

**ФИТОПЛАНКТОН** – микроскопические водоросли, обитающие в толще вод.

**ЭВТРОФИРОВАНИЕ** – повышение биологической продуктивности водоемов в результате накопления в них биогенных элементов или других питательных веществ, поступающих в результате человеческой деятельности.

## ДВА МЕТОДА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД

Н. М. Калинин

В настоящей статье предлагаются два метода биотестирования, позволяющие определять токсичность сред графическим и табличным способом. Широко распространенный графический способ дает возможность получить лишь приблизительное значение величины среднесмертельного разбавления ( $CP_{50}$ ), характеризующее токсичность исследуемой среды. Табличный способ, основанный на табличном методе В. Б. Прозоровского, дает не только величину  $CP_{50}$ , но и ее статистическую ошибку, что позволяет оценить точность получаемого параметра.

При проведении токсикологических экспериментов необходимо ставить контрольный вариант: в воду без добавки токсиканта помещают такое же количество подопытных организмов, как и в пробы с разбавлениями сточных вод. Опыт продолжительностью 24–48 часов считается поставленным успешно, если в контроле не наблюдали гибели животных. Объем контрольной воды должен быть равен объему раствора токсиканта. В качестве контрольной разбавляющей воды обычно используется водопроводная вода, которую выдерживают при комнатной температуре в течение 3–4 суток. Перед использованием в опыте воду процеживают через фильтровальную бумагу или обычный тюль, сложенный в несколько раз. Во время опыта необходимо регистрировать температуру воды.

**Графический способ определения  $CP_{50}$ .** В данной статье приводится описание графического способа определения среднесмертельного разбавления сточных вод согласно Методическому руководству по биотестированию воды (1990). В опытах используются ветвистоусые рачки (дафнии) – *Daphnia magna* Straus. Схема опыта по биотестированию изображена на рисунке. Пробы с пятью разбавлениями сточной воды готовят согласно схеме (табл. 1). Число повторностей в опыте должно быть не менее трех. С учетом контрольного ва-

рианта всего в опыте будет использовано 18 сосудов. Объем тестируемой среды в каждом сосуде составляет 100 мл. В каждую емкость помещают по 10 экземпляров рачков. Общее количество рачков, используемых в опыте, – 180 экземпляров.

