

Федеральная служба по экологическому,
технологическому и атомному надзору
ФГУ «Государственный научно-исследовательский институт
промышленной экологии»

УДК 623.459; 504.054; 661.718

Н.И. Хотько А.П.Дмитриев

**БИОМОНИТОРИНГ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В РАЙОНАХ
РАЗМЕЩЕНИЯ ОПАСНЫХ ПРОМЫШЛЕННЫХ
ОБЪЕКТОВ**

ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Саратов 2015

УДК 623.459; 504.054; 661.718

ББК 28.088я73

Б63

«Биомониторинг окружающей среды в районах размещения опасных промышленных объектов. Теория и практика» Н.И. Хотько. Россия, Саратов, ГосНИИЭНП, 2015,- 184с ,

Рецензенты:

Ледванов М.Ю. - доктор медицинских наук, профессор президент РАЕ

Елисеев Ю. Ю. - доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕ

ЗЗМ	- зона защитных мероприятий
КПП	- контрольные пробные площадки
ОВ	- отравляющие вещества
ОС	- окружающая среда
ОУХО	- объект уничтожения химического оружия
ПДК	- предельно допустимые концентрации
ППП	- постоянные пробные площадки
ППП	- постоянная пробная площадка
СГЭКиМ	- система государственного экологического контроля и мониторинга
СЗЗ	- санитарно-защитная зона
ФМС	- фототрофные микробные сообщества
ЦБ	- цианобактерии
ЭТА	- экотоксикологический анализ

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. БИОМОНИТОРИНГ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ, БИОИНДИКАЦИЯ	8
1.1. <i>Из истории развития биологического мониторинга.....</i>	8
1.2. <i>Обоснование принципов биологического мониторинга.....</i>	10
1.3. <i>Биомониторинг в системе экологического мониторинга.....</i>	12
1.4. <i>Общие положения.....</i>	15
1.5. <i>Основные виды индикаторных сообществ, используемых в качестве биоиндикаторов.....</i>	22
Литература.....	28
Глава 2. МЕТОДЫ КОМПЛЕКСНОЙ БИОИНДИКАЦИИ.....	29
2.1. <i>Оценка биоразнообразия фитоценозов и жизненного состояния деревьев.....</i>	29
2.2. <i>Определение содержания пигментов у высших растений.....</i>	39
2.3. <i>Палинологические методы индикации: определение доли абортивных пыльцевых зерен и жизнеспособности пыльцы.....</i>	42
2.4. <i>Использование индикаторных видов мелких грызунов.....</i>	52
Литература.....	55
Глава 3. БИОТЕСТИРОВАНИЕ И БИОИНДИКАЦИЯ КАЧЕСТВА ПРИРОДНЫХ СРЕД.....	57
3.1. <i>Биотестирование и биоиндикация водной среды.....</i>	57
3.2. <i>Биотестирование и биоиндикация загрязнений почв.....</i>	78
3.3. <i>Биотестирование и биоиндикация загрязнений атмосферного воздуха.....</i>	87
3.4. <i>Перспективные методы оценки генотоксичности природных сред в зоне влияния промышленных предприятий.....</i>	90
Литература.....	101
Глава 4. ПРИМЕНЕНИЕ В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ.....	116
4.1. <i>Клеточные культуры в системе биотестирования качества</i>	

природных сред.....	116
4.2. Оборудование для работы с культурами клеток.....	120
Литература.....	125
Глава 5. СИСТЕМА ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЗОНЫ ВЛИЯНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОБЪЕКТОВ.....	127
Литература.....	132
Глава 6. БИОМОНИТОРИНГ ЗОНЫ ВЛИЯНИЯ ОПАСНЫХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ.....	134
6.1. Оценка качества воды водоема-охладителя Балаковской атомной электростанции методами биомониторинга.....	134
Литература.....	144
6.2. Оценка генотоксичности природных сред в санитарно-защитной зоне и зоне защитных мероприятий завода по уничтожению химического оружия в п. Горный Саратовской области с помощью микроядрышкового теста.....	145
Литература.....	150
Глава 7. БИОТЕСТИРОВАНИЕ ОТХОДОВ ОБЪЕКТОВ ПО УНИЧТОЖЕНИЮ ХИМИЧЕСКОГО ОРУЖИЯ.....	151
7.1. Токсикологическая оценка реакционной массы, образующейся при детоксикации люизита.....	151
Выводы.....	155
Литература.....	159
7.2. Биотестирование арсенита натрия.....	160
Литература.....	166
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	168
ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ.....	170
ВВЕДЕНИЕ	

В различных видах научной и практической деятельности человека для изучения свойств, предметов и явлений издавна применяется метод наблюдения, как способ познания, основанный на относительно длитель-

ном целенаправленном и планомерном восприятии предметов и явлений окружающей действительности.

В последние десятилетия общество все шире использует в своей деятельности сведения о состоянии окружающей среды. Эта информация нужна в повседневной жизни людей, при ведении хозяйства, в строительстве, при чрезвычайных обстоятельствах — для оповещения о надвигающихся опасных явлениях природы.

Изменения в состоянии окружающей среды происходят не только в ходе естественных биосферных процессов, но под воздействием процессов, связанных с деятельностью человека.

Одним из неперенных условий «устойчивого» социально-экономического развития современного общества являются сохранение окружающей среды, как благоприятной среды обитания человека, а в некоторых случаях и ее восстановление.

Понятие «экологическое качество среды» предполагает сохранение относительной устойчивости видового состава экосистем и качественного состава компонентов окружающей среды, которые обеспечат здоровье человека.

Экологическую опасность, или риск, следует оценивать с учетом не только характера и силы антропогенного воздействия, но и биологических свойств реагирующей системы.

Определение вклада антропогенных изменений представляет собой решение специфической задачи, которая определяется как экологический мониторинг.

Экологический мониторинг - информационная система наблюдений, оценки и прогноза изменений в состоянии окружающей среды, созданная с целью выделения антропогенной составляющей этих изменений на фоне природных процессов [1].

Экологический мониторинг в РФ - это комплекс научно обоснованных программ наблюдений, оценок, прогнозов и разрабатываемых на их основе рекомендаций и вариантов управленческих решений, необходимых и достаточных для обеспечения управления состоянием окружающей среды и экологической безопасностью. В соответствии с приведенным определением и возложенными на систему функциями мониторинг включает три основных направления деятельности:

- наблюдения за факторами воздействия и состоянием среды;
- оценку фактического состояния среды;
- прогноз состояния окружающей среды и оценку прогнозируемого состояния.

Экологический мониторинг представляет две группы методов, дополняющих друг друга: физико-химические (химико-аналитические) и биологические (биомониторинг).

Каждый из видов мониторинга имеет свои ограничения. Для качественной оценки и прогноза состояния природной среды необходимо их сочетание. Таким образом, физико-химический и биологический мониторинг не исключают, а дополняют друг друга.

Сама система мониторинга не включает деятельность по управлению качеством среды, но является источником информации для принятия экологически значимых решений.

В настоящей монографии рассмотрены теоретические и практические аспекты биомониторинга зоны влияния опасных промышленных предприятий.

Глава 1. БИОМОНИТОРИНГ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ, БИОИНДИКАЦИЯ

1.1. Из истории развития биологического мониторинга

Возможность использовать живые организмы в качестве показателя определенных природных условий писали еще ученые Древнего Рима и

Греции. В трудах М.В.Ломоносова и А.Н.Радищева есть упоминания о растениях указателях особенностей почв, горных пород, подземных вод.

В XIX веке выдающиеся российские геологи, А.М. Карпинский и П.А.Осоков писали о возможности растительной биоиндикации, и использовали характер распространения растений для составления геологических карт. Например, почвенные микроорганизмы и индикаторные растения служат при поисках различных полезных ископаемых. Большой вклад в развитие биоиндикации внес русский ученый-почвовед В.В.Докучаев. По комплексам почвенных животных можно определить типы почв и их изменение под влиянием хозяйственной деятельности человека. Проблемам биоиндикации загрязнений окружающей среды были посвящены труды чл.-корр. РАН Д.А. Криволуцкого [2]. Разработкой теории биологического мониторинга занимались профессора МГУ им. М. В. Ломоносова В.Д. Федоров [3] и К.С. Бурдин [4]. Значительный вклад в разработку стратегии биомониторинга зон влияния ОУХО внесли российские ученые Т.Я. Ашихмина и А.И. Иванов [5].

