Таблица 4.1 – Изменение выживаемости дафний при действии ингибиторов коррозии

Сутки опыта	Концентрация ИКБ-6-2, мг/л					
	Контроль	0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
1	100	100	100	90	85	80
2	100	100	95	87	80	73
4	100	100	90	55	35	15
Сутки опыта	Концентрация ИКБ-2-2, мг/л					
	Контроль	0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
1	100	100	100	97	93	90
3	100	100	97	90	85	80
5	100	100	90	85	60	35

5 ОЦЕНКА КАЧЕСТВА АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА Г. ТЮМЕНИ ПО МОРФОМЕТРИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ ВЫСШЕЙ РАСТИТЕЛЬНОСТИ (лабораторная работа)

Цель занятия: научиться использовать метод биоиндикации в оценке качества атмосферного воздуха.

Задачи: ознакомиться с методикой отбора образцов (травянистых растений, листьев с древесных культур) для проведения исследований; провести оценку полученных результатов.

Для определения качества атмосферного воздуха в г. Тюмени (другом населенном пункте) необходимо наметить точки отбора растительных образцов. Желательно, чтобы они находились в различных районах города, с учетом антропогенного воздействия, а также за чертой города (контроль).

Для этого можно использовать как травянистые растения (одуванчик лекарственный *Taraxacum officinale*, подорожник большой *Plantago major*), так и деревья (листья березы повислой *Betula pendula*, тополя бальзамического *Populus balsamifera*, яблони сибирской *Malus sibirica*, клена американского *Aceraceae pequundo* и пр.).

В каждом районе наблюдений отбирают по 30 растений одуванчика и подорожника и по 30 листьев с пяти деревьев. Листья следует собирать с нижних ветвей кроны дерева, на высоте 2 м, в зоне дыхания человека.

У травянистых растений учитывают следующие морфометрические показатели:

- количество листьев;
- высоту растений;
- длину и ширину листовых пластинок;
- длину корня.

У листьев березы, тополя, яблони учитывают такие морфометрические показатели, как:

- длину и ширину листовых пластинок;
- длину черешков;
- количество зубчиков на листовой пластинке;
- площадь листа.

Определение площади листьев у древесных растений проводят по методу, где предварительно для древесной породы определяют переводной коэффициент, а затем путем измерения длины и ширины листа производят массовые вычисления площади листьев (Федорова, Никольская, 2001).

Установление переводного коэффициента основано на сравнении массы квадрата бумаги с массой листа, имеющего такую же длину и ширину. Для этого берут бумагу в клеточку и очерчивают квадрат, равный длине и ширине листа, а затем аккуратно обрисовывают его контур. Вычисляют площадь квадрата бумаги, вырезают и взвешивают его, затем вырезают контур листа и также взвешивают.

Из полученных данных вычисляют переводной коэффициент по формулам: $K = S_{\text{л}} / S_{\text{кв}}$ (5.1)

$$S = (P_{\text{л}} \cdot S_{\text{кв}}) / P_{\text{кв}} \quad (5.2)$$

где: K - переводной коэффициент,

S – площадь листа (л) или квадрата бумаги (кв),

P – масса квадрата бумаги или листа.

Вычисление коэффициента производится на основании измерения 7-8 листьев. Таким же расчетом он устанавливается отдельно для каждого вида растений. Для березы он равен – 0,64; для яблони – 0,71–0,72; для тополей – 0,60- 0,66.

Затем измеряют длину (A) и ширину (B) каждого листа и умножают на переводной коэффициент (K):

$$S_{\text{листа}} = A \cdot B \cdot K \quad (5.3)$$

Измерения производят с помощью линейки. Данные заносят в таблицы. По окончании измерений производят статистическую обработку полученных результатов. По изменению морфометрических показателей дают оценку качества атмосферного воздуха данного населенного пункта, строят графики, определяют менее и более загрязненные территории.

Задания:

1. Перед проведением лабораторной работы отобрать образцы травянистых растений и древесных культур в разных микрорайонах г. Тюмени согласно методике.

2. Непосредственно на занятии произвести морфометрические измерения отобранных образцов.

3. Данные занести в таблицу 5.1, отдельно по каждому району наблюдения.

4. Произвести математическую обработку полученных результатов.

5. По данным исследований выявить:

а) наиболее загрязненный и чистый микрорайон города;

б) наиболее чувствительный вид среди древесных культур и травянистых растений;

в) наиболее чувствительные тест-функции.

Таблица 5.1 – Изменение морфометрических показателей растительности (листьев деревьев) в зависимости от района произрастания

Вид растения	Морфометрические показатели				
	количество листьев, шт	высота растений, см	длина листовой пластинки, см	ширина листовой пластинки, см	площадь листовой пластинки, см ²

Вопросы для самоконтроля

1. Правила отбора образцов травянистых растений.

2. Правила отбора листьев с деревьев.

3. Правила проведения морфометрических измерений.

6 ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ ПРИРОДНЫХ ВОДОЕМОВ

Цель занятия: изучить основные методы оценки качества воды водоемов.

Задачи: ознакомиться с методов Вудивисса; научиться оценивать степень загрязнения водоемов по индексу Гуднайта и Уитлея; производить расчет индексов видового разнообразия.

Применяемые в настоящее время методы физического и химического анализа не могут дать полной оценки воздействия хозяйственной деятельности человека на окружающую среду.

Во-первых, эти методы отражают ситуацию непосредственно в период взятия проб, биологический же метод позволяет обнаружить экологические эффекты воздействия на водоем за предшествующий времени анализа период.

Во-вторых, невозможно определять все известные и искать неизвестные факторы загрязнения воды. Биологические системы реагируют на все виды загрязнений независимо от их природы и дают интегральную характеристику качества воды как среды обитания.

Поэтому для комплексной оценки экологического состояния водоемов, водотоков и их водосборных бассейнов, находящихся под воздействием целого комплекса разнообразных природных и антропогенных факторов, необходимо использование методов, наиболее полно отражающих качество окружающей природной среды.

Гидробиологические показатели являются важнейшим элементом системы контроля загрязнения поверхностных вод и позволяют определить экологическое состояние водных объектов, оценить качество поверхностных вод как среды обитания организмов, определить совокупный эффект комбинированного действия загрязняющих веществ, локализовать источник загрязнения во времени и пространстве, определить трофические свойства воды, тип загрязнения, установить возникновение вторичного загрязнения вод. Показатели развития зообентоса являются обязательным компонентом гидробиологического мониторинга.

В водных экосистемах зообентос играет важную роль в круговороте органических веществ между донными отложениями и водными массами. Он отличается стабильной локализацией на определенных местах обитания в течение длительного времени, поэтому он является удобным объектом для наблюдений за антропогенной сукцессией водных экосистем и процессами самоочищения воды.

Такие долгоживущие компоненты биоты являются хорошими индикаторами хронического загрязнения и устойчивости экосистемы.

Кроме того, зообентос играет важную роль в перемешивании грунтов в водных объектах, особенно в распределении в них органического вещества и окислительно-восстановительных условий. Особая роль в этом принадлежит грунтофагам и роющим животным (например, малощетинковым червям), которые могут существенно менять структуру донных осадков на глубине до трех метров.

Уникальна роль зообентоса в возврате органики из водоемов на сушу. Так, выявлена роль бентосных организмов в удалении азота и фосфора из донных отложений.

В состав зообентоса входят наиболее долгоживущие гидробионты – моллюски и олигохеты, продолжительность жизни которых достигает нескольких лет, причем на их долю приходится большая доля биомассы зообентоса на многих водоемах и водотоках.

Кольчатые черви (пиявки и олигохеты) являются важным составным элементом многих водных экосистем Западной Сибири. Основу западносибирского комплекса червей составляют олигохеты (*Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Spirosperma ferox*, *Lumbriculus variegatus*) и пиявки (*Erpobdella octoculata*, *Glossiphonia complanata*).

В реках бассейна Средней Оби обитает около 20 видов *моллюсков*, преобладают рода *Anodonta* и *Pisidium*. Пойменные озера характеризуются наибольшим видовым разнообразием (более 50 видов), преобладают *Lymnaea*, *Valvata*, *Planorbarius*, *Planorbis*, *Anisus* и *Euglesa*.

Хирономиды (комары-звонцы) встречаются повсеместно, являются важным кормовым объектом для рыбного хозяйства и чувствительными биоиндикаторами в водоемах. Известно, что личинки хирономид легче, чем другие водные организмы, накапливают тяжелые металлы и другие вещества внутри своего тела благодаря высокой проницаемости их покровов. Кроме того, они постоянно обитают в донных отложениях, концентрирующих радионуклиды и тяжелые металлы, строят свои домики из этих отложений и, следовательно, постоянно подвергаются воздействию загрязнителей. Поэтому они являются чувствительными индикаторами загрязнения водоемов.

Для обоснования полноценного эколого-токсикологического мониторинга речь должна идти не о качестве воды, только как *водной массы*, а об оценке *уровня токсической загрязненности* (УТЗ) всей водной экосистемы в целом, с учетом ее подразделения на три взаимосвязанных подсистемы: водной массы, донных отложений и гидробионтов. Общий

уровень загрязненности водоема определяется тремя взаимно обусловленными процессами:

- масштабами и составом поступающих в него загрязнений;
- взаимодействием воды и донных отложений;
- миграцией и трансформацией токсикантов в сообществах водоема, включая процессы самоочищения и накопления в гидробионтах.

Донные отложения и гидробионты как концентраты стойких токсикантов до сих пор недостаточно учитываются ни в правилах регламентации загрязнений, ни при экологическом мониторинге водных объектов. В то же время, исследовательские материалы указывают на то, что градиент концентраций тяжелых металлов, нефтепродуктов, хлорорганических пестицидов между водными массами и донными отложениями может составлять 1:100 – 1:1000 и более, что обусловлено как седиментацией взвесей, на которых концентрируются токсические компоненты, так и прямой сорбцией этих компонентов из водных масс иловыми отложениями.

Зоопланктон успешно используют в различных методах оценки качества воды и, особенно, при выработке экспресс методов. В тоже время существует мнение, что зоопланктон малополезен для оценки качества вод, так как в водотоках он проносится течением, не образуя достаточно стабильных по составу сообществ, характерных для данного участка реки. Но использование зоопланктона как индикатора загрязнения в малых реках и озерах дает положительные результаты.

Оценка качества воды малых рек и озер по биотическому индексу

О чистоте воды природного водоема можно судить по *видовому разнообразию и обилию животного населения.*

Чистые водоемы заселяют пресноводные моллюски, личинки веснянок, поденок, вислокрылок и ручейников. Они не выносят загрязнения и быстро исчезают из водоема, как только в него попадают сточные воды.

Умеренно загрязненные водоемы заселяют водяные ослики, бокоплавцы, личинки мошек (мокрецов), двустворчатые моллюски-шаровки, битинии, лужанки, личинки стрекоз и пиявки (большая ложноконская, малая ложноконская, клепсина).

Чрезмерно загрязненные водоемы заселяют малоцетинковые кольцецы (трубочники), личинки комара-звонца (мотыли) и ильной мухи (крыска). (

Система Вудивисса и ее модификации

Система Ф. Вудивисса (1977) позволяет оценивать степень загрязнения по видовому разнообразию и показательному значению таксонов в биотических индексах, которые определяются по количеству ключевых и

сопутствующих видов беспозвоночных животных, обитающих в исследуемом водоеме. Самый высокий биотический индекс определяется числом 10, он отражает качество воды экологически чистых водоемов, вода которых содержит оптимальное количество биогенных элементов и кислорода, в ней отсутствуют вредные газы и химические соединения, способные ограничить обитание беспозвоночных животных.

Для определения биотического индекса берут пробу воды из водоема с помощью водного сачка. Проба включает также ил и беспозвоночных животных, обнаруженных в сачке. Взятая проба может быть разобрана сразу на берегу водоема, если позволяет погода, или перенесена в лабораторию и рассмотрена там. Перед разбором проба промывается на сите, все обнаруженные беспозвоночные переносятся в чистую воду, налитую в чашки Петри или эмалированные ванночки. Содержимое чашек Петри тщательно разбирается и определяется по видам и группам видов беспозвоночных животных. Для удобства определения можно использовать таблицы с рисунками наиболее распространенных в водоемах видов беспозвоночных. В исследуемой пробе определяют ключевые виды и группы сопутствующих видов – *индикаторные группы Вудивисса* (табл. 6.1).