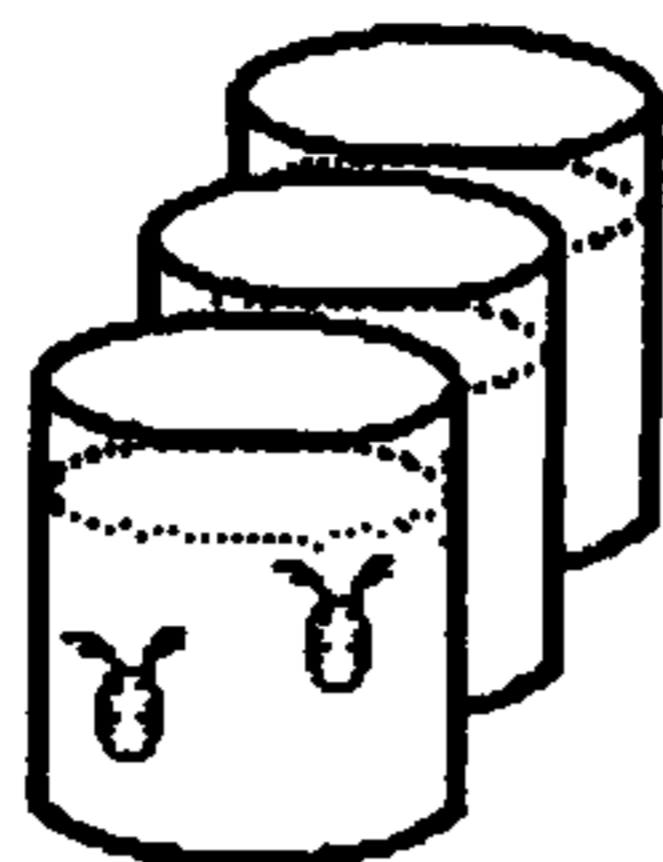
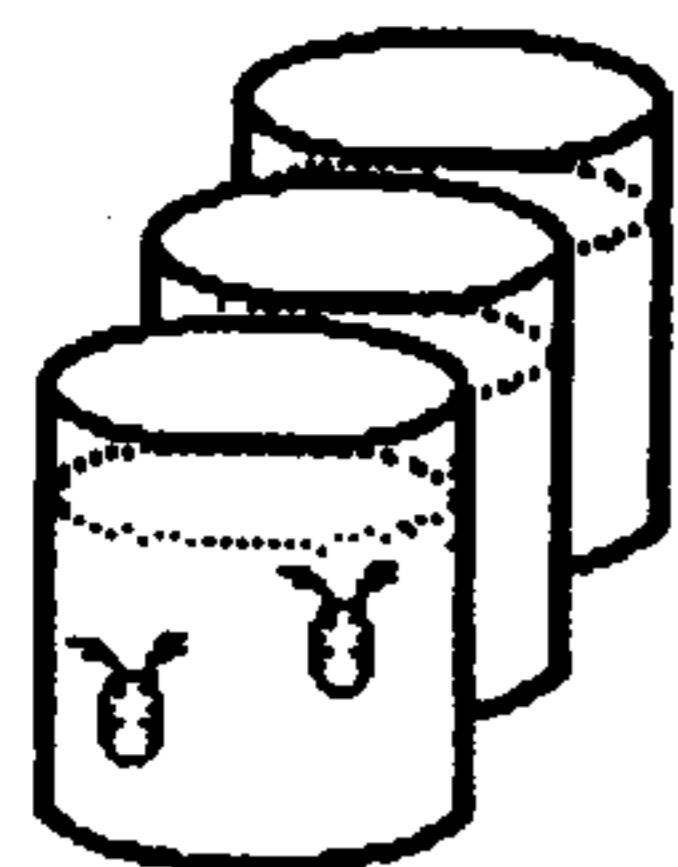
Таблица 1  
СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОПЫТНЫХ СРЕД  
ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА

Кратность разбавления	Количество сточной воды, мл	Количество разбавителя, мл
Контроль	0	100
2-кратное	50	50
5-кратное	20	80
10-кратное	10	90
20-кратное	5	95
50-кратное	2	98

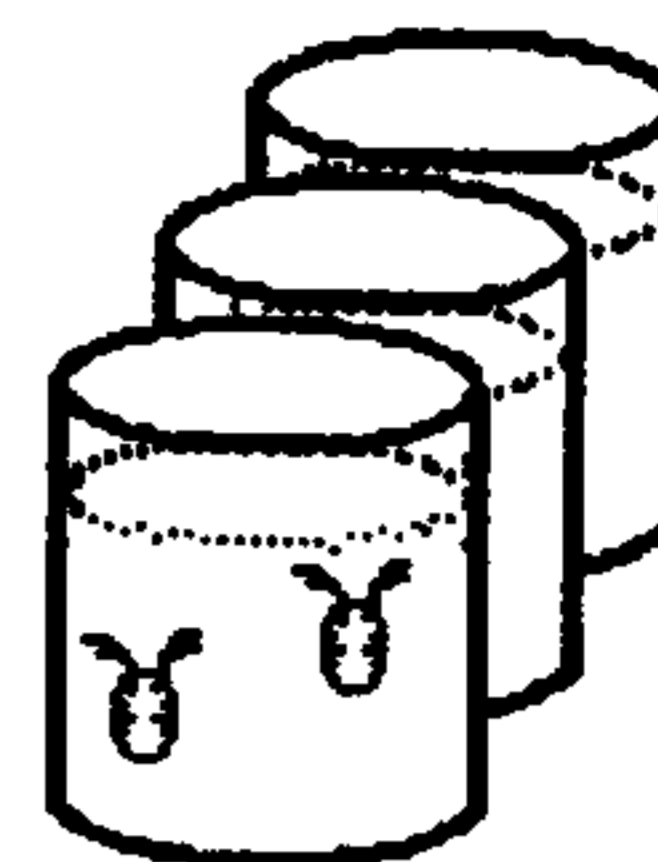
Дафний помещают в растворы с помощью стеклянных трубочек. Во время опытов рачков не кормят. Через 1 час, 2, 4, 10 и 24 часа определяют количество **выживших** рачков в каждом сосуде. Результаты наблюдений заносят в табл. 2. Определяют среднюю арифметическую величину выживаемости дафний в процентах к контролю.