Начало работ по мониторингу было положено также в области санитарно-гигиенического нормирования. Однако человек не самый чувствительный из биологических видов и принцип «Защищен человек - защищены и экосистемы» неверен. Санитарно-гигиеническое нормирование охватывает все среды, различные пути поступления вредных веществ в организм. При этом редко отражает комбинированное действие (одновременное или последовательное действие нескольких веществ при одном и том же пути поступления) и не учитывает эффектов комплексного (поступления вредных веществ различными путями и с различными средами - с воздухом, водой, пищей, через кожные покровы) и сочетанное воздействие всего многообразия физических, химических и биологических факторов.

Живые организмы, в том числе и человек, воспринимают антропогенное воздействие различных комплексов химических и физических фак-

торов и их сочетаний. При изучении кумулятивности множества воздействий отмечаются парадоксальные эффекты сверхмалых доз на организмы животных и растений, наличие цепных процессов и отдаленных единичных влияний на различные сложно организованные экосистемы. Стохастической, трудно предсказуемой, является и реакция организмов людей, живущих в условиях техногенных искусственных экосистем.

Известен парадоксальный эффект многих биологически активных соединений, когда сверхмалые дозы (ниже ПДК) оказывают на организм более сильное действие, чем их средние дозы и концентрации.

Сравнительно недавно в массиве загрязняющих веществ стали выделять понятие «супертоксиканты»- вещества, которые в малых дозах способны оказывать выраженное индуцирующее (усиливающее) или ингибирующее (угнетающее) действие на ферменты. Супертоксиканты характеризуются чрезвычайной стойкостью в окружающей среде и практически отсутствием предела токсичности (сверхкумуляцией). Они присутствуют практически во всех средах, циркулируют в них, и через компоненты окружающей среды проявляют свое действие на живые организмы, вызывая мутагенный, канцерогенный эффект, подавляя клеточный иммунитет, поражая внутренние органы. Для аналитического определения супертоксикантов в природных объектах и биотканях необходимы специальные лаборатории, оборудование и высококвалифицированные специалисты-аналитики.

В последние годы в практику биомониторинга все шире внедряются новые приборные биотесты, позволяющие в короткий интервал времени провести экотоксикологический анализ почвы, воды и воздуха. Особое

внимание уделяется внедрению биотестов для оценки генотоксичности [6,7,8,9]. Разрабатываются биотесты для обнаружения генных и хромосомных мутаций (Mutatox test, GreenScreen EM, метод ДНК-комет и др.).

1.2. Обоснование принципов биологического мониторинга

Антропогенные загрязнения действуют на живые организмы, и в том числе на человека, в самых различных сочетаниях, комплексно. Их интегральное влияние можно оценить только по реакции живых организмов или целых сообществ. Результаты воздействия на человека загрязненного воздуха, воды, многих ксенобиотиков (чуждых для биосферы веществ), накапливающихся в организме, и, вызывающих патологические изменения в результате длительного воздействия даже малых концентраций, являются доказанными, если в оценку токсичности входят не только аналитические, но и биологические методы.

Индификационным или токсикологическим показателем состояния компонентов окружающей среды является реакция организма, обусловленная попаданием его в загрязненную среду. Экстремальные факторы среды могут более или менее сильно влиять на экосистему в зависимости от интенсивности, момента и продолжительности воздействия.

Экологический прогноз определяется способностью природных экосистем и живых организмов к самоочищению, саморегуляции и адаптации. Наиболее устойчивыми являются экосистемы, представленные наибольшим видовым разнообразием, численностью, представительством различных трофических уровней, репродуктивностью, межвидовыми соотношениями и абиотическими факторами.

Реакция на стрессовые состояния может быть выражена как физиологическими, морфологическими, так и генетическими ответными реакциями.

Опасность антропогенных стрессоров состоит в том, что биологические системы — будь то организмы, популяции или биоценозы — недостаточно адаптированы к ним. Антропогенные стрессоры создаются с такой скоростью, что в живых системах часто не успевают активизироваться соответствующие адаптационные процессы.

Многие антропогенные факторы среды потому и становятся опасными стрессорами, что они отличаются по величине, интенсивности, продолжительности и моменту воздействия от той обычно существующей в природе "нормы", к которой адаптированы биологические системы. В результате они часто влияют на диапазон толерантности, что нередко приводит к превышению допустимой нагрузки на организмы и распаду биологической системы. Кроме того, в окружающей среде на организм воздействует не один стрессор, а целый комплекс нарушающих факторов (комплексное воздействие среды). При этом не исключено, что какой-либо отдельный фактор может временно или постоянно доминировать.

Поэтому исследования комбинированного воздействия стрессовых нагрузок, т. е. комплексного воздействия среды, становятся в последнее время принципиально важными для установления допустимой нагрузки и стабильности биологических систем в нарушенной среде со многими антропогенными составляющими.

Оценка степени экологической опасности традиционно осуществляется путем определения в окружающей среде отдельных потенциально вредных веществ или воздействий и сравнения полученных результатов с законодательно установленными для них предельно допустимыми величинами. Такой способ контроля имеет ряд существенных недостатков. Аналитические методы, как правило, трудоемки, достаточно длительны по времени, требуют дорогостоящего, иногда дефицитного оборудования и реактивов, а также высококвалифицированного обслуживающего персонала. Но главный их недостаток в том, что эти методы не могут гарантиро-

вать достоверной оценки экологической опасности, сколь бы широким не был спектр анализируемых веществ. В итоге наблюдений важны не сами уровни загрязнений и воздействий, а те биологические эффекты, которые они могут вызвать и о которых не может дать информацию даже самый точный химический или физический анализ.

Как правило, первоначальный анализ качества природных сред в зоне влияния опасных промышленных предприятий осуществляется методами биотестирования. При обнаружении токсичности проводится детальный химический анализ проб по полному перечню загрязняющих веществ для данного объекта. Методы биотестирования значительно чувствительнее химических методов анализа. Они позволяют оценить синергическое действие и биологические эффекты сверхмалых концентраций загрязняющих веществ. Биотестирование проб проводят на нескольких тест-объектах, относящихся к разным систематическим группам живых организмов. Использование многокомпонентной тест-системы существенно повышает качество проводимых исследований природных сред. Первоочередное использование аттестованных методик биотестирования, допущенных для целей государственного экологического контроля, дает возможность повысить достоверность экотоксикологического анализа. Методы биоиндикации также могут быть использованы, но как дополнительные. При проведении биоиндикации необходимо учитывать ряд биотических, абиотических и антропогенных факторов, влияющих на живые организмы в природных условиях.

1.3. Биомониторинг в системе экологического мониторинга

Экоаналитический мониторинг предполагает динамическое отслеживание концентрации загрязняющего вещества в компоненте природной

среды без анализа его биогенного воздействия. В основе экоаналитического мониторинга лежат три основных определяющих фактора:

- высокая токсичность и опасность веществ (с учетом отдаленных эффектов, специфического действия, кумуляции) для человека и окружающей среды, рассматриваемые на уровне ПДК, ЛД, Ж, ПК, ВДК и т.п.;
- способность выступать в качестве маркера (показателя присутствия отравляющих веществ);
- обязательность для контроля специфичных и общепромышленных загрязнителей.

Но и при наличии постоянного контроля и мониторинга за наличием супертоксиантов химико-аналитическими методами невозможно дать ответ на вопросы о реакции живых организмов на их воздействие.

При долгосрочной оценке воздействия опасных промышленных объектов на окружающую среду или оценке последствий воздействия объектов (в нештатных и аварийных ситуациях) приоритетным направлением комплексного экологического мониторинга является мониторинг состояния природных экосистем, который позволяет выявить процессы их деградации, что не всегда возможно при оценке только химического состава компонентов природной среды. Не менее важным аспектом, имеющим также приоритетное значение для экологии, является проблема, заключающаяся в необходимости контроля отдаленных последствий (аккумуляции и трансформации в компонентах ОС) отравляющих веществ (далее - ОВ) и продуктов их деструкции.

Трансформация ОВ в окружающей среде может привести к образованию более стабильных и трудно идентифицируемых соединений. Малые и сверхмалые дозы этих веществ, безопасные в рамках санитарно-гигиенических нормативов, могут являться значимыми для экосистем. Такие компоненты крайне сложно идентифицировать по стандартным методикам количественного химического анализа, однако их эффекты можно

обнаружить биологическими методами. В этом плане использование биологических методов для оценки и прогноза различных изменений в природном комплексе, вызванных факторами техногенного загрязнения в процессе уничтожения химического оружия, необходимо в целях диагностики и прогнозирования возможного техногенного загрязнения. В настоящее время можно считать общепринятым, что основным индикатором устойчивого развития в конечном итоге является качество среды обитания.