Таблица 6.1 – Индикаторные группы Вудивисса

Организмы	
Каждый вид плоских червей	Класс олигохет (кроме рода Nais)
Каждый вид пиявок	Род Nais
Моллюски	Ракообразные
Веснянки	Подёнки
Водные клещи	Жуки
Личинки двукрылых (кроме хирономид)	Клопы
Хирономиды (кроме Chironomus thummi)	Вислокрылки
Chironomus thummi	Мошки
Каждое семейство ручейников	

Под группой сопутствующих видов в одних случаях понимают род, семейство, или класс беспозвоночных, в других – каждый вид. Например, под группой подразумевают весь класс малощетинковых кольцецов (кроме рода трубочников), семейство ручейников, семейство хирономид, каждый вид плоских червей, пиявок, моллюсков, ракообразных и др.

Определив количество групп и число ключевых видов, находим в таблице 6.2 вертикальный столбец и горизонтальную строку и на их пересечении определяем биотический индекс.

Таблица 6.2- Определение биотического индекса пресноводных экосистем по донным беспозвоночным

Организмы	Видовое разнообразие	Число групп Вудивисса				
		0 – 1	2 – 5	6 – 10	11 – 15	16 и
		Биотический индекс				
Личинки веснянок	Более одного вида	-	7	8	9	10
	Только один вид	-	6	7	8	9
Личинки поденок (кроме <i>Baetis rhodani</i>)	Более одного вида	-	6	7	8	9
	Только один вид	-	5	6	7	8
Личинки ручейников и <i>Baetis rhodani</i>	Более одного вида	-	5	6	7	8
	Только один вид	-	4	5	6	7
Гаммарусы (бокоплавы)	Все выше названные виды отсутствуют	3	4	5	6	7
Водяные ослики	Все выше названные виды отсутствуют	2	3	4	5	6
Тубифициды и/или красные личинки хирономид	Все выше названные виды отсутствуют	1	2	3	4	-
Все выше названные группы отсутствуют	Присутствуют некоторые организмы, не требовательные к кислороду	0	1	2	-	-

Например, обнаружили несколько видов веснянок и 15 групп донных обитателей. В этом случае находим первую строку по горизонтали и 6 колонку по вертикали, на пересечении видим цифру 9 – показатель биотического индекса данного водоема.

Величина биотического индекса (J) зависит от видового разнообразия и состава населения водоемов (табл. 6.3).

Таблица 6.3 - Классификация загрязненности водоемов в зависимости от величины биотического индекса

Величина биотического индекса	Категория загрязненности водоема
0	Очень сильное
0 – 1	Грязные воды
1 – 2	Загрязненные воды
3 – 4	Умеренно грязные
5 – 7	чистые
8 – 10	Очень чистые

Индикация по соотношению крупных таксонов

Показателем качества воды в озерах и прудах является ее *трофность* – количество органических веществ, накопленных в процессе фотосинтеза в условиях наличия биогенных элементов (азот, фосфор, калий). Органическое вещество обеспечивает существование животного населения и его видовое разнообразие, численность популяций зависит от количества пищи. После смерти животных возникают проблемы с разложением их трупов и изменением газового состава воды. *Процесс повышения трофности водоема* называется *эвтрофикацией*. К наиболее заметным проявлениям эвтрофикации относятся летнее «цветение» водоемов, зимние заморы, быстрое обмеление и зарастание водоемов.

Эвтрофикацию можно выявить в процессе исследования с применением биоиндикаторов. Роль биоиндикаторов в этом случае могут играть личинки комаров-дергунов или хирономусов и малощетинковые кольцецы, обитающие в донных илах, богатых органикой. Личинки хирономусов, называемые в народе «мотылем», и кольцецы живут в иле, питаются органическими остатками и приспособлены к недостатку кислорода благодаря содержанию в крови гемоглобина. Если в составе донного ила присутствуют названные организмы – это верный признак эвтрофикации. Для выяснения этого факта необходимо с помощью водного сачка или черпака добыть ил со дна водоема, затем тщательно отмыть на сите или металлической сетке с мелкими ячейками обитающих организмов. По

количеству кольцецов и хирономид определяют степень эвтрофикации. Принято выделять *три степени эвтрофикации*:

1) слабая, 2) средняя, 3) сильная.

При сильной эвтрофикации в иле многочисленны трубочники, они часто покрывают дно сплошным слоем, в летнее время вода становится зеленой от массового размножения водорослей, а в зимнее время наблюдаются заморы рыб и водоемы нуждаются в аэрации. Воды таких водоемов малопригодны для бытового использования.

При средней эвтрофикации наблюдается увеличение численности «мотыля», трубочники единичны.

При слабой эвтрофикации эти признаки отсутствуют.

Для оздоровления водоемов с сильной эвтрофикацией можно рекомендовать скашивание и уборку водных растений, удаление со дна ила, называемого сапропелем. Сапропель в свежем виде можно вносить в почву в качестве ценного органического удобрения.

Определение степени загрязнения водоема по индексу Гуднайта и Уотлея

Классический вариант олигохетного индекса (ОИ) впервые был предложен Гуднайтом и Уотлеем в 1961 г. Он рассчитывается как отношение численности олигохет к общей численности организмов в пробе.

Для определения индекса собирают бентосные организмы с определенной площади дна. С помощью скребка или лопаты снимают донный грунт, тщательно промывают его на сите. Организмы, оставшиеся на сите, помещают в емкость с водой. В лаборатории собранных животных разбирают на две группы: одна группа – малощетинковые кольцецы, вторая – прочие виды. После подсчета организмов в группах находят индекс Гуднайта Уотлея по формуле:

$$Д = (Т/В) \cdot 100 \quad (6.1)$$

$$Д = (Т/О) \cdot 100, \text{ где:} \quad (6.2)$$

Т – численность малощетинковых червей (тубифицид);

О – численность всех олигохет, включая тубифицид;

В – численность всех видов организмов.

После нахождения индекса определяют степень загрязнения водоема (табл. 6.4).

Таблица 6.4 – Олигохетный индекс Гуднайт-Уотлея

Значение индекса %	Степень загрязнения воды	Класс качества
Менее 30	Отсутствие загрязнения	1 – 2
30–60	Незначительное	2 – 3
60–70	Умеренное	3 – 4
70–80	Значительно	4 – 5
Более 80	Сильное	5 – 6

Индекс *И. К. Тодераша* вычисляется по отношению численности олигохет к численности хирономид. В чистых водах индекс не превышает единицы, а загрязненных он возрастает.

Индикация по отдельным таксономическим группам (олигохеты)

Олигохеты давно используются в качестве биоиндикаторов. Отмечено, что обычно немногочисленные в чистых гидробиоценозах, они развиваются в местах спуска бытовых вод в огромном количестве. Поэтому массовое развитие олигохет даже без точного определения до вида расценивается как показатель органического загрязнения.

Для оценки уровня органического загрязнения по олигохетам используют следующие значения:

слабое загрязнение – 100 – 999 экз./м²;

среднее загрязнение – 1000 – 5000 экз./м²;

тяжелое (сильное) загрязнение – более 5000 экз./м².

Биоиндикация по видовому разнообразию

В настоящее время при биологическом контроле качества вод широко применяются различные индексы, характеризующие биологическое разнообразие. При тех или иных воздействиях на сообщество происходит перестройка его структуры. Если воздействие достаточно сильное, то изменения в сообществе видны по динамике его видового состава. Однако часто необходимо фиксировать более тонкие изменения в экосистеме, на более ранних стадиях выявлять реакцию сообществ на ухудшение условий среды. При небольших воздействиях в сообществе происходят изменения в количественных соотношениях между численностями различных видов. Доминант может стать субдоминантом или редким видом, вместо одного доминанта их может стать несколько и т.д. Детальный анализ этих изменений можно сделать лишь с переходом на количественный уровень оценки.

Лучший путь количественной оценки структуры сообществ – определение индексов биологического разнообразия. Вместе с тем, само понятие «биологическое разнообразие» сложно и многогранно.

В настоящее время предложено более 20 индексов, в связи с чем перед исследователями встает проблема выбора необходимого показателя.

Индекс Майера. Наиболее простая методика биоиндикации. Эта методика подходит для любых типов водоемов. Она более простая и имеет большое преимущество – в ней не надо определять беспозвоночных с точностью до вида. Метод основан на том, что различные группы водных беспозвоночных приурочены к водоемам с определенной степенью загрязненности. При этом организмы – индикаторы относят к одному из трех разделов, представленных в таблице 6.5.

Таблица 6.5 – Индекс Майера

Обитатели чистых вод, X	Организмы средней чувствительности, Y	Обитатели загрязненных водоемов, Z
Личинки веснянок Личинки поденок Личинки ручейников Личинки вислокрылок Двустворчатые моллюски	Бокоплав Речной рак Личинки стрекоз Личинки комаров – долгоножек Моллюски-катушки моллюски-живородки	Личинки комаров-звонцов Пиявки Водяной ослик Прудовики Личинки мошки Малощетинковые черви

Нужно отметить, какие из приведенных в таблице групп обнаружены в пробах. Количество найденных групп из первого раздела необходимо умножить на 3, количество групп из второго раздела – на 2, а из третьего раздела – на 1.

Получившиеся цифры складывают:

$$X \cdot 3 + Y \cdot 2 + Z \cdot 1 = S \quad (6.3)$$

По значению суммы S (в баллах) оценивают степень загрязненности водоема:

- более 22 баллов – водоем чистый и имеет 1 класс качества;
- 17 – 21 баллов – 2 класс качества;
- 11 – 16 баллов – умеренная загрязненность, 3 класс качества;
- менее 11 – водоем грязный, 4 – 7 класс качества.

Расчет индексов видового разнообразия

Кроме выше рассмотренных предложены приемы оценки состояния экосистем водоемов по *общему видовому составу сообщества и отдельным группам гидробионтов*. Мерой видовой разнообразия сообщества служат индексы видовой разнообразия (d).

1. Расчет величины (d) может быть произведен:

а) по формуле Маргалефа:

$$d = S - 1 / \ln n \quad (6.4)$$

б) по формуле Менимека:

$$d = S / \sqrt{n}, \text{ где} \quad (6.5)$$

S – число видов;

n – число особей.

Величина этого индекса имеет более высокое значение в чистых водах и приближается к нулю в загрязненных.

2. Показатель видовой разнообразия по Шеннону:

$$H = \sum (n/N) \log (n/N), \text{ где} \quad (6.6)$$

N – общее количество особей в пробе; n - общее количество особей вида.

Показатель H изменяется от 0 до 4.

3. Коэффициент видовой сходства, индекс Серенсена:

$$K_{в. сх.} = \frac{2C}{A + B}, \text{ где} \quad (6.7)$$

A – количество видов в чистой зоне;

B – количество видов в грязной зоне;

C – количество видов, встречающихся и в загрязняемой, и в чистой зоне.

Этот коэффициент может изменяться от 0 до 1: чем меньше $K_{в. сх.}$, тем сильнее изменено сообщество в загрязняемой зоне.

Задание. 1. По предложенным вариантам (карточкам) (Приложение Б) оценить степень загрязнения водоемов, используя методы, изложенные в теоретической части темы.

2. Сделать соответствующие выводы.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие организмы заселяют чистые водоемы?
2. Какие организмы заселяют умеренно загрязненные водоемы?
3. Какие организмы заселяют чрезмерно загрязненные водоемы?
4. Правила определения биотического индекса для оценки качества воды?
5. Что такое эвтрофикация?
6. Для чего определяют индексы Гуднайта и Уотлея?

7 ИЗУЧЕНИЕ КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ И ПРИРОДНЫХ ВОД МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ (лабораторная работа)

Цель занятия: изучить использование метода биотестирования в оценке качества сточных и природных вод.

Задачи: научиться проводить оценку качества сточных вод с использованием *Daphnia magna* и высшей водной растительностью ряской *Lemna minor L.* и элодеей *Elodea canadensis Rich.*

Современные методы контроля качества природных вод, полноты очистки сточных вод, влияния их на природные воды включают лишь химические показатели БПК и ХПК, содержания химических веществ, на которые установлены ПДК. Ни один из этих показателей, ни все вместе взятые не могут непосредственно характеризовать токсичность воды для водных организмов. Это возможно лишь с помощью токсикологических опытов с использованием водных организмов-биоиндикаторов. Гидробионты реагируют на действие целого комплекса веществ, содержащихся в сточных водах. Нередко токсичность воды обусловлена присутствием веществ в столь низких концентрациях, что их невозможно идентифицировать из-за недостаточной чувствительности или отсутствия аналитического метода.