Определение среднесмертельного разбавления сточной воды графическим методом показано на рисунке. На оси абсцисс откладывают логарифмы величин кратности разбавлений тестируемой воды, а на оси ординат – среднюю арифметическую величину выживаемости дафний в процентах к контролю. Через полученные точки «на глаз» проводят прямую так, чтобы расстояние от этих точек до прямой было минимальным. От точки на оси ординат, соответствующей 50% выживаемости, проводят линию, параллельную оси абсцисс. Из точки пересечения этой линии с экспериментальной прямой опускают перпендикуляр на ось абсцисс и находят величину логарифма кратности разбавления, вызывающего гибель 50% животных. По величине логарифма определяют величину среднесмертельного разбавления ( $CP_{50}$ ). Чем больше эта величина, тем токсичнее тестируемая вода.

**Табличный способ определения  $CP_{50}$**  основан на методах В. Б. Прозоровского,



.....

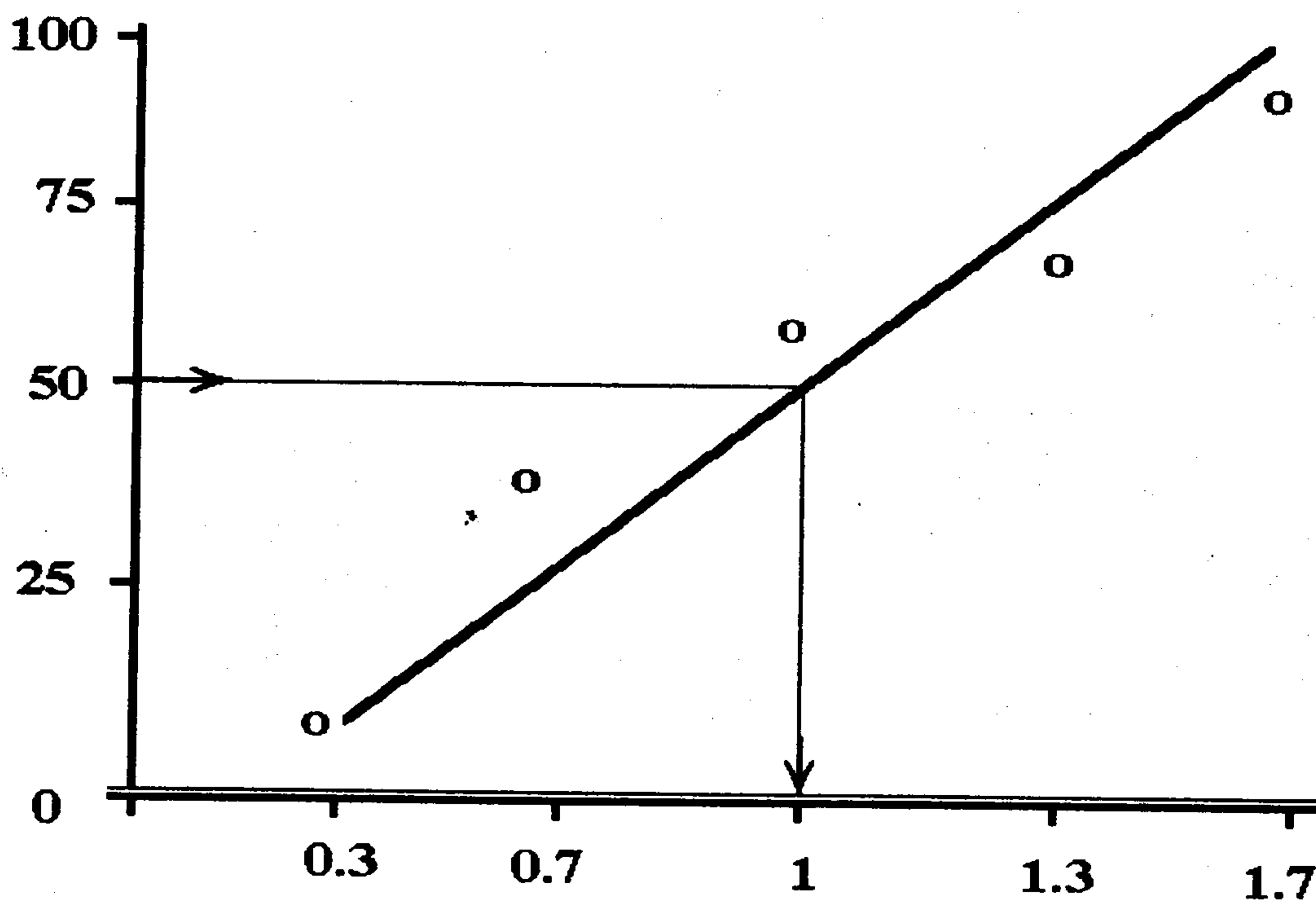


Контроль

Двукратное  
разбавление

Пятидесятикратное  
разбавление

Выживаемость, %



$\lg (CP50) = 1$      $CP50 = 10$

Логарифм  
кратности  
разбавления

СХЕМА БИОТЕСТИРОВАНИЯ СТОЧНЫХ ВОД



Таблица 2

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ ДАФНИЙ В КОНТРОЛЕ И В ПРОБАХ С РАЗЛИЧНЫМИ РАЗБАВЛЕНИЯМИ СТОЧНОЙ ВОДЫ**

Температура	Дата, место отбора пробы	Продолжительность опыта, час	Повторность	Количество выживших дафний в контроле и в пробах с различными разбавлениями сточной воды, экз.					
				Контроль	2-кратное	5-кратное	10-кратное	20-кратное	50-кратное
22°	12.11.98 Комбинат	24	1	10	3	5	5	5	8
		24	2	10	0	3	7	6	10
		24	3	10	2	4	5	8	9