Многолетний опыт по контролю состояния окружающей среды показал преимущества биоиндикаторов. Хронические антропогенные нагрузки вследствие кумулятивного эффекта вызывают реакцию даже на относительно слабые воздействия. Реакции проявляются при накоплении некоторых критических значений суммарных дозовых нагрузок, при этом суммируется влияние всех без исключения биологически важных воздействий и отражается состояние окружающей среды в целом, включая ее загрязнение и другие антропогенные влияния на биоценозы.

Разработанная комплексная система экологического мониторинга предполагает исследование качества компонентов окружающей среды как химико-аналитическими, так биологическими методами (биомониторинг).

Основной задачей биомониторинга является системный анализ природных и антропогенных процессов, протекающих в компонентах природной среды, который рассматривается как непрерывный процесс взаимосвязанных с физическими, физико-химическими и биологическими закономерностями. А поэтому может рассматриваться как единый непрерывный процесс построения информационной модели для получения сведений об изменениях в окружающей среде, связанных с негативным воздействием химических загрязняющих веществ, определенных химико-аналитическим мониторингом.

Система регулярного биомониторинга является неотъемлемой, предшествующей частью общей системы экологического мониторинга со-

стояния компонентов окружающей среды, которая выявляет и подтверждает суммирующее (кумулятивное и синергетическое) негативное влияние загрязняющих веществ на тест-объектах, классы опасности загрязняющих веществ и т.п.

Критерии биомониторинга устанавливаются по критериям, принятым в системе государственного экоаналитического мониторинга, т.е. экспорт и накопление вредных загрязняющих веществ в почве, водных объектах, растениях происходит главным образом за счет их поступления из атмосферы.

1.4. Общие положения

Биологический мониторинг - это система многофакторного анализа, учитывающего влияние наиболее типичных антропогенных воздействий, а также изменений природных факторов среды, уровень которых меняется вследствие антропогенного влияния. Биологический мониторинг включает методы биоиндикации и биотестирования.

Мониторинг окружающей среды методами биоиндикации и биотестирования и характеризует состояние окружающей среды. Биоиндикация используется для качественной и количественной оценки (определения степени загрязнения) антропогенного и естественного влияния на окружающую среду. При этом методами биоиндикации фиксируются скорости происходящих изменений, вскрываются тенденции, указываются пути и места скоплений в экологических системах различного рода загрязнений и отравляющих веществ, а методами биотестирования определяются возможные пути их воздействия на человека, а также степень вредности любых синтезируемых веществ для живой природы и человека.

Биологический мониторинг компонентов ОС в СЗЗ и ЗЗМ проводится на постоянных пробных площадках. Поэтому в отличие от биологического контроля наблюдения начинаются с описания биоты этой площадки, отмечаются внешние проявления изменений, а затем отбираются пробы для оценки и анализа компонентов методами биотестирования. При выявлении токсичности, проба подвергается детальному химическому анализу (рис.1).

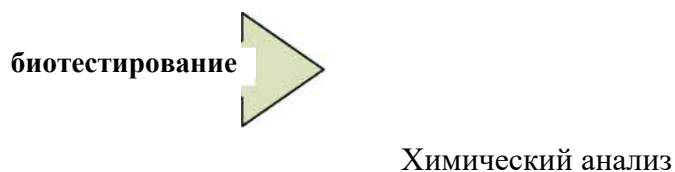


Рис. 1. Порядок проведения исследования биоты СЗЗ и ЗЗМ на ППП

Основопологающим принципом биологического мониторинга является установление оптимального, контрольного уровня, любые отклонения от которого свидетельствуют о негативном воздействии. Обычно при оценке оптимума по какому-либо одному параметру возникает вопрос о том, будут ли данные условия оптимальными также для других характеристик организма или, как связаны показатели асимметрии морфологических признаков, показателей крови, ритмики роста и частоты хромосомных aberrаций.

Объектами мониторинга являются биологические системы и факторы, воздействующие на них. При этом желательна одновременная регистрация антропогенного воздействия на экосистему и биологического отклика на воздействие по всей совокупности показателей живых систем.

Живые объекты — открытые системы, через которые идет поток энергии и круговорот веществ. Все они в той или иной мере пригодны для целей биомониторинга.

Конечная цель исследований методами биоиндикации и биотестирования одна — установить уровень антропогенного влияния на компоненты окружающей среды. Отличие же заключается в том, что биотестирование осуществляется на уровне молекулы, клетки или организма и характеризует возможные последствия загрязнения окружающей среды для биоты, а биоиндикация — на уровне организма, популяции и сообщества и характеризует, как правило, результат загрязнения.

Для биоиндикации выбираются наиболее чувствительные сообщества, характеризующиеся максимальными скоростью отклика и выраженностью параметров.

Биотестирование (экотоксикологический анализ) является способом оценки токсических эффектов действия химических веществ и смесей по физиологическим, морфологическим реакциям, поведенческим изменениям, изменениям выживаемости, плодовитости тест-организмов в определенных условиях. Обобщенная схема алгоритма биомониторинга представлена на рисунке 2.

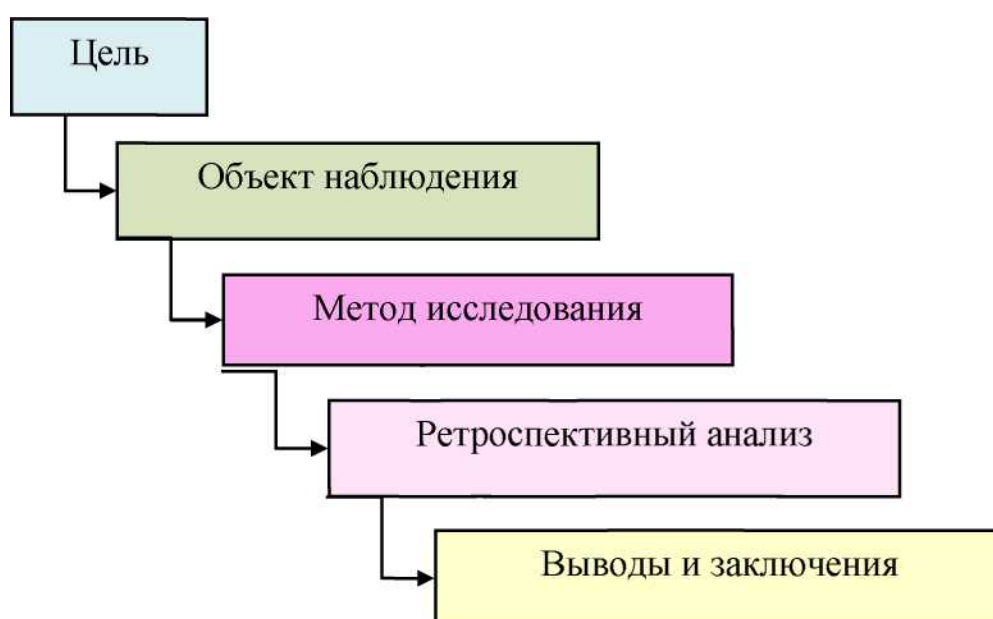


Рис. 2. Общая схема биомониторинга компонентов окружающей среды

Например, в водных экосистемах наиболее чувствительными являются планктонные сообщества, которые быстро реагируют на изменение среды благодаря короткому жизненному циклу и высокой скорости воспроизводства. Бентосные сообщества, где организмы имеют достаточно длинный жизненный цикл, более консервативны: перестройки происходят в них при длительном хроническом загрязнении, приводящем к необратимости процессов.

При биологическом мониторинге в первую очередь учитывается изменение численности видов и видового состава ценозов, фиксируются

возможные изменения в природных популяциях, например симметрии взрослых особей в пределах популяции; выявляется быстрый отклик организмов или популяций и результаты стойких последствий.

В качестве биоиндикаторов могут быть использованы представители всех «царств» живой природы: бактерии, водоросли, высшие растения, беспозвоночные животные, млекопитающие.

Необходимо отметить, что живые организмы по-разному реагируют на создавшиеся изменения окружающей среды. В одном случае происходит реакция на изменения, связанные с действием одного какого-либо фактора - специфическая форма реакции; в другом - неспецифическая - различные антропогенные факторы вызывают одинаковые реакции.

Кроме того, в зависимости от типа ответной реакции биоиндикаторы подразделяются на чувствительные и кумулятивные. Чувствительные биоиндикаторы реагируют на стресс значительным отклонением от жизненных норм, а кумулятивные накапливают антропогенное воздействие, значительно превышающее нормальный уровень в природе, без видимых изменений.