Вместе с тем установлено, что даже после полной биохимической очистки (до БПК_{полн} – 10 – 15 мг/л O₂) сточных вод различных предприятий промышленности, очищенная вода может оставаться токсичной для гидробионтов (рыб, их икры, мальков, кормовых беспозвоночных, водорослей и других организмов).

Следовательно, информацию о качестве сточных вод и их влиянии на природные воды и гидробионтов можно получить лишь при использовании одновременно данных гидрохимических анализов и токсикологических экспериментов на водных организмах, т.е. результатов биотестирования.

Для биотестирования используются самые различные организмы (водные растения, водоросли, ракообразные, моллюски и рыбы). Однако наиболее чувствительным к загрязняющим веществам различной природы является пресноводный рачок *Daphnia magna*.

В результате применения экспресс – методов на токсичность устанавливают, является ли испытуемое вещество или сточная вода резко токсичными или нет, при каком разбавлении чистой водой исчезает острая токсичность. Однако эти определения являются ориентировочными. Если же необходимо определить минимальное разбавление воды или максимальную концентрацию токсических веществ, при которых не будет вредного влияния

на гидробионтов, надо проводить испытания с несколькими тестами в течение длительного срока (месяца и более).

При остановке опытов по определению острой токсичности сточных вод или токсических веществ следует учитывать влияние среды во время проведения экспериментов: состава воды, рН, жесткости, температуры. Воду для разведения берут обычно из водоема-приемника сточных вод в том месте, где она наиболее чистая. Если такой возможности нет, то в качестве контрольного образца используется водопроводная, отстаиванная не менее 7 – 10 суток, вода.

7.1 Биотестирование с помощью дафний (*Daphnia magna* Straus)

Биология Daphnia magna

Daphnia magna (дафния большая) – мелкое ракообразное, постоянный обитатель стоячих и слабопроточных водоемов с содержанием кислорода в воде от 2 мг/л и более. По способу питания – активный фильтратор, питающийся взвешенным в воде планктоном и детритом. Самки достигают 4 – 5 мм в длину, а самцы в 1,5 – 2 раза меньше. Конец туловища рачка имеет характерную выемку (эфиппиум), наличие которой является видовым признаком, и этим дафния магна отличается от весьма близкого вида – дафния пулекс (дафния обыкновенная).

Тело дафний овальной формы сжато с боков, заключено в хитиновый прозрачный панцирь. Край панциря со спиной стороны вытянут в длинный шип. Створки на брюшной стороне не соединены, образуют щель. Тело дафний не четко сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы. Голова покрыта щитом, передний край которого клювообразно вытянут, образуя рострум (Рис. 7.1).

Под рострумом впереди прикреплены две маленькие антенны-антенулы, вооруженные осязательными щетинками. Антеннулы сильнее развиты у самцов. Ротовое отверстие у дафний расположено в передней части раковины. В грудном отделе дафний расположено пять пар грудных ножек. Они сильно расчленены, снабжены многочисленными щетинками, которые образуют частое «сито». Функции ножек связаны с процессами фильтрации воды, питания и дыхания. Частота движения ножек измеряется в пределах 150 – 470 ударов в минуту в зависимости от качества воды, температуры, физиологического состояния рачков. Задний отдел туловища – брюшной (абдоминальный) – лишен конечностей, изогнут и снабжен парой крупных придатков – каудальных когтей. На спинной стороне грудного отдела за кишечником находится сердце, оно сокращается до 200 – 290 ударов в минуту.

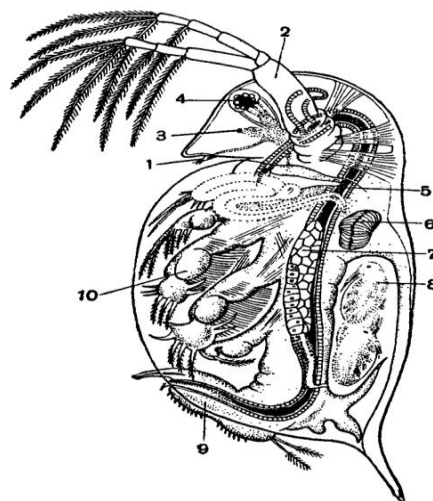


Рис. 7.1 – Ветвистоусый рачок *Daphnia magna* Straus: А – общий вид; Б – строение: 1 - передняя антенна, 2 - задняя антенна, 3 - науплиальный глазок, 4 - фасеточный глаз, 5 - кишечник, 6 - сердце, 7 - яичник, 8 - эмбрионы в выводной сумке, 9 - брюшко, 10 - грудная ножка.

Половая система дафний представлена парными гонадами: яичниками у самок и семенниками у самцов, которые расположены по обеим сторонам кишечника. Между спинной частью туловища и панцирем расположена выводная камера, в которой протекает эмбриональное развитие рачков.

В природе в летнее время, а в лаборатории при благоприятных условиях – круглый год, дафнии размножаются без оплодотворения – партеногенетически. Причем рождаются только самки. При резком изменении условий существования (недостаток пищи, перенаселенность, понижение температуры и т. д.) в популяции дафний появляются самцы и дафнии переходят к половому размножению, откладывая после оплодотворения «зимние яйца» (1 – 2 шт.), которые размещаются в специальном седлышке (эфиппие). Весной из яиц появляются самки, которые в дальнейшем вновь дают партеногенетические поколения дафний. Период созревания рачков при оптимальной температуре ($+20 \pm 2^\circ\text{C}$) и хорошем питании 5 – 8 дней (до 10 дней). Наступление половозрелости отмечают по моменту выхода яйцеклеток в выводковую камеру, для чего самок просматривают в бинокляр. Длительность эмбрионального развития – 3 – 4 дня, а при повышении температуры до $+25^\circ\text{C}$ – 46 часов. По истечении этого времени происходит вымет молоди. Партеногенетические поколения следуют одно за другим каждые 3 – 4 дня. Вначале число яиц в кладке

дафний – 10 – 15 шт., а затем возрастает до 30 – 40 и более, затем снова снижается до 3 – 8 шт.; кладка яиц прекращается за 2 – 3 дня до смерти особи.

В природе дафнии живут в среднем 20 – 25 дней, а в лаборатории при оптимальном режиме – 3 – 4 месяца и более. При высоких температурах (свыше +25°C) продолжительность жизни дафний может сокращаться до 25 дней. Дафния светлюбива и концентрируется в освещенных местах.

Дафния магна устойчива к изменению кислородного режима, что связано со способностью синтезировать гемоглобин. При понижении концентрации растворенного кислорода (что является биоиндикационным признаком) наблюдается повышенное содержание гемоглобина у дафний. Они становятся ярко-красными и их численность увеличивается. При оптимальном же содержании в воде растворенного кислорода рачки становятся розовато-желтыми.

Культивирование дафний

Для токсикологических исследований надо иметь чистую культуру самок. Для культивирования отбирают 30 – 40 самок из природного водоема и помещают в кристаллизатор или другой сосуд емкостью 2 – 5 л. Во избежание гибели рачков их адаптируют к лабораторным условиям, постепенно добавляя новую воду. Культуру дафний выращивают при плотности популяции не более 25 крупных особей на 1 л воды. Кормление производят 1 раз в сутки одноклеточными зелеными водорослями: хлореллой или сценедесмусом. В виде корма можно использовать также суспензию пекарских дрожжей (1 – 2 раза в неделю), которые предварительно сильно растирают в ступке и растворяют в воде из аквариума. Один раз в неделю накопившийся на дне сосуда осадок удаляют стеклянной трубочкой и наполовину заменяют воду. Воздух в помещении, где выращивают дафний, должен быть без вредных выделений, т.к. дафнии очень чувствительны к загрязнению воздуха. Выращивают их при температуре +18°C – +22°C и освещении лампами в 400-600 люкс (40 ватт) в течение 8-10 часов в сутки.

Подготовка дафний к биотестированию

30 – 40 дафний с выводковыми камерами, полными яиц и зародышей, за 3 – 4 суток до тестирования пересаживают в 1 – 2-литровые емкости (стаканы, кристаллизаторы) с аквариумной водой, в которую перед посадкой вносят корм. После появления молоди (каждая самка может выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослых особей удаляют при помощи стеклянной трубки, а однодневную молодь используют для биотестирования. Необходимое для тестирования количество дафний определяется числом контролируемых проб воды.

Для более точных токсикологических опытов используют поколение от одной самки, чем обеспечивается генетическая однородность материала и максимально исключается возможность разброса полученных данных за счет индивидуальной изменчивости. Три-пять одновозрастных половозрелых самок отсаживают по одной в стаканы с водой на 200 – 250 мл, куда вносят корм. После появления молоди берут рачков 2 – 4-дневного возраста из стакана, в котором их появилось больше, и переносят в емкость на 2 – 5 л, где производят дальнейшее культивирование. Для опытов используют второй помет. Плотность посадки такая же, как и для взрослых дафний (20 – 25 рачков на 1 л воды).

Подготовка воды

Для культивирования дафний, приготовления рабочих растворов, разведения сточной воды и для контроля рекомендуется вода средней жесткости (2,5 – 5,3 экв/л) с нейтральной реакцией среды (рН=7) из чистого пресного водоема. Воду наливают в стеклянный сосуд и выдерживают три дня при комнатной температуре, аэрируя при помощи аквариумного компрессора.

Водопроводная вода подвергается химической обработке, содержит коагулянты, свободный хлор и др. Для удаления хлора и других примесей, помимо отстаивания, воду надо пропустить через гранулированный активированный уголь, используя стеклянную широкогорлую трубку высотой в 1 м. После этого воду 2 – 3 суток аэрируют аквариумным компрессором. В воду можно добавить культуру хлореллы или других одноклеточных водорослей. Затем воду отстаивают, профильтровывают, выдерживают в аквариуме с рыбами. В результате получается вода удовлетворительного качества.

Следует отметить, что наши опыты с применением отстаивной водопроводной воды для культивирования дафний дали тоже хорошие результаты. При этом тестировалась сточная вода завода «Процессор» на входе и выходе очистных сооружений, а также разбавлялась в соотношении 1:1 и 1:2. В таком разбавленном виде она поступает в Воронежское водохранилище.

Оборудование:

- 1) кристаллизаторы емкостью 1 – 5 л;
- 2) стаканы химические на 200 – 250 мл;
- 3) пипетки мерные на 1, 2, 5, 10 мл;
- 4) стеклянная трубка с грушей;
- 5) коническая колба на 1 – 2 л;
- 6) часовые стекла;

7) воронки стеклянные;

8) бинокуляр.

Проведение эксперимента и оценка результатов

Наливают в химические стаканы сточную воду до прохождения через очистные сооружения и после (по 200 мл в трехкратной повторности). Контроль – очищенная или аквариумная вода. В каждый стакан помещают по 10 рачков в возрасте 2 – 4 суток. Для этого пипеткой с широким концом дафний отлавливают из сосуда, где они выращивались, и помещают на часовое стекло. Тонкой пипеткой отсасывают воду со стекла и дафний смывают в приготовленный стакан, используя жидкость из этого же стакана. Дафний сначала помещают в контрольные, а затем в опытные стаканы, начиная с наименьшей концентрации. При проведении опыта их не кормят.

По истечении 1, 2, 4, 8, 24, 48 часов регистрируют результаты опытов, учитывая при этом число живых особей, их поведение (активность и характер передвижения), степень наполнения кишечника пищей, количество сброшенных эфиппиумов (при действии токсического агента нарушаются метаболические процессы у особей и, как реакция на токсикант, происходит линька и сбрасывание эфиппиума). Те животные, которые в течение нескольких секунд после легкого встряхивания стакана не начинают двигаться вновь, считаются погибшими, несмотря на то, что у них могут двигаться антенны.

При осмотре стаканов погибших дафний удаляют пипеткой, начиная с наименее концентрированного раствора, после чего пипетку тщательно моют. Для контроля должна быть отдельная пипетка. Если гибель дафний в контроле превышает 10%, то опыт повторяют.

При отмирании 50% особей концентрация считается сильно токсичной (среднелетальная) и обозначается ЛК₅₀. При гибели 100% особей концентрация считается летальной (ЛК₁₀₀). Минимальная концентрация, при которой организмы не гибнут, обозначается ЛК₀.

Если за период наблюдений гибель дафний не наблюдается даже в неразбавленной воде, значит острой токсичностью она обладает. При гибели 20% особей концентрация уже считается вредной.

В результате опытов можно получить ответы на следующие вопросы:

1. Является ли испытуемое вещество или сточная вода остротоксичными?

2. Каким должно быть разбавление сточной воды или какой должна быть концентрация вещества, чтобы исчезла острая токсичность?