			Средн. арифм., % к контролю		16	40	56	63	90

Е. А. Зоммер и разработках автора данной статьи. Метод требует небольшого числа испытуемых животных в каждом сосуде – по два рачка. Это позволяет и в обычной микробиологической пробирке объемом не менее 10 мл создавать для них нормальные условия обитания. Для опыта необходимо приготовить 11 разбавлений сточной воды согласно схеме, представленной в табл. 3. Объем тестируемой среды составляет 10 мл. Опыт проводится в двух повторностях. С учетом контрольного варианта всего в опыте используются 24 пробирки. Общее количество рачков, используемых в опыте, – 48 экземпляров.

Таблица 3

**СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ОПЫТНЫХ СРЕД ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТАБЛИЧНОГО МЕТОДА**

№ пробирки	Количество сточной воды, мл	Количество разбавителя, мл
Контроль	0	10,0
1	1,00	9,00
2	1,26	8,74
3	1,58	8,42
4	2,00	8,00
5	2,50	7,50
6	3,16	6,84
7	3,98	6,02
8	5,01	4,99
9	6,31	3,69
10	7,94	2,06
11	10,0	0

Поскольку в данном эксперименте используются небольшие объемы растворов (10 мл), очень важно точно выдерживать концентрацию раствора. Поэтому при посадке рачков в растворы применяют следующий прием. 24 пробирки используют для приготовления растворов, в другие 24 пробирки рассаживают по 2 экземпляра рачков. С помощью капилляра из пробирок с дафниями

удаляются излишки воды так, чтобы не повредить животных. Растворы последовательно заливают в пробирки, где находятся подопытные животные. Во время опытов рачков не кормят.

Через 1 час, 2, 4, 10 и 24 часа определяют количество погибших рачков в каждом сосуде. Результаты наблюдений заносят в табл. 4.