Для гарантированного выявления присутствия в природных средах токсического агента неизвестного химического состава, как правило, используется набор объектов, представляющих различные группы сообщества. С введением каждого дополнительного тест объекта или индикаторного признака эффективность системы контроля повышается. Хотя и здесь должен быть разумный подход к количеству тест-объектов; нет смысла расширять их ассортимент, необходимо работать с наиболее представительными видами, исключая те, которые менее чувствительные, имеют двойственность толкования полученных результатов тестирования или индикаторного смысла.

Для биоиндикации пригодны организмы, неповрежденные болезнями и изначально не испытывающие вредного антропогенного воздействия.

Биологический индикатор должен удовлетворять ряду требований, именно:

- быть типичным и представительным по численности для изучаемой территории; иметь постоянный ареал, дающий возможность проследить динамику загрязнения, а также находиться в условиях, удобных для отбора проб;
- иметь короткий период онтогенеза, чтобы была возможность отслеживания влияния фактора на последующие поколения.

Важным характеристическим методом биоиндикации, который можно применять при исследовании экосистемы изучаемой зоны, является изменение состава редких и исчезающих видов, Список таких организмов, по сути, является набором индикаторных видов, наиболее чувствительных к антропогенному воздействию.

Системный экологический подход к оценке среды дает возможность ранней диагностики ее изменений.

Тревожным,стораживающим сигналом системы биомониторинга животного и растительного мира должна быть любая разбалансировка ареала, а также изменений продукционно-деструкционных процессов.

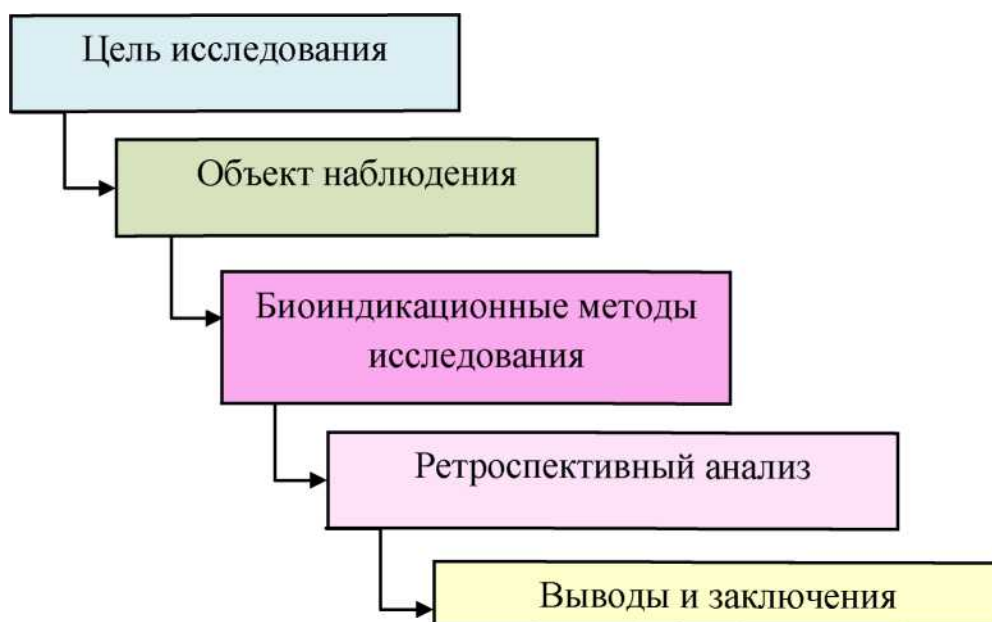


Рис. 3. Алгоритм исследования компонентов ОС методами биоиндикации

Биотестирование - проведение анализов по определению токсичности с помощью различных тест-объектов (бактерий, инфузорий, дафний, цериодафний, водорослей и др.), в лабораторных условиях. Результаты оперативно сигнализируют об опасном воздействии химического загрязнения на жизнедеятельность организмов, причем не по отдельным компонентам, а по их смесям, часто неизвестной природы и не выявляемых другими методами анализа токсических веществ.

Токсичность - степень проявления вредного действия разнообразных химических соединений и их смесей. Токсичность - один из важных факторов, определяющих качество окружающей среды, достаточно информативный, существенно дополняющий наше представление о степени опасности или безопасности объектов при их использовании, являющийся необходимой составной частью комплексной системы контроля при стандартном анализе.

Токсические эффекты, регистрируемые методами биотестирования, включают комплексный, синергический, антагонистический и дополнительные воздействия всех химических, физических и биологических компонентов, присутствующих в исследуемом объекте, неблагоприятно влияющие на физиологические, биохимические и генетические функции тест-организмов.

Критерий токсичности (индекс токсичности) — достоверное количественное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности исследуемого объекта. Среди тест-параметров наиболее часто используют выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной и метаболической активности организмов.

Тест-реакция — это изменение какого-либо биохимического, морфологического, поведенческого или другого функционального показателя у тест-объекта под воздействием токсиканта или их смесей.

Различные тест-организмы по-разному влияют на загрязнение окружающей среды:

— *инфузории* способны реагировать на присутствие в воде и водных вытяжках из почвы и донных отложений веществ, представляющих опасность для их жизнедеятельности, и направленно перемещаться по градиенту концентраций (в направлении изменения концентрации) этих веществ (хемотатическая реакция), избегая их вредных воздействий. Критерием токсического действия является значимое различие в числе клеток инфузорий, наблюдаемых в верхней зоне кюветы в пробе, не содержащей токсических веществ (контроль), по сравнению с этим показателем, наблюдаемым в исследуемой пробе (опыт);

— люминесценция бактерий при нахождении в токсичной среде значительно подавляется, что регистрируется прибором Биотоке-ЮМ;

— дафнии и цериодафнии реагируют на токсичность грунтовых, поверхностных, сточных вод, а также водных вытяжек из почв и осадков сточных вод повышением смертности и изменением плодовитости;

— у *низших водорослей* регистрируется снижение численности клеток и уровня флуоресценции, что позволяет выявить токсичность поверхностных и сточных вод, а также водных вытяжек из почвы и осадков сточных вод.

Оценка качества компонентов окружающей среды методами биотестирования должна проводиться согласно алгоритму, согласующемуся с общим алгоритмом исследования качества окружающей среды (рис.1,4).

Биотестирование позволяет провести экспресс-оценку природной среды и выявить точки, указывающие на наиболее загрязненные участки в зоне обследования. В пробах, где методами биотестирования выявлены какие-либо отклонения, исследуемая среда характеризуется как токсичная. В этом случае химико-аналитическим путем устанавливается качественный и количественный состав этих проб.

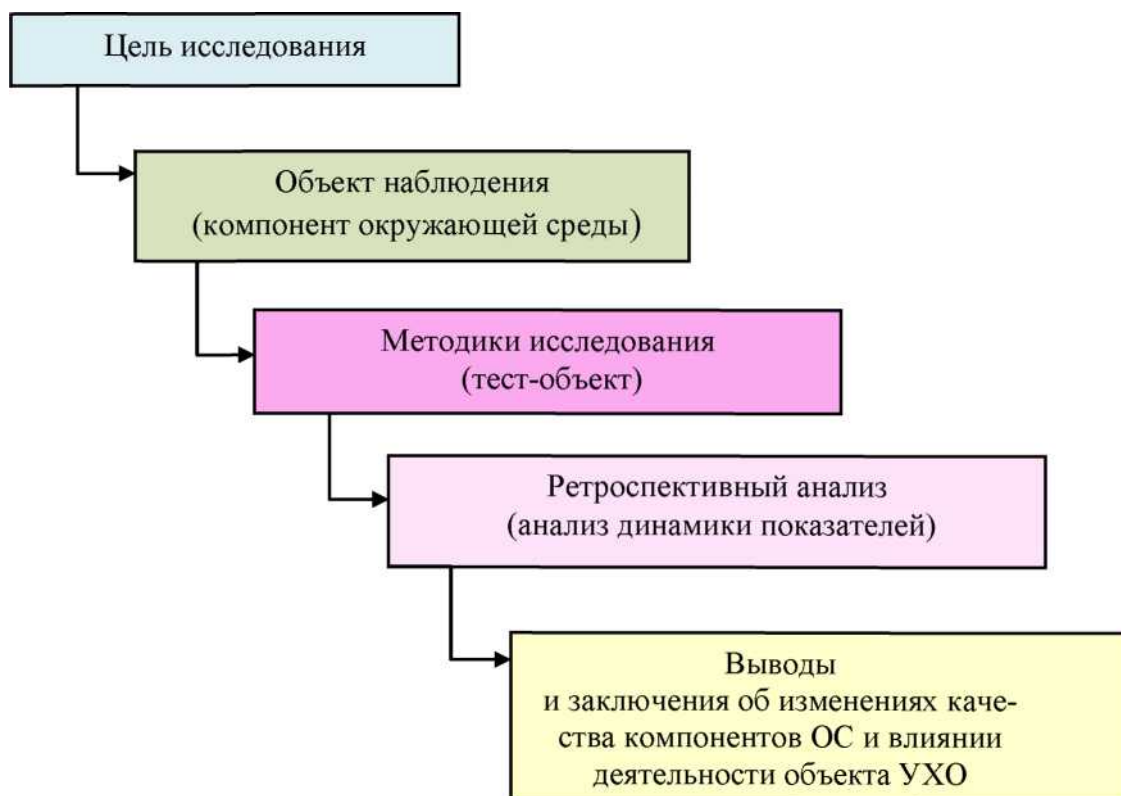


Рис. 4. Алгоритм исследования качества компонентов ОС методами биотестирования

1.5. Основные виды индикаторных сообществ, используемых в качестве биоиндикаторов