7.2 Биотестирование с использованием ряски (*Lemna minor* L.)

Ввиду того, что отбор молодых растений ряски связан с определенными сроками (начало лета), а также длительностью самого опыта (не менее 8 – 10 суток) этот тест мало применим для учебных лабораторных занятий и может быть рекомендован для оценки качества воды при выполнении дипломных и научно-исследовательских работ.

Ряска малая (*Lemna minor* L.) – представитель группы растений с плавающими листьями (Рис. 7.2).



Рис. 7.2 – Ряска малая *Lemna minor*

Вегетативное тело представляет собой округлую или обратнояцевидную пластинку (щиток) 2 – 4,5 мм длиной, 2 – 3 мм шириной, с верхней стороны слабовыпуклую или с выдающимся горбовидным шипиком, снизу плоскую, толстоватую, непрозрачную, с тремя (редко четырьмя - пятью) жилками. Пластинки сверху зелёные, блестящие, с некоторыми неясными устьицами вдоль средней линии (устьица у вершины и около кармашка несколько больше, чем между ними), иногда с рассеянными красноватыми пятнами (особенно в течение холодного сезона); с нижней стороны плоские, желтовато- или беловато-зелёные, очень редко с красноватыми пятнами, но намного сильнее, чем сверху; наибольшая воздушная полость редко больше 0,3 мм.

От щитка отходит тонкий, полупрозрачный и неразветвлённый корень. Длина корней ряски достигает 6 – 8 см. На узле расположены два почечных кармашка, в которых формируются дочерние особи или соцветия.

Основную роль в абсорбции минеральных веществ играет нижняя поверхность щитка, когда как корень выполняет функцию удержания

растения на поверхности воды. Конец его заключён в так называемый кармашек, обычно округлый.

Размножается ряска малая в основном отростками, которые отделяются от пластинки и становятся самостоятельными растениями. Если растение пострадало от мороза, оно погибает и опускается на дно, но при этом зачатки новых растений не теряют жизнеспособности, перезимовывают на дне и весной всплывают на поверхность воды. Зимует ряска подо льдом, не вмерзая в него и не погибая.

Так как размножение ряски преимущественно вегетативное, то любая популяция, скорее всего, будет состоять из клонов одной, первоначальной, особи. Тенелюбива, устойчива к низким температурам. Ее распространение ограничено участками водных объектов с рН от 6,2 до 7,5.

Условия лабораторного содержания

Для культивирования растения отбирают из естественной популяции водного объекта в конце мая – начале июня, когда много молодых, наиболее жизнеспособных растений. При отборе ряски выбирают растения с зелеными лопастями и с корнями, не имеющими видимых повреждений. Отобранные растения транспортируют в сосудах с водой, взятой из того же водного объекта.

В лаборатории ряску помещают в кристаллизаторы объемом 1 дм³ с речной или отстоянной водопроводной водой. В течение 7 – 10 дней растения проходят акклимацию при комнатной температуре и при достаточной освещенности (лучше в люминостатной установке), со сменой воды каждые 2 – 3 суток для удаления продуктов метаболизма.

Для проведения экспериментов и культивирования растений используют отстоянную водопроводную воду или воду из незагрязненного водного объекта. Природную воду процеживают через воронку диаметром 150 мм с планктонной сеткой (газ N 68) для удаления взвеси и мелких организмов, заливают в аквариум с постоянной аэрацией воды. Для исследований воду используют через 4 – 5 дней. Ряску в количестве 5 растений, имеющих одну сформировавшуюся и одну развивающуюся лопасть и корень с неповрежденным корневым чехликом, и примерно одинаковой длины, помещают в стаканы объемом 0,5 дм³ и размещают в люминостате при температуре 22 – 25°C и освещенностью 5 лк. Для измерения температуры раствора рядом ставят стакан с водой и термометром.

Для круглогодичного культивирования ряски в целях получения достаточного количества материала рекомендуют выращивать их на среде Гапоненко-Стажецкого при круглосуточном освещении 7 – 8 лк и температуре +25°C.

Состав среды Гапоненко-Стажецкого: KNO_3 – 0,4 г/л; H_2BO_3 – 0,5 мг/л; KH_2PO_4 – 0,2 г/л; цитрат железа – 5 мг/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,6 г/л.

Среду автоклавируют при 1,5 атм. в течение 20 минут, цитрат железа вносят после стерилизации.

Для работы с растениями необходимо следующее *оснащение и оборудование*:

- ✓ круглые аквариумы на 10 – 15л или кристаллизаторы на 2 – 5 л. для содержания маточной культуры;
- ✓ стаканы объемом 0,5 л;
- ✓ линейка, пинцет, лезвие;
- ✓ воронка, набор пипеток, стеклянная палочка;
- ✓ планктонный газ N 68, фильтровальная бумага;
- ✓ чашки Петри (4 шт. на контроль и на каждую из концентраций изучаемого материала);
- ✓ пипетки на 3 – 5 мл;
- ✓ люксметр;
- ✓ термометр;
- ✓ люминостат;
- ✓ бинокулярный микроскоп;
- ✓ центрифуга;
- ✓ камера Богорова.

Проведение исследований

До постановки хронического эксперимента следует провести предварительный 10-дневный опыт для установления диапазона действующих концентраций вещества. Для каждой концентрации и контрольной выборки отводят по 3 стакана.

Для проведения хронического опыта из концентрации, вызывающей за 10 суток гибель 50% особей, готовят не менее 3 – 6 разведений, отличающихся на порядок.

Хронические опыты продолжительностью не менее 30 суток наиболее удобно проводить в летний период. Растения по 5 экземпляров рассаживают в стаканы (объем 0,5 дм³), которые размещают в люминостате или на рассеянном свете при температуре 22 – 25°C и освещенности 3 – 4 лк. Смену опытных растворов проводят (в зависимости от стабильности вещества) через 2 – 5 суток, одновременно меняя воду и в контроле. Контроль – вода из чистого водоема или водопроводная вода, отстоянная и

прошедшая очистку фильтрацией через активированный уголь. Опытные сосуды выставляют на рассеянный свет.

Учет и анализ результатов

Ежедневно учитывают следующие параметры: изменение окраски, потеря тургора, повреждение точек роста, выживаемость (в течение 5 – 10 суток), прирост и число боковых отростков, число корней и их длина. В случае малой токсичности воды и относительно хорошей сохранности растений в конце опыта их вынимают из воды, обсушивают фильтровальной бумагой, отделяют бритвой надводную и подводную части и взвешивают на торсионных весах. Полученные измерения выражают по отношению к контролю, взятому за 100%, обрабатывают статистически. Состояние растений учитывают каждые 5 суток по выживаемости и изменению ряда биологических показателей.

Измерения длины проводят с помощью линейки.

Все результаты измерений пересчитывают на одно растение.

Учитывают сроки образования новых лопастей и корней, а также новых растений, которые приходится на 10 – 20 сутки.

Проведение биотестирования с помощью видов семейства рясковых можно проводить на нескольких уровнях:

- ◆ на уровне клетки (метод основан на реакции ингибирования фототаксиса);
- ◆ на уровне органов (фиксация морфологических отклонений растений ряски от нормы под действием загрязнителя – хлорозы, пожелтения, увядания листьев, специфические реакции);
- ◆ на уровне организма и популяции (метод подсчета реализации репродуктивного потенциала).

7.3 Биотестирование с элодеей *Elodea canadensis* Rich.

Характеристика тест-объекта

Элодея (*Elodea canadensis* Rich.) – представитель погруженных растений, широко распространенный в пресноводных водных объектах умеренной зоны (Рис.7.3). Стебли растения способны вырастать до 3 м в длину и образовывать мощные заросли. Растет, свободно плавая в толще воды в течение всего года.

Длинные шнуровидные стебли элодеи покрыты удлиненными, прозрачными листьями ярко-зеленого цвета размерами до 1 см в длину и 0,5 см в ширину. Листочки ярко-зелёные, прозрачные, от продолговатояйцевидных до линейно-ланцетных, слегка курчавые, острые, по киллю

мелкопильчатые. В макушечных частях стебля листочки бывают всегда светлее окраской, нежели в нижних.



Рис. 7.3 – Элодея канадская *Elodea canadensis*

Пускает длинные, сильно разветвлённые стебли, растущие чрезвычайно быстро и достигающие нередко длины более двух метров. Стебель, сначала плавающий, легко укореняется, пуская длинные, до 40 см, белые корни. Стебли очень длинные, тонкие, ломкие и покрыты продолговато-линейными листочками, которые расположены довольно густыми мутовками, по три листа в каждой.

Размножается элодея вегетативным путем за счет образования густо облиственных боковых отростков, побегов из подземных частей (корневищ) или из нижних частей летних побегов. Теневынослива. Температурная граница выживаемости лежит в пределах от +5°C до 41,5°C.

Цветки двоякие: женские и мужские и расположены на отдельных особях. Женские цветки одиночные небольшие, состоят из шести лепестков, трёх внутренних и трёх наружных, и сидят на длинных нитевидных цветоножках, три рыльца их ярко-малиновые и бахромчатые. Чашелистиком три, они красноватые или зеленоватые. Цветки эти распускаются не ранее как цветоножка достигнет поверхности воды. Мужские цветки почти сидячие, с девятью сидячими пыльниками, во время цветения отрывающимися от материнского растения, или же на удлиняющейся цветоножке, достигающие поверхности водоёма. В России, как и в Западной Европе, растения с мужскими цветками не встречаются, а имеются только одни женские экземпляры. Завязь с тремя – двадцатью семяпочками.

Условия лабораторного содержания

Для культивирования растения отбирают из естественной популяции условно чистого водного объекта в конце мая – начале июня, когда появляется много молодых, наиболее жизнеспособных растений.

У элодеи отбирают зеленые верхушечные побеги длиной 8 – 10 см без боковых отростков и корней, не имеющие видимых повреждений. Отобранные растения транспортируют в сосудах с водой, взятой из того же водного объекта.

В лаборатории элодею размещают в большие широкие, но не глубокие емкости (10 – 15 дм³). Растения проходят акклимацию при комнатной температуре в течение 7 – 10 дней, достаточной освещенности (лучше – в люминистатной установке) и при смене воды каждые 2 – 3 суток.

Рекомендуемая температура воды 16 – 24 °С. Хорошо переносит длительное снижение температуры до 12 °С. Жесткость и активная реакция воды для элодеи значения не имеют, она прекрасно растет и в очень мягкой, и в жесткой воде. Но необходимо учитывать характеристики воды при перемещении растения из одного аквариума в другой.

Освещение для элодеи должно быть достаточно яркое, но она может выдержать умеренное затенение. Для искусственного освещения подходят люминесцентные лампы типа ЛБ и лампы накаливания. Мощность осветителей подбирают индивидуально в зависимости от того, как расположен аквариум и какие растения окружают элодею. Прямой естественный свет для нее очень полезен.

Зимой в естественных условиях при недостатке освещения и низкой температуре элодея опускается на грунт, сохраняя ростовые почки. После улучшения условий растение опять начинает бурно расти. В аквариуме при поддержании удовлетворительной температуры воды и достаточном освещении элодея растет круглый год.

Для проведения экспериментов и культивирования растений используют отстаивную водопроводную воду или воду из незагрязняемого водного объекта. Природную воду процеживают через воронку диаметром 150 мм с планктонной сеткой (газ N 68) для удаления взвеси и мелких организмов, заливают в аквариум с постоянной продувкой воздуха.

Для исследований воду используют через 4 – 5 дней. Сосуды располагают у окон на дневном рассеянном свете (с южной стороны) или в люминистате при освещенности 1,5 – 2 лк на протяжении 10 – 12 часов и при температуре 22-25°С. Для измерения температуры раствора рядом ставят стакан с водой и термометром. В воду добавляют среду Успенского N 1 (разведение 1:10), которая способствует быстрому образованию боковых отростков и увеличению биомассы растения и дает возможность

круглогодичного содержания растений, пригодных для экспериментов. Предварительно приготовленные основные растворы держат в холодильнике, затем из них вносят по 0,5 см на 1 дм дистиллированной воды. Реакция среды, рН, после стерилизации раствора (равномерным кипячением в течение 0,5ч) составляет 7,0 – 7,3 единиц.

Для работы с растениями необходимо следующее *оснащение и оборудование*:

- люминодатная установка;
- круглые аквариумы на 10 – 15 л;
- кристаллизаторы объемом 1л;
- стаканы объемом 0,5л;
- люксметр;
- термометр;
- линейка;
- пинцет, лезвие;
- воронка, набор пипеток, стеклянная палочка;
- планктонный газ N 68, фильтровальная бумага.