Для определения среднесмертельного разбавления результаты опытов (из табл. 4) нужно сопоставить с содержанием табл. 5. Всего возможно 7 исходов экспериментов, каждому из которых соответствует строка в табл. 5. В первом столбце приведены результаты опытов, а в одном из последующих – искомое значение среднесмертельного разбавления.

Обычно это значение определяется следующим образом. Сначала в табл. 4 найдем номер опыта, в котором погибло хотя бы одно животное (пробирка 7). Отступим влево на один опыт (опорная пробирка 6) и будем считать результатом нашего эксперимента четыре цифры: число погибших животных в этой пробирке и в трех последующих. В нашем случае это будут числа 0, 1, 1, 2. Теперь по табл. 5 найдем строку с таким же результатом эксперимента (у нас – строка 3). Искомое значение среднесмертельного разбавления будет находиться в этой строке в графе с номером опорной пробирки (т. е. в графе 6). Это и будет окончательная характеристика токсичности сточных вод с учетом статистической ошибки: в нашем случае 447 мл/л (-70; +80).

В более сложных случаях выбор опорной пробирки может быть другим. Все эти случаи отображены в первом столбце табл. 5. Этот точный метод широко используется в водной токсикологии, но в то же время является достаточно простым для эффективного внедрения в процесс школьного экологического образования.



Таблица 4  
КОЛИЧЕСТВО ПОГИБШИХ РАЧКОВ В КОНТРОЛЕ И В ПРОБАХ С РАЗЛИЧНЫМИ РАЗБАВЛЕНИЯМИ  
СТОЧНОЙ ВОДЫ

Темпе- ратура	Дата, место отбора пробы	Продол- жительность опыта, час	Повтор- ность	Контроль	Номер пробирки											
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
22°	15.11.98 Комбинат	24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2
			2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2	

Примечание. 0 – нет гибели; 1 – одно животное погибло; 2 – два животных погибло.

Таблица 5  
СРЕДНЕСМЕРТЕЛЬНОЕ РАЗБАВЛЕНИЕ ( $CP_{50}$ ) И ЕГО ОШИБКА (m)

После- дователь- ность реакций		Номер пробирки									10
		1.0	1.26	1.58	2.0	2.5	3.16	4.0	5.0	6.3	
0, 1, 2, 1	$CP_{50}$	146	184	231	290	368	460	580	730	920	1160
	-m	40	30	63	80	100	125	160	200	250	320
	+m	54	68	87	100	135	175	220	275	350	440
0, 0, 2, 2	$CP_{50}$	141	178	224	282	355	447	564	708	890	1120
	-m	20	23	28	35	44	58	70	87	110	140
	+m	25	30	35	40	50	65	80	100	130	150
0, 1, 1, 2	$CP_{50}$	141	178	224	282	355	447	564	708	890	1120
	-m	25	28	40	50	63	70	90	120	150	200
	+m	28	33	44	55	65	80	100	132	172	220
1, 0, 1, 2	$CP_{50}$	137	172	218	274	346	435	547	690	870	1090
	-m	37	46	58	74	93	118	147	186	235	290
	+m	52	65	82	104	131	165	206	261	329	410
0, 2, 1, 2	$CP_{50}$	129	163	205	258	325	410	515	650	815	1030
	-m	24	30	38	48	61	76	95	120	150	190
	+m	29	37	64	58	73	92	115	146	183	231
1, 0, 2, 2	$CP_{50}$	120	150	190	239	300	379	477	600	755	950
	-m	24	30	38	48	60	76	96	120	152	190
	+m	31	39	49	59	77	98	123	154	194	245
0, 1, 2, 2	$CP_{50}$	129	163	205	258	325	410	515	650	815	1030
	-m	18	22	28	35	44	56	70	89	111	141
	+m	20	24	30	38	48	61	77	98	121	153

Правила безопасности: соблюдать правила безопасности работы с химическими реактивами. В экспериментах по биотестированию не

использовать хозяйственно-бытовые сточные воды в связи с возможностью их зараженности патогенными микроорганизмами.

#### РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

**Зоммер Е. А.** Токсикология поллютантов // Экологические исследования Байкала и Байкальского региона. Иркутск, 1992. Ч. 2. С. 66–71.

**Калинкина Н. М.** Эколого-токсикологическая оценка опасности сульфатного лигнина для гидробионтов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1993. 25 с.

**Калинкина Н. М., Коросов А. В.** Исследование химической толерантности гидробионтов в полевых

условиях методами водной токсикологии // Контроль состояния и регуляция функций биосистем. Петрозаводск, 1995. С. 93–97.

**Методическое руководство** по биотестированию воды. РД 118-02-90. М., 1990.

**Прозоровский В. Б., Прозоровская М. П.** Табличный метод определения  $ED_{50}$  ( $LD_{50}$ ) веществ с низкой биологической активностью // Фармакология и токсикология. 1980. № 6. С. 733–735.

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ** – количество организмов, выживших к концу эксперимента, выраженное в процентах от исходного количества или в процентах от числа животных в контрольном опыте.

**КОНТРОЛЬ (КОНТРОЛЬНЫЙ ВАРИАНТ)** – содержание подопытных животных в средах без добавки токсикантов при одновременном проведении наблюдений за состоянием животных в средах, содержащих вредные вещества. Контроль служит показателем жизнеспособности культуры подопытных организмов и индикатором возможного влияния на результаты опытов неучтенных факторов.

**СРЕДНЕСМЕРТЕЛЬНОЕ РАЗБАВЛЕНИЕ (КОНЦЕНТРАЦИЯ)** – расчетный показатель; разбавление сточных вод или концентрация какого-либо вещества, вызывающие гибель 50% организмов за определенный срок.

**ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ** – опыты, в которых исследуется ядовитое действие веществ на организм.

## ТЕМЫ ДЛЯ ФАКУЛЬТАТИВНЫХ ЗАНЯТИЙ

1. Сравнительная оценка токсичности проб воды р. Лососинки, отобранных выше выпуска сточных вод ОТЗ и ниже по течению.
2. Токсикологическая оценка воды р. Неглинки.
3. Токсикологическая оценка воды, отобранной из прибрежных участков Петрозаводской губы Онежского озера.
4. Оценка токсичности сточных вод Кондопожского ЦБК для дафний.



## ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ УЧАСТКА ВОДОЕМА ДЛЯ РЕКРЕАЦИИ

Н. М. Калинкина

Одной из целей экологического похода школьников 6–11 классов может быть оценка пригодности участка водоема для рекреации. Маршрут похода должен проходить вблизи водоема (озеро, река) и включать участки, в разной степени освоенные человеком. В походе школьники учатся наблюдать за состоянием природной среды, оценивать степень нарушенности береговой зоны, ее захламленность, определять качество воды по ее прозрачности, цвету и запаху.

Для оценки состояния прибрежного участка водоема были выделены четыре основных показателя: интенсивность застройки (табл. 1), трансформация экосистемы (табл. 2), захламленность (табл. 3), качество воды (табл. 4). Для показателей разработаны таблицы градаций с учетом уже имеющихся в литературе классификаций состояния водоемов.

Таблица 1  
ЗАСТРОЙКА

Гражданская	Промыш- ленная	Сельскохо- зяйственная	Балл
Нет	Нет	Нет	1
Дачи, деревни	Нет	Огороды	3
Дачные поселки, села	Малые МТС	Фермы, пашни, пастбища	7
Поселки, города	Заводы, нефтебазы	Фермы, склады	15

Таблица 2  
ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭКОСИСТЕМЫ

Нарушение экосистемы			Балл
Почвы	Напочвенный покров	Древо- стой	
Не нарушены	Нет (истоптанность – 0%)	Не нарушен	1
Не нарушены	Тропы (истоптанность – 10%)	Заломы, зарубки	3
Пашни, огороды	Сеть троп (истоптанность – 30%)	Локальные рубки	7
Канавы, карьеры	Сеть троп (истоптанность > 50%)	Вырубки	12