Индикаторами качества окружающей среды являются высшие растения [10].

С помощью растений можно проводить биоиндикацию всех природных сред. Индикаторные растения используются при оценке механического и кислотного состава почв, их плодородия, увлажнения и засоления, степени минерализации грунтовых вод и степени загрязнения атмосферного воздуха газообразными соединениями, а также при выявлении трофических свойств водоемов и степени их загрязнения поллютантами.

Чувствительные фитоиндикаторы указывают на присутствие загрязняющего вещества в воздухе или почве ранними морфологическими реакциями — изменением окраски листьев (появление хлорозов; желтая, бурая или бронзовая окраска), различной формы некрозами, преждевре-

менным увяданием и опаданием листвы. У многолетних растений загрязняющие вещества вызывают изменение размеров, формы, количества органов, направления роста побегов или изменение плодovitости. Подобные реакции обычно неспецифичны, то есть они могут проявиться от других естественных природных факторов, например, от заморозков, недостатка (перенасыщения) в почве влаги, недостатке необходимых микроэлементов и т.п.

Поэтому при определении морфологических изменений у растений необходимо учитывать возможность действия других повреждающих факторов.

Представителями другого типа растений- индикаторов являются растения-аккумуляторы. Они накапливают в своих тканях загрязняющее вещество или вредные продукты метаболизма, образуемые под действием загрязняющих веществ, без видимых изменений. При превышении порога токсичности ядовитого вещества для данного вида проявляются различные ответные реакции, выражающиеся в изменении скорости роста и длительности фенологических фаз, биометрических показателей и, в конечном счете, снижении продуктивности.

Получить точные количественные данные о динамике и величине стрессовых воздействий на основе морфологических изменений невозможно, но можно довольно точно определить величину потерь продукции и, имея график зависимости «доза — эффект», рассчитать величину стрессового воздействия.

Индикаторные признаки растений классифицируются (Б. В. Виноградов) как флористические, физиологические, морфологические и фитоценотические.

Флористические признаки - различия состава растительности изучаемых участков, сформировавшиеся вследствие определенных экологи-

ческих условий. Индикаторное значение имеет как присутствие, так и отсутствие вида.

К физиологическим признакам относятся особенности обмена веществ растений.

Анатомо-морфологические признаки свидетельствуют об особенностях внутреннего и внешнего строения, различного рода аномалиях развития и новообразованиях.

Фитоценотическими признаками являются особенности структуры растительного покрова: обилие и рассеянность видов растений, ярусность, мозаичность, степень сомкнутости.

Очень часто в целях биоиндикации используются различные аномалии роста и развития растения — отклонения от общих закономерностей, т.е. с торможением или стимулированием нормального роста (карликовость и гигантизм); с деформациями стеблей, листьев, корней, плодов, цветков и соцветий; с возникновением новообразований (к этой группе аномалий роста относятся различные опухоли).

Для биоиндикации представляют интерес следующие деформации растений: фасциация — лентовидное утолщение и сращение стеблей, корней и цветоносов;

махровость цветков, в которых тычинки превращаются в лепестки;

пролификация — прорастание цветков и соцветий;

асцидия — воронковидные, чашевидные и трубчатые листья у растений с пластинчатыми листьями;

редукция — обратное развитие органов растений, вырождение;

нитевидность — нитчатая форма листовой пластинки;

филлодий тычинок — превращение их в плоское листовидное образование.

Биомониторинг может осуществляться путем наблюдений за отдельными растениями-индикаторами, популяцией определенного вида и

состоянием фитоценоза в целом. На уровне вида обычно производят специфическую индикацию какого-то одного загрязнителя, а на уровне популяции или фитоценоза — общего состояния природной среды.

Симбиоз широко распространен в природе, а симбиотические ассоциации часто играют ключевую роль в поддержании нормального функционирования наземных, пресноводных и морских экосистем. Симбиоз грибов и азотфиксирующих бактерий с высшими растениями и водорослей с грибами обеспечил процветание этих ассоциаций в наземной среде.

Лишайники, симбиотическая ассоциация водорослей и грибов, очень чувствительны к качеству среды и уже давно используются как традиционные биомаркеры состояния атмосферного воздуха. Все более значительной признается роль симбиотических микроорганизмов в трофике практически всех видов организмов. Прямо или косвенно регулируя численность своих хозяев, симбионты оказывают существенное влияние на их динамику численности и структуру популяции. Биоразнообразие симбионтов (паразитов, комменсалов, мутуалистов), как правило, значительно превышает разнообразие их хозяев.

Помимо уточнения оценки биоразнообразия по числу видов учет симбионтов позволяет получать достоверную информацию о качестве среды, так как степень интенсивности инвазии (относительное количество хозяев, имеющих симбионтов) и экстенсивность инвазии (среднее количество симбионтов на хозяине) напрямую зависят от условий, в которых находится популяция хозяев.

Многие симбионты чувствительны к изменениям внешней среды, в частности симбионты водных организмов — к загрязнению и опреснению, а симбионты наземных организмов — к радионуклидам. При оценке разнообразия фауны симбионтов широко используют статистические методы. Учет симбиотических, в том числе и паразитических, организ-

мов, а также исследование состояния симбиотических ассоциаций позволяют более точно оценить биоразнообразие и характер динамических процессов в экосистемах и может быть рекомендован в качестве важных элементов экодиагностических исследований.

Наиболее чувствительными биоиндикаторами на изменения окружающей среды являются микроорганизмы. Поскольку микроорганизмы способны разрушать соединения естественного и антропогенного происхождения, то их развитие и активность находятся в прямой связи с составом органических и неорганических веществ в среде. Принципы биоиндикации с применением микроорганизмов основаны на природном свойстве усвоения и деструкции веществ для чего необходимо иметь сведения о составе, количестве и функциональной активности последних.

Позвоночные животные также служат хорошими индикаторами состояния среды благодаря тому, что:

- являясь консументами, они находятся на различных трофических уровнях экосистем и аккумулируют через пищевые цепи загрязняющие вещества;
- обладание активным обменом веществ способствует быстрому проявлению воздействия негативных факторов среды на организм;
- дифференцированные ткани и органы, обладающие разной способностью к накоплению токсических веществ и неоднозначностью физиологического отклика, позволяют иметь широкий набор тестов на уровне тканей, органов и функций;
- четкие поведенческие реакции к антропогенным изменениям, сложные приспособления животных к условиям среды дают возможность непосредственно наблюдать и анализировать быстрые отклики на оказываемое воздействие;
- короткий цикл развития и многочисленное потомство животных дает возможность для проведения ряда длительных наблюдений, и про-

слеживать воздействие фактора на последующие поколения с акцентом на особо уязвимые этапы онтогенеза.

Физиологическая близость к человеку - основное преимущество использования позвоночных животных в качестве биоиндикаторов.

Основные трудности связаны со сложностью их обнаружения в природе, поимки, определения вида, а также с длительностью морфо - анатомических наблюдений. Кроме того, эксперименты с животными зачастую дороги, требуют многократной повторяемости для получения статистически достоверных выводов.