Проведение исследований

Для экспериментов используют верхнюю часть побега элодеи длиной 4 см без боковых отростков и корней и по 5 экземпляров помещают в кристаллизаторы с растворами исследуемого вещества и с водой без токсиканта объемом по 1 дм³. Для каждой концентрации и для контроля используют по три таких сосуда. Сосуды размещают в люминистате или у окон на дневном рассеянном свете с досвечиванием лампами дневного света при температуре 17 – 22°C и освещенности до 2лк.

До проведения хронического эксперимента следует в предварительном 10-дневном опыте установить диапазон действующих концентраций вещества. Из раствора, вызывающего гибель половины особей (ЛК₅₀) за 10 суток, для проведения хронического опыта готовят не менее 3 – 6 разведений, различающихся между собой на порядок.

Опыты продолжительностью не менее 30 суток наиболее удобно проводить в летний период. Смену всех растворов и воды в контроле проводят (в зависимости от стабильности вещества) через 2 – 5 суток.

Состояние выборок учитывают каждые 5 суток.

Учет и анализ результатов

Оценку токсичности веществ для элодеи осуществляют по следующим параметрам:

а) состояние растений (изменение окраски, потеря тургора, повреждение точек роста и др.);

- б) выживаемость и прирост основного побега;
- в) число боковых отростков и их длина;
- г) число и длина корней.

Прирост основного побега элодеи определяют, вычитая исходные 4 см. Суммарный прирост растения составляет сумму прироста основного побега и длины боковых отростков. Прирост выражают в сантиметрах, число боковых отростков и корней – в штуках (экз.).

У элодеи в лабораторных условиях боковые отростки и корни появляются, как правило, на 10 – 20 сутки. Отмечают время их появления. Прирост, число и длину боковых отростков и корней рассчитывают на одно растение.

Элодея примечательна ещё тем, что в её тканях, как и в тканях валлиснерии, можно наблюдать в микроскоп движение цитоплазмы. Для этого наблюдения берут лист из верхушки (конца ветки), кладут его в воду на стекло и прикрывают покровным стеклом. Сильнее всего движение в листке близ той части, где он оторван. В случае, если движение очень слабо, его можно ускорить, положив лист в тёплую воду (37 – 42°C).

Задания:

1. Провести биотестирование отобранных проб воды.
2. Провести математическую обработку полученных результатов методом вариационной статистики.
3. Построить графики зависимостей «доза-концентрация — эффект», «доза — время — эффект».
4. По полученным графикам определить а) диапазон действующих концентраций (разбавлений); б) время наступления 50- и 100 % - ной гибели рачков.

Вопросы для самоконтроля

1. Характеристика дафнии *Daphnia magna* как тест-объекта.
2. Условия культивирования и содержания дафний.
3. Методика проведения биотестирования проб воды с использованием дафний.
4. Использование ряски *Lemna minor* в биотестировании.
5. Характеристика ряски *Lemna minor* при оценке качества воды.
6. Характеристика элодеи *Elodea canadensis* как тест-объекта.

8 БИОТЕСТИРОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ СУБСТРАТОВ ПО ПРОРОСТКАМ РАЗЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ-ИНДИКАТОРОВ (лабораторная работа)

Цель занятия: изучить метод биологической оценки субстратов по проросткам растений.

Задачи: освоить метод оценки субстратов а) по изменению выращиваемых растений на субстрате; б) при поливе растений исследуемыми растворами.

Предлагаемый метод биологической оценки субстратов или растворов проводится в двух вариантах:

1. Выращивание растений на субстратах, токсичность которых надо оценить (почва, вода).

2. Полив проростков испытуемыми растворами (вытяжка из почвы или сточные воды различных предприятий) с той или иной степенью их концентрации и очистки.

В вариантах применяют самые различные тест – растения (в зависимости от поставленной задачи): пшеница, овес, ячмень, кресс-салат, салат майский, редис, проростки древесных пород.

8.1 Выращивание растений на испытуемом субстрате

Оборудование и материалы

Для испытания твердых субстратов:

- пластмассовые стаканчики;
- пинцеты; трубочки для полива;
- пленка;
- испытуемый объект;
- ростки тест-растений.

Проведение эксперимента

Субстрат (почва, измельченный торф) закладывают в стаканчики, увлажняют одинаковым количеством воды. Семена тест-растений предварительно намачивают в отстоянной и очищенной водопроводной воде, раскладывают на два слоя фильтровальной бумаги в большую кювету, помещают в термостат для проращивания при температуре +25°C – +26°C. Когда длина coleoptилей достигнет 10 – 15 мм и появятся корни, ростки разделяют на фракции по длине и рассаживают по 10 растений каждой фракции в стаканчики на испытуемый субстрат. Контроль – субстрат, взятый

в относительно чистой зоне. Полив производят через трубочку отстоянной и очищенной водопроводной водой.

Когда ростки достигнут длины 6 – 10 см (через 1 – 2 недели), производят их измерение и взвешивание. Ростки разделяют на части (надземная часть, корни) и каждую часть измеряют и взвешивают отдельно. В качестве тестовых растений можно использовать практически любые семена.

8.2 Определение токсичности почв

Оборудование и материалы

Для выполнения теста на определение токсичности почв потребуются:

- чашки Петри;
- семена кресс-салата и редиса;
- пробы почвы из исследуемого биотопа.

Проведение эксперимента

В каждую чашку Петри вносят образец исследуемой почвы, увлажняют его и засевают приблизительно 50 семенами кресс-салата и 25 семенами редиса. Чашки желательнее экспонировать в люминостате с режимом 12 ч света / 12 ч темноты. Оптимальная температура – около 20 — 22 °С. Период экспозиции должен составлять от 7 до 10 дней. Для получения достоверных данных опыты для каждого из участков биотопа ставят не менее чем в трех повторностях. В конце периода эксперимента учитывают следующие показатели:

- 1) всхожесть семян (% взошедших от общего количества высеянных);
- 2) длину зародышевого корешка;
- 3) длину побега.

О токсичности исследуемых проб почвы судят путем статистического сравнения с контрольными данными. В качестве контроля можно использовать почву того же типа, что и в эксперименте, но отобранную в заведомо незагрязненном биотопе.

8.3 Испытание воды и других жидких субстратов (вытяжка из почвы, осадки, растворы гербицидов и др.)

Оборудование и материалы

Для испытания воды или других жидких субстратов (например, вытяжки из почвы) потребуются:

- кюветы (в качестве небольших пластмассовых кювет можно использовать четырехугольные емкости из-под сметаны);
- пластмассовые крышки к кюветам с отверстиями;
- пинцеты;

- ростки тест-растений.

Проведение эксперимента

Вода может использоваться в том виде, в котором она содержится в водоеме или сконцентрирована упариванием (тогда результаты получаются особенно четкими). Сточная вода предприятий может быть разбавлена. Воду наливают в кювету, в крышке которой просверливают отверстия чуть меньше испытуемых семян. Крышка должна слегка касаться воды. В отверстия вставляют проросшие ростки так, чтобы их корни достигали воды, и выращивают до длины 6 – 10 см. Контролем служит отстоянная и очищенная водопроводная вода (пропущенная через фильтр для очистки питьевой воды).

После того, как ростки вырастут, их вынимают из воды, обсушивают фильтровальной бумагой, определяют длину и массу отдельно надземной части и корневой системы. Результаты обрабатывают статистически, выражают в процентах по отношению к контролю, принятому за 100%. Строят диаграммы биотестовых испытаний.

Таким же образом можно испытать растворенные в воде токсические вещества (например, смывы гербицидов с полей вместе с почвой).

8.4 Метод полива проростков тест-растений испытуемой загрязненной водой

Оборудование, материалы:

- стаканчики;
- кюветы;
- фильтровальная бумага;
- промытый и прокаленный песок;
- проростки тест-растений: пшеницы, овса и др.

Проведение эксперимента

В стаканчики помещают одинаковое количество промытого и прокаленного песка (другой какой-либо почвы), в который высаживают по 10 одинаковых проростков тест-растений. Песок поливают сверху одинаковым количеством испытуемой воды. Повторность – трехкратная. Контроль – полив отстоянной и очищенной водопроводной водой. После достижения ростками высоты 8 – 10 см их выкапывают, обсушивают фильтровальной бумагой, разделяют бритвой на части (стебель, корни), измеряют и взвешивают. Данные обрабатывают статистически, выражают в процентах к контролю.

Задания:

1. Провести биотестирование отобранных проб воды согласно методикам, изложенным выше.

2. Провести математическую обработку полученных результатов методом вариационной статистики. Сделать соответствующие выводы.

9 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПЫЛЬЮ (ПО ЕЁ НАКОПЛЕНИЮ НА ЛИСТОВЫХ ПЛАСТИНКАХ РАСТЕНИЙ) (лабораторная работа)

Цель занятия: освоить методику использования весового метода в оценке загрязнения окружающей среды.

Задачи: научиться отбирать растительные образцы; освоить метод определения количества пыли на листьях древесных культур.

В условиях городов и других обжитых территорий одним из мощных загрязнителей воздуха является пыль, которая переносится на большие расстояния при распылении почв, при выбросах от цементных, керамических заводов, предприятий по производству силикатного кирпича, а также от движущегося автотранспорта. В последнем случае это мелкие частички почвы и различных солей, продукты снашивания шин и размельчения асфальтового покрытия. Все эти частицы, составляющие пыль, оседают на листьях, вдыхаются человеком, вызывая нарушение работы дыхательных путей, силикозы, провоцируя кашель и слезотечение. Наибольшее задержание пыли листьями отмечено у различных видов тополей, которые распространены в озеленительных посадках городов России и СНГ. Тополь вообще является наиболее устойчивыми из древесных пород к различным типам воздушных загрязнений.

Оборудование, материалы:

- весы торзионные;
- термостат;
- калька;
- вата;
- пинцеты;
- фильтровальная бумага;
- линейки;
- карта части города;
- садовый секатор на сборной штанге;
- микроскоп.

Проведение эксперимента

Листья одного вида тополя, наиболее распространенного в городе (черного, бальзамического и др.), отбирают заранее (на отмеченных по карте местах) с высоты 1,5 – 3 м (высота слоя воздуха, вдыхаемого человеком) в 10-15-кратной повторности. Для этого используется садовый секатор на сборной штанге. Одновременно отбирают листья тополей, произрастающих в чистой зоне (контроль). Листья помещают в пакеты из кальки и осторожно доставляют в лабораторию, избегая стряхивания пыли.

Методы определения количества пыли

1. В лабораторных условиях на торсионных или аналитических весах взвешивают кусочек влажной ваты, завернутый в кальку (до 0,001 г). Лист тополя тщательно обтирают этой ваткой с двух сторон (разворачивать кальку следует с помощью пинцета), после чего ватку взвешивают в кальке повторно.

Массу пыли (P) рассчитывают как разницу между вторым и первым взвешиванием $P = P_2 - P_1$ (9.1)

Площадь листа высчитывают путем обмера листовых пластинок вдоль (a) и поперек (b) и умножением на переводной коэффициент (k):

$$S = a * b * k \quad (9.2)$$

Коэффициент колеблется для различных видов тополей от 0,60 до 0,66. Конечный результат выглядит так: $M = P/S$ мг/см², (9.3)

где: M – масса пыли на 1 см² листа.

2. Фильтровальную бумагу смачивают водой до стекания. На нее помещают лист своей верхней, а затем рядом – нижней стороной, и прикрывают листом кальки или пленкой. На фильтре получается отпечаток, который оценивают визуально по степени загрязнения (сплошное – 100%, наполовину – 50% и т. д.).

Для этих же целей можно использовать липкую пленку «скотч», которую накладывают на лист растения, снимают и приклеивают к белому листу бумаги.

3. Пыль смывают с 30 – 50 листьев кисточкой в предварительно взвешенную испарительную чашку, воду упаривают, чашку с пылью высушивают в сушильном шкафу при температуре +105°С до постоянной массы, а затем взвешивают. Количество пыли рассчитывают в мг на см² листа.

Построение карты загрязнения пылью определенной территории

Полученные данные по запыленности листьев в разных экологических условиях выписывают на доску, сравнивают с контролем (принимается за 100%). Берут примерную карту района или участка города, на нее наносят данные по загрязнению листьев, сходные по степени загрязнения участки

соединяют изолиниями. Раскрашивают разными карандашами: красный – зона наибольшего загрязнения, оранжевый – сильного, розовый – среднего, слабо розовый – слабого и зеленый – чистая зона.

Задания:

1. Провести исследования согласно предложенной методике.
2. Полученные данные занести в таблицу 9.1.

Таблица 9.1 – Результаты определений количества пыли

Место взятия проб	Площадь листьев тополя	Количество пыли	
		Мг/см ²	% от контроля

3. Построить карту загрязнения пылью.

10 ВЛИЯНИЕ НЕФТИ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ (лабораторная работа)

Цель работы: с помощью метода биотестирования определить токсичность нефтезагрязненных почв для растений.

Задачи: освоить метод оценки загрязненности почв; оценить влияние нефти на рост и развитие растений.

Методика проведения эксперимента

Необходимые материалы и оборудование:

- семена растений;
- почва;
- нефть;
- весы технические;
- ступка фарфоровая с пестиком;
- чашки Петри;
- шпатель;
- пипетка объемом 10 см³.

Проведение испытания и оценка результатов

Предварительно измельченную в ступке почву тщательно перемешивают и берут навеску 200 г. Готовят загрязненную пробу почвы, для этого в отмеренное количество (навеску почвы) вносят нефть (10 мл) и тщательно

перемешивают. Полученная проба соответствует содержанию нефти 50 мл/кг. Для получения последующих проб почвы, с меньшим количеством нефти, смешивают одинаковое количество загрязненной нефтью почвы и чистой (по 100 г). таким образом получают исследуемых концентраций: 50,0; 25,0; 12,5; 6,25 и 3,125 мл/кг.

Исследования проводятся в 2 – 3 повторностях.

В каждую чашку Петри помещают по 40 г почвы и по 10 (и более, в зависимости от размеров) экземпляров семян, равномерно распределяя их по всей площади сосуда.

Длительность эксперимента – 14 суток.

Исследуемые тест-функции: выживаемость, процент всхожести, длина побегов и корней.

В качестве контроля используется чистая почва.

Данные наблюдений заносят в таблицу (табл. 10.1).

Таблица 10.1 – Влияние нефтезагрязненной почвы на рост и развитие растений

Тест-функции	Концентрация нефти, мл/кг					
	Контроль	3,125	6,25	12,5	25,0	50,0
выживаемость						
% всхожести						
длина побега, см						
длина корня, см						

Задания:

1. Провести математическую обработку результатов биотестирования методом вариационной статистики.
2. Построить график зависимости «доза-эффект».
3. Определить летальную, вызывающую 50-% гибель растений, и недействующую концентрации нефти.
4. Сделать соответствующие выводы.

Список использованных источников

1. Абакумов В.А., Бубнова Н.П. Контроль качества поверхностных вод по гидробиологическим показателям./ В.А. Абакумов, Н.П. Бубнова. – М.: Гидрометеиздат, 1979. – 5 с.
2. Акатьева Т.Г. Действие на компоненты водных экосистем технических смесей, применяемых при нефтедобыче (на примере ингибиторов коррозии ИКБ-2-2 и ИКБ-6-2). Диссерт. на соискание канд. биол. наук /Т.Г. Акатьева. – Борок: ИБВВ, 2003. – 165 с.
3. Алексеев Ю.В. Тяжелые металлы в почвах и растениях / Ю.В. Алексеев. – Л.: Агропромиздат, 1987.
4. Баженов С.В. Ветеринарная токсикология / С.В. Баженов. – Л.: Колос, 1974. – С. 42- 45.
5. Бакиров Б.К. Анализ критериев опасности загрязнения атмосферы для растений./ Б.К. Бакиров.- <http://do.gendocs.ru>
6. Баканов А.И. Использование зообентоса для мониторинга пресноводных водоемов (обзор) / А.И. Баканов // Биология внутренних вод. – 2000. – №1. – С. 68–82.
7. Балушкина Е.В. Функциональное значение хирономид в континентальных водоемах./ Е.В. Балушкина. – Л.: Наука, 1989. – 152 с.
8. Безматерных Д.М. Зообентос притоков Верхней Оби /Д.М. Безматерных // Ползуновский вестник. – 2004а. – №2. – С. 155–161.
9. Безматерных Д.М. Методы индикации экологического состояния по составу и структуре зообентоса /Д.М. Безматерных // Межрегиональный экологический форум: Сборн. матер. – Барнаул: Printexpress, 2004б. – С. 66–69.
10. Безматерных Д.М. Зообентос как индикатор экологического состояния водных экосистем Западной Сибири (аналит. обзор) /Д.М. Безматерных // Гос. публич. науч.-техн. б-ка Сиб. отд-ния Рос. акад. наук; Ин-т вод. и экол. проблем. – Новосибирск, 2007. – 87 с.
11. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем. /Под ред. Р. Шуберта. – М.: Мир, 1988.
12. Биологический контроль окружающей среды: Биоиндикация и биотестирование /О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др. – М.: Изд. центр «Академия», 2007.
13. Биотестирование как наиболее целесообразный метод определения интегральной токсичности почвы.- <http://www.newecologist.ru>
14. Болл Р. М., Коннел Дж. Х. Руководство по биометрии / Р. М. Болл, Дж. Х. Коннел. – <http://www.e5.ru>.

15. Временные методические указания гидрометеорологическим станциям и постам по отбору, подготовке проб воды и грунта на химический и гидробиологический анализ и проведению анализа первого дня. – М.: Гидрометеоиздат, 1983.

16. Вудивисс Ф. Биотический индекс реки Трент. Макробеспозвоночные и биологическое обследование /Ф. Вудивисс // Научные основы контроля качества поверхностных вод по гидробиологическим показателям: Тр. совет.-англ. семинара. – Л.: Гидрометеоиздат, 1977. – С. 132–161.

17. ГОСТ 28168-89. Почвы. Почвы. Отбор проб. – [Электронный ресурс] <http://www.files.strayinf.ru>

18. Грудзинская И. А. Семейство Аронниковые (Araceae) /Под. ред. А. Л. Тахтаджяна // Жизнь растений. В 6-ти т. Т. 6. Цветковые растения. - М.: Просвещение, 1982.- С.493—500.

19. Губанов И.А. *Elodea Canadensis* Michx., *Lemna minor* L. - Ряска маленькая /И.А. Губанов //Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т.- Т. 1. Папоротники, хвощи, плауны, голосеменные, покрытосеменные (однодольные). - М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2002.

20. Денисова С.И. Полевая практика по экологии. / С.И. Денисова. – Минск, 1999.

21. Дончева А.В. и др. Ландшафтная индикация загрязнения природной среды. / А.В. Дончева, Л.К. Казаков, В.Н. Калущков. – М.: Экология, 1992.

22. Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. /Н.С. Жмур. – М.: Международный Дом Сотрудничества, 1997.

23. Жмур Н.С. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. /Н.С. Жмур. – М.: РЭФИА, НИА-ПРИРОДА, 2002.

24. Золотницкий Н. Ф. Аквариум любителя./ Н. Ф. Золотницкий. - М: Terra, 1993.- 784 с.

25. Иванов Ю.И., Полянский Ю.И. Большой практикум по зоологии беспозвоночных / Ю.И. Иванов, Ю.И. Полянский. – М.: Высшая школа, 1981.- 263 с.

26. Исаченко – Боме Е.А. Оценка современного состояния водных экосистем бассейна реки Туры по структуре макрозообентоса в условиях хронического антропогенного воздействия. Автореферат дис. ...канд. биол. наук / Е.А. Исаченко – Боме. – Борок: ИБВВ, 2004. – 24 с.

27. Каплин В.Г. Биоиндикация состояния экосистем. /В.Г. Каплин. – Самара: СГСХА, 2001.
28. Каплин В.Г. Основы экотоксикологии / В.Г. Каплин. – М: КолосС, 2006.
29. Кикнадзе И.И. и др. Кариофонды хирономид криолитозоны Якутии. /И.И. Кикнадзе, А.Г. Истомина, Л.И. Гундерина. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1996. – 160 с.
30. Козлова Л.Н. Влияние атмосферного загрязнения на транспирацию растений / Л.Н. Козлова // Средоулучшающая роль леса.- Новосибирск: Наука, 1984.
31. Константинов А.С. Общая гидробиология./ А.С. Константинов. – М.: Высш. шк., 1979. –480 с.
32. Лакин Г.Ф. Биометрия./ Г.Ф.Лакин. – М.: Высш. школа, 1990.–352 с.
33. Левин А. И. Биоиндикация загрязнений. /А. И. Левин. - [Электронный ресурс] <http://www.books.ru>
34. Макрушин А.В. Библиографический указатель по теме «Биологический анализ качества пресных вод» с приложением списка видов-индикаторов./ А.В. Макрушин. – Л.: АН СССР, 1974а. – 60 с.
35. Макрушин А.В. Биологический анализ качества вод / Под ред. Г.Г. Винберга. – Л.: АН СССР, 1974б. – 60 с.
36. Макрушин А.В. Возможности и роль биологического анализа в оценке степени загрязнения водоемов / А.В. Макрушин // Гидробиол. журн. – 1974в. – Т. 10. – №2. – С. 98–104.
37. Мартынова М.В. Роль некоторых бентосных организмов в удалении соединений азота и фосфора из донных отложений (обзор) / М.В. Мартынова // Гидробиол. журн. – 1985. – Т. 21. – №6. – С. 44–48.
38. Методы биотестирования качества водной среды / Под ред. О.Ф. Филенко. – М.: МГУ, 1989. – 106 с.
39. Мэннинг У. Дж., Федер У.А. Биомониторинг загрязнения атмосферного воздуха с помощью растений / У. Дж. Мэннинг, У.А. Федер. – М.: Гидрометеиздат, 1985. – 143 с.[Электронный ресурс] <http://www.biblus.ru>
40. Наумова Н. Н. Метод определения качества воды с помощью индекса Вудивисса / Н. Н. Наумова. - [Электронный ресурс] <http://www.eco.nw.ru>
41. Нестерова А.А., Нестеров И.А. Определение листовой площади тополя и ущерба, наносимого городу при обрезке тополей/ А.А. Нестерова, И.А. Нестеров.- [Электронный ресурс] [http:// omskelecom.ru](http://omskelecom.ru)

42. Новиков Ю. В. и др. Методы исследования качества воды водоемов/ Ю. В. Новиков, К. О. Ласточкина, З. Н. Болдина. – М.: Медицина, 1990. – 400 с.
43. Опекунова М.Г. Биоиндикация загрязнений / М.Г. Опекунова.- [Электронный ресурс] <http://www.books.ru>
44. Плохинский Н.А. Биометрия. / Н.А. Плохинский. - М.: Изд-во МГУ, 1970. - 367 с.
45. Порядок организации разработки и утверждения ПДК и ОБУВ загрязняющих веществ в воде рыбохозяйственных водных объектов. – М: Роскомрыболовство, 1995.
46. Пробоотборник для почв [Электронный ресурс] <http://www.komponent-nov.ru>
- 47.Тодераш И.К. Функциональное значение хирономид в экосистемах водоемов Молдавии./ И.К. Тодераш. – Кишинев: Штиинца, 1984. – 172 с.
48. Федорова А.И, Никольская А.Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды./ А.И. Федорова, А.Н.Никольская. – М.: ВЛАДОС, 2001. - 288 с.
49. Филенко О.Ф. Водная токсикология. /О.Ф. Филенко. – Черноголовка, 1988.
50. Филенко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. / О.Ф. Филенко, И.В. Михеева. - М: Колос, 2007.
51. Чернов Ю.И. Биологическое разнообразие: сущность и проблемы / Ю.И. Чернов //Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111. – Вып. 4. – С. 499–507.
52. Экологические проблемы Верхней Волги: Коллективная монография. – Ярославль: ЯГТУ, 2001. – 427 с.
53. Goodnight C.J., Whitley L.S. Oligochetes as indicators of pollution // Proc. 15-th Ind. Waste Conf., Purdue Univ. Ext., Sec. – 1961. – V. 106. – P. 139–142.

**ВАРИАНТЫ ЗАДАНИЙ К ТЕМЕ «ЗАВИСИМОСТЬ «ДОЗА,
КОНЦЕНТРАЦИЯ, ВРЕМЯ И ЭФФЕКТ»**

Вариант 1

Построить график изменения содержания кислорода (мг/л) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 1.

Таблица А 1 Изменение содержания кислорода в воде под влиянием ингибитора коррозии ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
0	7,6	6,8	6,5	6,1	5,9	5,4
2	6,6	5,9	5,7	5,5	4,8	4,0
4	8,6	7,1	5,8	5,6	5,2	5,1

Вариант 2

Построить график изменения численности клеток одноклеточных водорослей - сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (млн./мл) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 2.