Оценка и прогнозирование состояния природной среды с привлечением позвоночных животных проводятся на всех уровнях их организации:

- сравнительный анализ на организменном уровне - с помощью его оцениваются изменения морфо-анатомических, поведенческих и физиолого-биохимических показателей;

- особенности внешнего и внутреннего строения животных и их изменение под воздействием определенных факторов (депигментация, изменение покровов, структуры тканей и расположения органов, возникновение уродств, опухолей и других патологических проявлений) оценивается по морфо-анатомическим показателям;

- поведенческие и физиолого-биохимические показатели наиболее ярко отражают изменения в качестве окружающей среды и являются наиболее чувствительными к происходящим антропогенным изменениям.

Токсиканты, проникая в кости или кровь позвоночных животных, сразу же воздействуют на функции, обеспечивающие жизнедеятельность - нарушение ритма дыхания, сердечных сокращений, скорости пищеварения, ритмике выделений, продолжительности циклов размножения.

Результаты исследований должны иметь репрезентативный вид. Для этого в различных районах набор видов-индикаторов должен быть не

большой и одинаковый. Для этого определены некоторые критерии пригодности животных для биоиндикации: принадлежность к разным звеньям трофической цепи — растительноядным, насекомоядным, хищным млекопитающим; оседлость или отсутствие больших миграций; широкий ареал, высокая численность, простота и доступность добывания.

Литература

1. Израэль Ю.А. Экология и контроль состояния природной среды, - М.: Гидрометеиздат, 1984.-560с.
2. Биоиндикация и биомониторинг. М. Наука. 1991. Ред. Криво-луцкий Д.А. С 6 - 7.
3. Федоров В.Д. К стратегии биологического мониторинга. Биол. науки (научные доклады высшей школы) 1974, №10, С. 7 - 17
4. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга. М., МГУ, 1985. 158с.
5. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. - Киров: Вятка. 2002. - 544с.
6. Журков В.С., Красовский Н.Г., Жолдакова З.И. и др. Методические указания по изучению мутагенной активности химических веществ при обосновании их ПДК в воде. МЗ СССР. Главное санитарное управление, М. 1986. 26с.
7. Faibaim D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. The comet assay: A comprehensive review. // Mutat. Res., 1995, V.339, P.37-59.
8. McCann J., Choi E., Yamasaki E., Ames B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay 300 chemicals// Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1975, V.72, P. 5135-5139.
9. Федорова А.И., Калаев В.Н., Плахотина А.Ю. Биоиндикация мутагенного эффекта радона с использованием ядрышкового теста в

клетках корней традесканции // Вестник ВГУ, Серия: Химия, Биология, Фармация. 2004. №2. С. 151-156.

10. Биологический контроль окружающей среды (биоиндикация и биотестирование). Под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. М. Издательский центр «Академия».2007. - 288с.

Глава 2. МЕТОДЫ КОМПЛЕКСНОЙ БИОИНДИКАЦИИ

2.1. Оценка биоразнообразия фитоценозов и жизненного состояния деревьев

Растительность является основным компонентом биосферы и индикатором ее состояния. В районах строительства опасных промышленных предприятий еще до пуска объекта дается объективная оценка состояния растительности территории, оценка биоразнообразия растительного покрова, т.е. создается исходная база данных - «точка отсчета» для ретроспективного анализа влияния деятельности объекта на окружающую среду.

Изучение растительности проводится на постоянных пробных площадках [1]. Постоянные пробные площадки (ППП) закладываются, по возможности, в типичных участках лесных массивов, луговых, степных, болотных, прибрежно-водных фитоценозах недалеко от точек отбора проб и для контроля в идентичных фитоценозах в чистой (фоновой) зоне. Приняты следующие размеры ППП: при исследовании травяных и кустарниковых сообществ (луговых, болотных, степных, прибрежно-водных) - 100 м², лесных - 400 м² (для удобства работы ППП можно разбить на квадраты 10х10м). Границы ППП проводятся с помощью буссоли или иного аналогичного инструмента. ППП дается прямоугольная или квадратная форма. Угловые пикеты соединяются туго натянутым по прямой шнуром. Все 4 угла ППП закрепляются стандартными столбами (или помечаются масляной краской).

Кора всех стоящих деревьев ППП слегка зачищается по периметру на высоте 1,3 м. Масляной краской на уровне 1,3 м от корневой шейки ставится горизонтальная черта и над ней - номер дерева. Высота цифр - 5 см. При раздвоении ствола дерева ниже высоты 1,3 м, каждому из двух стволов дается свой номер. Нумерация проводится челночным движением, начиная с северо-западного угла. Желательно также пронумеровать все сложенные и ветровальные деревья.

Состав древостоя выражают формулой, в которой названия деревьев обозначают начальными буквами. Формулу древостоя, отражающую участие в нем каждой породы, записывают в десятых долях от общего числа деревьев. Формула 5ЕЗП2Л+Б обозначает, что в данном фитоценозе из каждых 10 деревьев 5 приходится на долю ели, 3 - на долю пихты, 2 - липы, а береза встречается в количестве менее 10% от общего числа стволов.

Измерение длины окружности (периметра) ствола производят металлической рулеткой на уровне горизонтальной черты (1,3 м) с точностью до 1 см. Результат измерения заносится в паспорт ГТПП с указанием номера дерева и породы. Рассчитанные (по формуле $D = \text{периметр} / 3,14$) диаметры округляются до целых сантиметров. Измерение диаметра стволов деревьев можно осуществлять мерной вилкой.

У 20-30 живых деревьев, выбранных пропорционально распределению по ступеням толщины, с помощью бурава по керну определяется возраст с точностью до 1 года. КERN берется с восточной стороны ствола на высоте 0,3 м от шейки корня. После взятия керна отверстие забивается плотной пробкой из древесины лиственной породы или закрывается садовым варом. При наличии стволовой гнили бурав дезинфицируется в растворе любого антисептика (спирта, раствора перманганата калия). К полученному возрасту по керну прибавляется возраст на пень, равный в среднем 5 годам. Результат определения возраста заносится в паспорт ППП. По

керну желательно также определить ширину водопроводящей зоны, патологии ствола и радиальные приросты ствола по десятилетиям.

Измерение высоты деревьев проводится с помощью высотомеров (эклиметров, уклономеров, оптических высотомеров) с точностью до 1 м, желательно у тех же деревьев, у которых определяли возраст. Для деревьев максимальных диаметров замеряется не менее 5-10 высот. Сомкнутость крон представляет отношение площади неба, занятой проекцией крон, к общей площади, принятой за 1. Сомкнутость крон выражается в долях единицы: 0,9; 0,8; 0,7 и т.д.

На illlii выявляется полный видовой состав сосудистых растений, отмечается жизненность видов, т.е. морфологическое и анатомическое состояние вегетативных и генеративных органов растений, изменения в состоянии: дефолиация - опадение листвы; некрозы - отмирание ограниченных частей растений; хлорозы - пожелтение, побурение, покраснение; прекращение цветения и плодоношения; появление различных уродств в строении цветков, плодов и вегетативных органов.

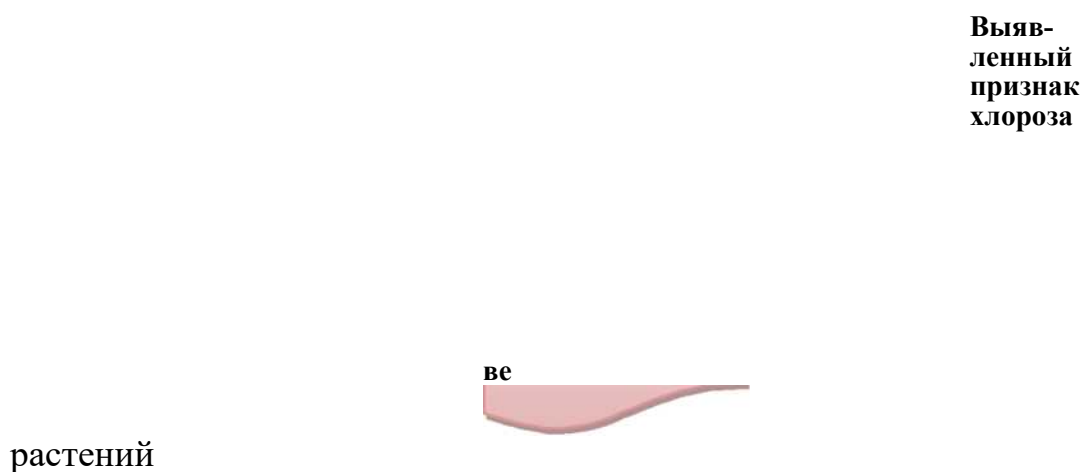
Каждый исследованный объект должен характеризовать определенное качество окружающей среды, например, индикаторный признак «хлороз листьев» (рис.5) может быть признаком проявления как антропогенного воздействия на растение (увеличения содержания загрязняющего вещества в атмосферном воздухе, почве), так и фактором проявления естественных климатических процессов (повышение и застой грунтовых вод, поверхностное почвенное переувлажнение и т.п.); при избытке в почве фосфора повреждается все взрослое растение. Наблюдается некроз ткани, общее пожелтение листьев; у более старых листьев концы и края становятся желтыми и коричневыми, появляются яркие некротические пятна, листья опадают; при избытке серы происходит общее огрубление растений, листья становятся мелкими, тускло-зелеными, стебли твердыми, позднее листья могут скручиваться внутрь и покрываться наростами,

края их становятся коричневыми, затем бледно-желтыми; при избытке хлора происходит общее огрубление растений, листья становятся мелкими, тускло-зелеными, стебли твердыми, у некоторых растений на более старых листьях появляются пурпурно-коричневые пятна, после чего листья опадают и т.п.