Таблица А 2 Влияние ингибитора ИКБ-6-2 на численность клеток сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda*

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
1	0,28	0,27	0,25	0,23	0,22	0,20
3	0,53	0,43	0,40	0,37	0,35	0,31
5	0,67	0,54	0,48	0,40	0,40	0,35

Вариант 3

Построить график выживаемости клеток одноклеточных водорослей - сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (%) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 3.

Таблица А 3 Влияние ингибитора ИКБ-6-2 на выживаемость клеток сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (%)

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
1	83,0	86,0	80,0	78,0	72,0	65,1
3	80,5	75,8	70,3	68,3	63,2	47,3
5	80,0	67,2	64,0	56,0	54,1	41,5

Вариант 4

Построить график содержания хлорофилла «а» (мг/л) в культуре одноклеточных водорослей сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 4.

Таблица А 4 Содержание хлорофилла «а» (мг/л) в культуре сценедесмуса - *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л			
		0,01	0,1	1,0	10,0
1	91	87	80	73	66
3	174	157	131	123	112
5	273	197	183	164	145

Вариант 5

Построить график содержания каротиноидов (мг/л) в культуре одноклеточных водорослей – сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 5.

Таблица А 5 Содержание каротиноидов (мг/л) в культуре сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л			
		0,01	0,1	1,0	10,0
1	66,4	65,2	62,3	60,1	43,6
3	130,7	117,6	114,3	110,1	84,3
5	168,1	109,3	107,2	103,7	101,5

Вариант 6

Построить график изменения численности клеток одноклеточных водорослей – сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (млн./мл) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 по данным таблицы А 6.

Таблица А 6 Влияние ингибитора ИКБ-2-2 на численность клеток сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda*

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
1	0,36	0,34	0,33	0,32	0,31	0,33
3	1,41	1,20	1,18	1,01	0,92	0,62
5	2,15	1,69	1,65	1,45	1,29	0,90

Вариант 7

Построить график выживаемости клеток одноклеточных водорослей – сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (%) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 7.

Таблица А 7 Влияние ингибитора ИКБ-2-2 на выживаемость клеток сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (%)

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
1	78,8	77,1	76,3	75,3	75,0	71,2
3	76,2	70,2	68,9	66,1	63,2	61,4
5	75,1	56,3	48,8	43,6	42,3	35,2

Вариант 8

Построить график содержания хлорофилла «а» (мг/л) в культуре одноклеточных водорослей – сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 8.

Таблица А 8 Содержание хлорофилла «а» (мг/л) в культуре сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора ИКБ-2-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л			
		0,1	1,0	10,0	100,0
1	91,1	90,3	83,2	75,2	69,6
3	204,4	173,1	164,6	153,2	120,3
5	320,5	251,6	235,0	192,3	170,0

Вариант 9

Построить график содержания каротиноидов (мг/л) в культуре одноклеточных водорослей – сценедесмус *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 9.

Таблица А 9 Содержание каротиноидов (мг/л) в культуре сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* в растворах ингибитора ИКБ-2-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л			
		0,1	1,0	10,0	100,0
1	66,4	63,2	62,3	60,1	53,3
3	130,7	120,3	112,5	109,9	95,1
5	187,2	137,4	132,3	122,5	102,6

Вариант 10

Построить график изменения длины основного побега (см) элодеи - *Elodea canadensis* в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 10.

Таблица А 10 Влияние ингибитора ИКБ-6-2 на изменение длины основного побега *Elodea canadensis*, см

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		6,25	12,5	25,0	50,0	100,0
2	4,19	4,08	4,03	3,95	3,81	3,75
4	4,32	3,97	3,91	3,64	3,55	3,41
6	4,52	4,11	3,80	3,60	3,20	2,93

Вариант 11

Построить график выживаемости ветвистоусых рачков *Daphnia magna* (среднее количество рачков в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А11.

Таблица А 11 Влияние ингибитора ИКБ-6-2 на выживаемость *Daphnia magna*

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ИКБ-6-2, мг/л				
		0,01	0,05	0,1	0,5	1,0
1	10,0	10,0	10,0	9,0	8,5	8,0
2	10,0	10,0	9,5	8,7	8,0	7,2
4	10,0	10,0	9,0	5,5	3,5	1,5

Вариант 12

Построить график выживаемости ветвистоусых рачков *Daphnia magna* (среднее количество рачков в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 12.

Таблица А 12 Влияние ингибитора ИКБ-2-2 на выживаемость *Daphnia magna*

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ИКБ-2-2, мг/л				
		0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
1	10,0	10,0	10,0	9,7	9,3	9,0
2	10,0	10,0	10,0	9,0	8,5	8,0
4	10,0	10,0	10,0	8,5	6,0	3,5

Вариант 13

Построить график выживаемости бокоплавов *Gammarus lacustris* (среднее количество рачков в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 по данным таблицы А 13.

Таблица А13 Влияние ингибитора ИКБ-6-2 на выживаемость бокоплавов *Gammarus lacustris*, шт.

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ИКБ-6-2, мг/л				
		0,1	1,0	5,0	10,0	20,0
1	10,0	9,5	9,0	8,0	7,7	3,0
3	10,0	7,0	6,0	5,7	4,0	1,5
4	10,0	6,0	5,5	4,8	4,0	1,0

Вариант 14

Построить график изменения удельного прироста массы тела (мг/особь/сутки) бокоплавов *Gammarus lacustris* в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 14.

Таблица А 14 Влияние ингибитора ИКБ-6-2 на изменение удельного прироста массы тела бокоплавов *Gammarus lacustris*, (мг/особь/сутки)

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ИКБ-6-2, мг/л				
		0,0001	0,001	0,01	0,1	1,0
14	1,6	1,4	0,80	0,50	0,300	0,25
21	0,6	0,5	0,30	0,25	0,100	0,08
30	0,3	0,2	0,14	0,10	0,045	0,03

Вариант 15

Построить график выживаемости бокоплавов *Gammarus lacustris* (среднее количество рачков в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 15.

Таблица А 15 Влияние ингибитора ИКБ-2-2 на выживаемость бокоплавов *Gammarus lacustris*, шт.

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ИКБ-2-2, мг/л				
		62,5	125,0	250,0	500,0	1000,0
1	10,0	9,3	9,0	7,5	5,7	3,0
4	10,0	8,0	7,0	5,0	3,0	1,3
10	10,0	7,0	6,0	4,3	2,5	1,0

Вариант 16

Построить график выживаемости моллюсков *Planorbis planorbis* (среднее количество животных в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 по данным таблицы А 16.

Таблица А 16 Изменение выживаемости моллюсков *Planorbis planorbis* (шт.) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		250	500	750	1500	2500
1	10,0	10,0	9,5	9,0	8,7	7,5
4	10,0	9,0	8,7	8,0	6,7	4,8
10	10,0	8,7	8,3	7,3	4,5	3,2

Вариант 17

Построить график выживаемости моллюсков *Lymnaea stagnalis* (среднее количество животных в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 17.

Таблица А 17 Изменение выживаемости моллюсков *Lymnaea stagnalis* (шт.) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		3,4	6,8	9,4	12,5	18,8
1	10,0	10,0	9,3	8,5	7,0	5,3
4	10,0	10,0	8,5	4,5	2,0	1,0
10	10,0	10,0	7,5	4,0	1,0	0,0

Вариант 18

Построить график выживаемости ветвистоусых рачков *Daphnia magna* (среднее количество рачков в 3-х повторностях) в растворах бурового шлама (отходы бурения) по данным таблицы А 18.

Таблица А 18 Влияние бурового шлама на выживаемость ветвистоусых рачков *Daphnia magna* (шт.) в острых опытах

Сутки опыта	Контроль	Концентрация бурового шлама, г/л				
		10	20	50	100	200
1	10,0	10,0	8,3	7,6	6,0	5,8
2	10,0	10,0	7,3	6,8	5,3	4,2
4	10,0	10,0	6,6	6,0	4,6	2,5

Вариант 19

Построить график выживаемости ветвистоусых рачков *Daphnia magna* (среднее количество рачков в 3-х повторностях) в растворах бурового шлама (отходы бурения) в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 19.

Таблица А 19 Выживаемость ветвистоусых рачков *Daphnia magna* (шт.) в растворах бурового шлама в хроническом опыте

Сутки опыта	Контроль	Концентрация бурового шлама, г/л				
		6,25	12,5	25,0	50,0	100,0
10	10,0	10,0	8,7	8,0	7,3	6,7
20	10,0	10,0	7,3	6,8	6,3	5,7
30	10,0	10,0	6,6	6,0	4,3	3,7

Вариант 20

Построить график выживаемости олигохет (малоцетинковые кольчатые черви) *Limnodrilus hoffmeisteri* (среднее количество животных в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 (табл. А 20).

Таблица А 20 Выживаемость олигохет *Limnodrilus hoffmeisteri* (шт.) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		0,01	0,1	1,0	10,0	20,0
1	10,0	10,0	9,3	8,0	7,5	4,3
2	10,0	8,5	7,3	6,0	4,3	3,5
4	10,0	7,0	6,7	4,4	1,7	1,3

Вариант 21

Построить график выживаемости олигохет (малощетинковые кольчатые черви) *Limnodrilus hoffmeisteri* (среднее количество животных в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества по данным таблицы А 21.

Таблица А 21 Выживаемость олигохет *Limnodrilus hoffmeisteri* (шт.) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		10,0	100,0	250,0	500,0	1000,0
1	10,0	10,0	9,5	9,2	7,3	7,0
2	10,0	10,0	8,3	8,0	7,0	6,5
4	10,0	9,3	7,6	7,5	6,7	4,7

Вариант 22

Построить график выживаемости аквариумных рыбок гуппи *Lebistes reticulata* (среднее количество животных в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 по данным таблицы А 22.

Таблица А 22 Выживаемость гуппи *Lebistes reticulata* (шт.) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		0,6	1,25	2,5	5,0	10,0
1	10,0	10,0	8,0	6,2	5,7	4,1
2	10,0	10,0	6,3	4,3	4,8	3,5
4	10,0	10,0	5,8	3,0	2,5	1,3

Вариант 23

Построить график выживаемости аквариумных рыбок гуппи *Lebistes reticulata* (среднее количество животных в 3-х повторностях) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 23.

Таблица А 23 Выживаемость гуппи *Lebistes reticulata* (шт.) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		100	250	500	1000	2000
10	10,0	10,0	10,0	9,2	8,0	7,8
30	10,0	10,0	9,5	8,5	7,5	5,3
60	10,0	10,0	8,3	7,3	6,6	4,5

Вариант 24

Построить график изменения содержания азота нитритного (мг/л) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 (табл. А 24).

Таблица А 24 Динамика азота нитритного в растворах ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
0	0,123	0,113	0,110	0,108	0,089	0,075
2	0,060	0,054	0,050	0,048	0,040	0,028
4	0,330	0,24	0,205	0,125	0,058	0,053

Вариант 25

Построить график изменения численности клеток одноклеточных водорослей – сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (млн./мл) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 (табл. А 25).

Таблица А 25 Изменение численности клеток сценедесмуса – *Scenedesmus quadricauda* (млн./мл) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л			
		0,01	0,1	1,0	10,0
7	0,47	0,45	0,33	0,31	0,19
14	0,31	0,29	0,21	0,20	0,12
21	0,43	0,41	0,21	0,22	0,15
28	1,57	1,10	0,69	0,68	0,45

Вариант 26

Построить график изменения численности инфузорий *Paramecium caudatum* (по отношению к контролю) в растворах бензойной кислоты в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия (табл. А 26).

Таблица А 26 Изменение численности инфузорий *Paramecium caudatum* (шт./мл) в растворах бензойной кислоты

Сутки опыта	Контроль	Концентрация бензойной кислоты, мг/л			
		0,25	2,5	25,0	125,0
1	46	35	31	30	25
2	105	74	65	61	50
4	240	156	139	127	110

Вариант 27

Построить график выживаемости клеток одноклеточных водорослей – сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (%) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2 в зависимости от концентрации вещества (табл. А 27).

Таблица А 27 Выживаемость клеток сценедесмуса *Scenedesmus quadricauda* (%) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-6-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л			
		0,01	0,1	1,0	10,0
7	80,8	77,9	76,3	72,1	32,2
14	82,3	78,1	70,3	62,7	30,3
21	81,4	73,2	68,5	59,4	25,6
28	83,2	63,2	60,7	58,5	12,2

Вариант 28

Построить график изменения содержания кислорода (мг/л) в растворах ингибитора коррозии ИКБ-2-2 в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 28.