При эксплуатации опасных промышленных объектов необходима объективная оценка состояния растительных сообществ в районах распо-

ложения объектов и выявление тенденций в ожидаемых изменениях этого состояния.

Рис. 5. Факторы, влияющие на проявление индикаторного признака у



В связи с этим в районах, попадающих в зону возможного распространения загрязняющих веществ, продуктов их разложения, а также реагентов, используемых для их детоксикации, проводится систематическое детальное наблюдение за растительными сообществами, позволяющее фиксировать происходящие изменения в их составе и структуре.

Систематические детальные наблюдения за фитоценозами (биомониторинг), позволяют объективно оценивать влияние указанных объектов на растительность, фиксировать происходящие изменения в их составе и структуре. Под изменением состояния фитоценозов понимается: изменение флористического состава, смена доминантных видов во флористическом составе; изменение количества и соотношения видов в семействах, родах, исчезновение редких и уязвимых видов (занесенных в Красные книги); видов, находящихся на границе своего ареала.

Описание лесного сообщества необходимо проводить в следующей последовательности:

1) с описания травяно-кустарничкового и мохово-лишайникового ярусов, полога, подроста, т.к. исследование древесного яруса приводит к нарушению нижних ярусов (вытаптыванию).

2) древесного яруса.

3) внеярусной растительности.

Древесный ярус является главным, ценозообразующим компонентом лесного сообщества. К древесному ярусу относятся древесные растения, высота которых более 1,3-1,5 м, а диаметр достиг 6 см и более.

Воздействие атмосферных, почвенных загрязнителей на растения - биохимическое явление, затрагивающее в первую очередь метаболические и физиологические процессы и разрушающие ультрамикроскопические структуры клеток листа.

По мере разрушения внутриклеточных структур начинают проявляться внешние, визуально наблюдаемые повреждения и отклонения от нормы у ассимиляционных органов и других частей растений. Отмечаются следующие морфологические изменения: хлорозы и некрозы у листьев (хвои); снижение продолжительности жизни хвои; ускоренное отмирание ветвей основной части кроны; снижение охвоенности (облиственности) кроны (рис.6-10).

Признаки состояния листьев (хвои) и дефолиация крон, состояние ветвей основной части кроны лежат в основе шкалы *категорий жизненного состояния деревьев*. Категории состояния дерева указываются по 10-балльной шкале; для стоящих деревьев используются баллы от 0 до 5. Баллы 6-9 используются для обозначения буреломных и ветровальных стволов. Категории состояния определяются по совокупности признаков: ажурности кроны, приросту по высоте, состоянию ветвей, ствола и корней. Одним из критериев оценки состояния деревьев является: 1) Дефолиация,

которая показывает потери ассимиляционного аппарата. При этом оцени-

вается для сосны верхняя $2/3$ часть кроны; для ели верхняя $1/3$ часть кроны.

2) Дехромация (обесцвечивание листьев или хвои) оценивается с точностью 5% аналогично дефолиации.

Ежегодно проводится оценка состояния учетных деревьев.

О - здоровые деревья - без внешних признаков ослабления; с густой зеленой кроной, с нормальными для данного возраста, сезона и условий местопроизрастания приростами последних лет (рис.6).

Дефолиация: 0 - 5%.

Дехромация: 0%

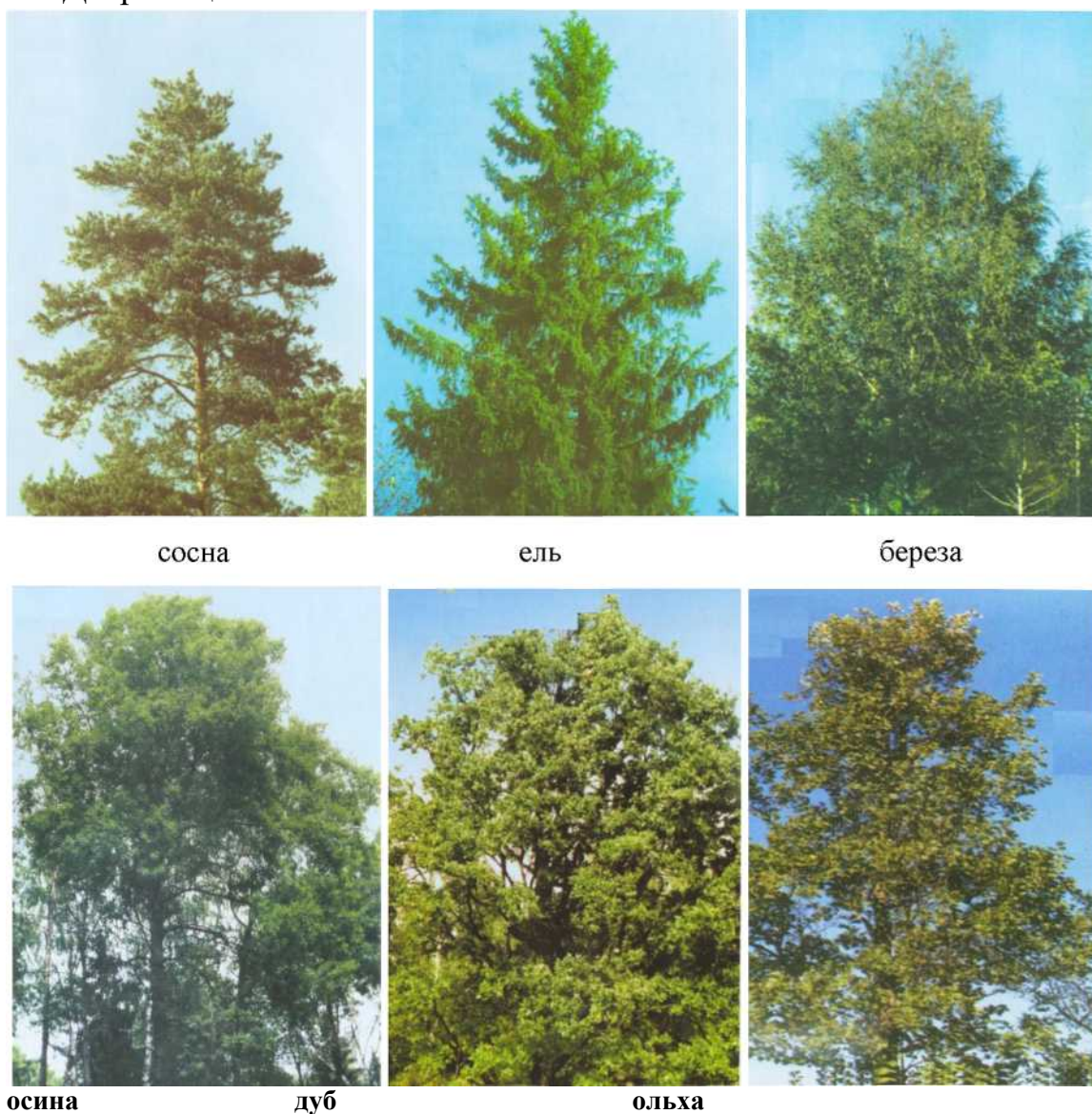


Рис. 6. Общий вид здоровых деревьев (категория состояния 0)

1 - ослабленные деревья - характеризуются слабо ажурной кроной, повреждением до 1/3 фотосинтезирующего аппарата, укороченным приростом в высоту, усыханием отдельных ветвей (менее 1/4), повреждением или небольшим местным отмиранием ствола, отдельных корневых лап; хвоя часто светлее обычного (рис.7).

Дефолиация: для хвойных 10 - 20%; для лиственных 10 - 30%.