Таблица А 28 Изменение содержания кислорода в воде под влиянием ингибитора ИКБ-2-2

Сутки опыта	Контроль	Концентрация ингибитора, мг/л				
		0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
0	14,3	11,8	11,10	9,72	9,40	9,67
3	14,1	9,31	9,24	9,05	9,05	9,00
5	10,2	6,10	5,96	5,78	5,32	4,54
10	9,48	5,31	5,12	4,93	4,27	4,08

Вариант 29

Построить график изменения численности инфузорий *Paramecium caudatum* (по отношению к контролю) в растворах толуиловой кислоты в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия (табл. А 29).

Таблица А 29 Изменение численности инфузорий *Paramecium caudatum* (шт./мл) в растворах толуиловой кислоты

Сутки опыта	Контроль	Концентрация толуиловой кислоты, мг/л			
		250	500	1000	1500
0	10	10	10	10	10
1	25	24	22	12	9
4	421	316	285	102	80

Вариант 30

Построить график изменения численности инфузорий *Paramecium caudatum* (по отношению к контролю) в растворах диоксалаана в зависимости от концентрации вещества и срока воздействия по данным таблицы А 30.

Таблица А 30 Изменение численности инфузорий *Paramecium caudatum* (шт./мл) в растворах диоксалаана

Сутки опыта	Контроль	Концентрация диоксалаана, мг/л			
		10,0	100,0	1000,0	2000,0
1	53	53	42	34	26
2	110	106	83	61	50
4	255	230	186	126	70

ИЗУЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ВОДЫ РЕКИ ТУРЫ

КАРТОЧКА № 1

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: правый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Pisidium amnicum</i>	10	
	<i>Revicoliana n. det</i>	3	
	<i>Amesoda draparnaldi</i>	5	
	<i>Euglesa n. det</i>	3	
Мокрецы	<i>Mallochohelea inermis</i>	2	
	<i>Mallochohelea munda</i>	1	
Хирономиды	<i>Chironomus plumosus</i>	23	
	<i>Procladius ferrugineus</i>	5	
	<i>Procladius choreus</i>	3	
	<i>Cladotanytarsus n. det</i>	2	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	2	

КАРТОЧКА № 2

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: русло

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Amesoda draparnaldi</i>	1	
Пиявки	<i>Glossiphonia complanata</i>	1	
	<i>Limnochironomus nervosus</i>	1	
	<i>Polypedilum tetracrenatum</i>	3	
	<i>Cladotanytarsus n. det.</i>	1	
Олигохеты	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	11	
	<i>Limnodrilus helveticus</i>	3	
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	14	
	<i>Tubificidae sp.</i>	1	
	<i>Aulodrilus limnobius</i>	1	

КАРТОЧКА № 3

Водоем: р. Тура, с. Покровка

Биотоп: левый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Amesoda draparnaldi</i>	3	
	<i>Revicoliana n. det</i>	3	
Ручейники	<i>Hydropsyche ornatula</i>	14	
	<i>Neureclipsis bimaculata</i>	9	
Хирономиды	<i>Glyptotendipes glaucus</i>	2	
	<i>Limnochironomus tritonus</i>	1	
	<i>Chironomus plumosus</i>	5	
	<i>Cladotanytarsus n. det</i>	2	
	<i>Limnochironomus nervosus</i>	16	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	2	
	<i>Orthocladius sp.</i>	28	
	<i>Cladotanytarsus n. det</i>	3	
	<i>Polypedilum scalacnum</i>	1	
	Мошки	<i>Simulium sp.</i>	4
<i>Schoenbaueria nigra</i>		1	

КАРТОЧКА № 4

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: русло

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Amesoda draparnaldi</i>	1	
Пиявки	<i>Glossiphonia complanata</i>	1	
Хирономиды	<i>Chironomus heterodontatus</i>	2	
	<i>Polypedilum tetracrenatum</i>	3	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	29	
	<i>Limnodrilus helveticus</i>	3	
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	14	
	<i>Tubificidae sp.</i>	1	
	<i>Aulodrilus limnobius</i>	1	

КАРТОЧКА № 5

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: правый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Lumnaea fragilis</i>	2	
	<i>Pisidium amnicum</i>	10	
	<i>Revicoliana n. det</i>	3	
	<i>Amesoda draparnaldi</i>	5	
	<i>Euglesa sp.</i>	3	
Мокрецы	<i>Mallochohelea inermis</i>	2	
	<i>Mallochohelea munda</i>	1	
	<i>Probezzia seminigra</i>	1	
Хирономиды	<i>Chironomus plumosus</i>	23	
	<i>Stempellinella sp.</i>	1	
	<i>Procladius ferrugineus</i>	5	
	<i>Procladius choreus</i>	3	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	2	

КАРТОЧКА № 6

Водоем: р. Тура, с. Покровка

Биотоп: правый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Мокрецы	<i>Mallochohelea munda</i>	1	
	<i>Probezzia seminigra</i>	2	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	3	
Хирономиды	<i>Polypedilum scalaenum</i>	5	
	<i>Cricotopus algarum</i>	2	
	<i>Limnodrilus sp.</i>	75	
Олигохеты	<i>Limnodrilus helveticus</i>	1	
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	2	
	<i>Tubificidae sp.</i>	1	

КАРТОЧКА № 7

Водоем: р. Тура, с. Покровка

Биотоп: левый берег

Орудие лова: $V = 1/13,3$

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Amesoda draparnaldi</i>	3	
	<i>Lumnaea lagotis</i>	3	
	<i>Revioliana n. det</i>	3	
Ручейники	<i>Hydropsyche ornatula</i>	14	
	<i>Neureclipsis bimaculata</i>	9	
	<i>Hydropsyche angustipennis</i>	4	
Хирономиды	<i>Clyptotendipes glaucus</i>	2	
	<i>Limnochironomus tritonus</i>	1	
	<i>Chironomus plumosus</i>	5	
	<i>Cladotanytarsus n. det</i>	2	
	<i>Limnochironomus nervosus</i>	16	
	<i>Endochironomus tendens</i>	19	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	2	
	<i>Orthocladius sp.</i>	28	
	<i>Paratanytarsus confusus</i>	3	
	<i>Polypedilum scalacnum</i>	1	

КАРТОЧКА № 8

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: левый берег

Орудие лова: $V = 1/13,3$

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Хирономиды	<i>Procladius ferrugineus</i>	16	
	<i>Chironomus heterodentatus</i>	1	
	<i>Polypedilum scalaenum</i>	1	
	<i>Cricotopus algarum</i>	1	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	9	
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	12	
	<i>Limnodrilus claparedeanus</i>	1	
	<i>Tubificidae sp.</i>	1	

КАРТОЧКА № 9

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: левый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Хирономиды	<i>Procladius ferrugineus</i>	16	
	<i>Chironomus heterodentatus</i>	1	
	<i>Polypedilum scalaenum</i>	1	
	<i>Tanypus sp.</i>	1	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	9	
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	12	
	<i>Limnodrilus claparedeanus</i>	1	

КАРТОЧКА № 10

Водоем: р. Тура, с. Залымка

Биотоп: левый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Хирономиды	<i>Procladius ferrugineus</i>	16	
	<i>Chironomus heterodentatus</i>	1	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	1	
	<i>Tanypus sp.</i>	1	
	<i>Polypedilum scalaenum</i>	1	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	9	
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	12	
	<i>Limnodrilus claparedeanus</i>	1	

КАРТОЧКА № 11

Водоем: р. Тура, с. Покровка

Биотоп: правый берег

Орудие лова: $V = 1/13,3$

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Мокрецы	<i>Mallochohelea munda</i>	1	
	<i>Probezzia seminigra</i>	2	
Хирономиды	<i>Cryptochironomus defectus</i>	3	
	<i>Polypedilum scalaenum</i>	5	
	<i>Lipinilla arenicola</i>	2	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	75	
	<i>Limnodrilus helveticus</i>	1	
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	2	
	<i>Tubificidae sp.</i>	1	
	<i>Limnodrilus claparedeanus</i>	3	

КАРТОЧКА № 12

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: русло

Орудие лова: $V = 1/13,3$

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Мошки	<i>Schoenbaueria nigra pup.</i>	1	
Хирономиды	<i>Polypedilum scalatnum</i>	10	
	<i>Limnochironomus nervosus</i>	1	
Олигохеты	<i>Limnodrilus sp.</i>	101	
	<i>Limnodrilus helveticus</i>	7	
	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	19	
	<i>Limnodrilus claparedeanus</i>	2	
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	1	

КАРТОЧКА № 13**Водоем:** р. Тура, с. Залымка**Биотоп:** русло**Орудие лова:** V = 1/13,3**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ**

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Amesoda draparnaldi</i>	1	
Пиявки	<i>Glossiphonia complanata</i>	1	
Хирономиды	<i>Lipinilla arenicola</i>	1	
	<i>Limnochironomus nervosus</i>	1	
	<i>Chironomus heterodentatus</i>	2	
	<i>Polypedilum tetracrenatum</i>	3	
	<i>Cladotanytarsus sp.</i>	1	
Олигохеты	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	11	
	<i>Limnodrilus sp.</i>	29	
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	14	
	<i>Tubificidae sp.</i>	3	
	<i>Aulodrilus limnobius</i>	1	

КАРТОЧКА № 14**Водоем:** р. Тура, ниже г. Тюмени**Биотоп:** левый берег**Орудие лова:** V = 1/ 20**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ**

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Pisidium amnicum</i>	2	
Ручейники	<i>Hydropsyche ornatula</i>	1	
Хирономиды	<i>Cricotopus algarum</i>	1	
	<i>Cladotanytarsus n. det</i>	3	
	<i>Procladius choreus</i>	2	
	<i>Procladius ferrugineus</i>	8	
Олигохеты	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	1	
Мокрецы	<i>Probezzia seminigra</i>	1	

КАРТОЧКА № 15

Водоем: р. Тура, ниже г. Тюмени

Биотоп: правый берег

Орудие лова: V = 1/ 20

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Моллюски	<i>Revicoliana n. det</i>	1	
	<i>Lymnaea truncatula</i>	1	
Хирономиды	<i>Lymnochironomus tritonus</i>	1	
	<i>Cladotanytarsus n. det</i>	2	
	<i>Polypedilum scalaenum</i>	4	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	3	
	<i>Pentapedilum exectum</i>	1	
Олигохеты	<i>Limnodrilus helveticus</i>	1	
Нематоды	<i>Mermis n. det</i>	1	
Мокрецы	<i>Mallochochelea inermis</i>	1	
	<i>Probezzia seminigra</i>	1	

КАРТОЧКА № 16

Водоем: р. Тура, с. Покровка

Биотоп: правый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Олигохеты	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	8	
	<i>Tubifex tubifex</i>	2	
	<i>Limnodrilus claparedeanus</i>	2	
	<i>Limnodrilus sp.</i>	15	
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	1	
Хирономиды	<i>Procladius choreus</i>	2	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	1	

КАРТОЧКА № 17

Водоем: р. Тура, с. Покровка

Биотоп: правый берег

Орудие лова: V = 1/13,3

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Олигохеты	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	2	
	<i>Limnodrilus sp.</i>	75	
	<i>Limnodrilus helveticus</i>	1	
	<i>Tubificidae sp.</i>	1	
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	1	
Хирономиды	<i>Polypedilum scalatnum</i>	5	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	3	
	<i>Lipinilla arenicola</i>	2	
	<i>Cryptochironomus rolli</i>	1	
Мокрецы	<i>Mallochohelea munda</i>	1	
	<i>Probezzia seminigra</i>	2	
	<i>Sphaeromias fasciatus</i>	1	

КАРТОЧКА № 18

Водоем: р. Тура, с. Покровка

Биотоп: правый берег

Орудие лова: $V = 1/13,3$

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЫ

Синтетические группы	Название рода, вида	Численность	
		экз.	экз./м ²
Олигохеты	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	8	
	<i>Fridericia n. det</i>	2	
	<i>Limnodrilus helveticus</i>	2	
	<i>Limnodrilus sp.</i>	15	
	<i>Limnodrilus udekemian us</i>	1	
	<i>Tubificidae sp.</i>	2	
Хирономиды	<i>Polypedilum scalacnum</i>	4	
	<i>Cryptochironomus rolli</i>	2	
	<i>Cryptochironomus defectus</i>	1	
Нематоды	<i>Dorylaimus sp.</i>	1	
Остракоды	<i>Ostracoda sp.</i>	1	