сосна

ель

береза

Дехромация: 5 -10%

осина

дуб

ольха

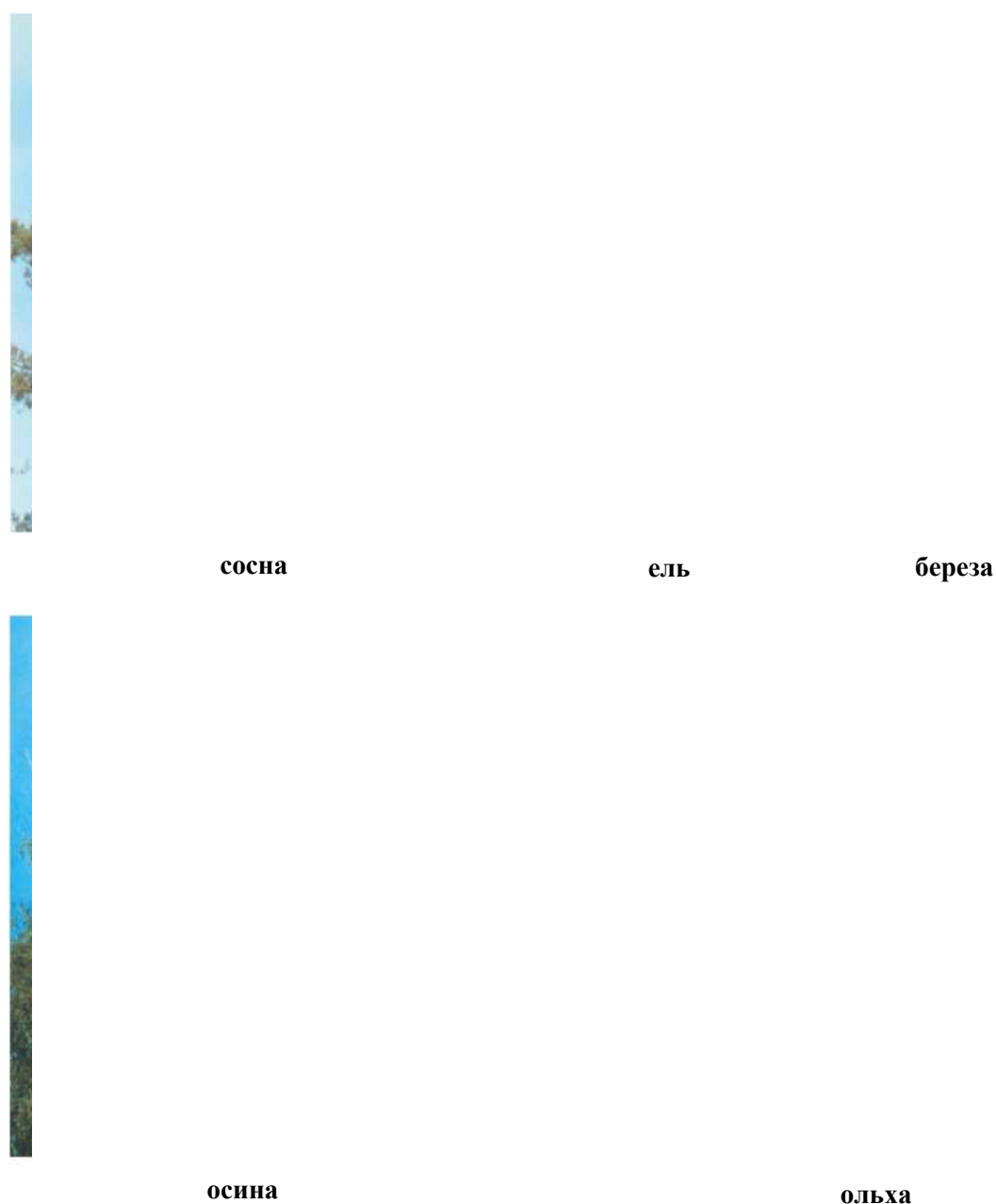
Рис. 7. Общий вид ослабленных деревьев (категория состояния 1)

Рис. 8. Общий вид сильно ослабленных деревьев (категория состояния 2)

2 - сильно ослабленные деревья - с ажурной кроной, с повреждением и усыханием до $\frac{2}{3}$ фотосинтезирующего аппарата. У хвойных пород хвоя светло-зеленая или серовато-матовая. У лиственных пород листва

3 мельче и светлее обычной, преждевременно опадает, крона изрежена, усохших ветвей от 1/4 до 1/2. Прирост сильно укорочен или отсутствует. Деревья суховершинные, со значительными повреждениями, поражениями ствола, корневых лап; в ряде случаев наблюдается частичное заселение дерева стволовыми вредителями при местном типе ослабления (рис. 8);

Дефолиация: для хвойных 20 - 50%; для лиственных 30 - 60%.



Дехромация: 10 - 20%

Рис. 8. Общий вид сильно ослабленных деревьев (категория состояния 2)

4 - усыхающие - с сильно изреженной кроной усохших ветвей от 1/2 до 3/4; с повреждением более 2/3 фотосинтезирующего аппарата, листва (хвоя) желтеет и осыпается, текущего прироста по высоте нет, по стволу и корням возможны насечки и единичные свежие поселения стволовых вредителей (рис.9);

Дефолиация: для хвойных 50 - 70%; для лиственных 60 - 80%.

Дехромация: 30 - 50%



сосна



ель



береза



осина



дуб



ольха

Рис. 9. Общий вид усыхающих деревьев (категория состояния 3)

5 - свежий сухостой - деревья, усохшие в текущем году, с желтой или бурой листвой (хвоей) или без нее; мелкие веточки сохраняются, кора сохранена или осыпалась лишь частично; по стволу - свежие поселения короедов, возможны личинки 1-3-го возраста. Усыхание хвойных деревьев без заселения короедами встречается редко, среди лиственных пород - чаще (рис. 10);

дефолиация: для хвойных 80 - 100%; для лиственных 80 - 100%.

Дехромация- 100%.



сосна



ель



береза



осина



дуб



ольха

6 - старый сухостой - деревья, усохшие в прошлые годы; хвои (листвы) нет; вершинка, как правило, обломлена; кора и мелкие веточки легко

Рис. 10. Общий вид свежего сухостоя (категория состояния 4)

отваливаются; стволовые вредители вылетают или вылетели; дефолиация-100%; дехромация-100%.

7 - свежий ветровал - деревья, которые в прошлом году относились к категории 0-3, а в год наблюдений выпали с оголением корневой системы; пожелтевшая листва (хвоя) местами может сохраниться, текущего прироста нет; по стволу, как правило, свежие поселения короедов или энтомокомплекса, летных отверстий нет.

8 - старый ветровал - лежащие деревья с вывороченными корневыми системами, по времени - это отпад прошлых лет; кора легко отваливается, стволовые вредители вылетают или вылетели;

9 - свежий бурелом - деревья, которые в прошлом году относились к категориям 0-3, а в год наблюдений выпали со сломом ствола ниже границы кроны; пожелтевшая листва (хвоя) местами еще может сохраняться; текущего прироста нет; по стволу, как правило, свежие поселения короедов или энтомокомплекса, летных отверстий нет;

10 - старый бурелом - деревья со сломанным ниже границы кроны стволом, по времени - это отпад прошлых лет; кора легко отваливается, стволовые вредители вылетают или вылетели.

После визуальной оценки состояния деревьев желательно сфотографировать кроны наблюдаемых деревьев. Место, с которого велась съемка, необходимо отметить столбиком, и повторные съемки следует проводить с одного и того же места.

2.2. Определение содержания пигментов у высших растений

В пластидах зеленого листа находится целый ряд пигментов, участвующих в процессе фотосинтеза: зеленые - хлорофиллы *a* и *b* и сопутствующие им желтые - каротиноиды. Загрязнение окружающей среды (атмосферного воздуха, почвы, воды) приводит к снижению содержания пиг-

ментов и изменению их соотношения, поэтому этот показатель рекомендуется использовать в качестве комплексного показателя качества компонентов окружающей среды [2,3].

Для определения содержания хлорофиллов в растениях выбирают длины волн, при которых спектры поглощения хлорофиллов в красной и синей областях пересекаются, что происходит при длине волны 648 нм. В неочищенных экстрактах из растительных объектах кроме хлорофиллов содержатся каротиноиды, которые интенсивно поглощают свет при 440 нм и не поглощают при 648 нм. Поэтому для определения суммы хлорофиллов пользуются длиной волны 648 нм, при которой интенсивность окраски пропорциональна концентрации хлорофиллов даже в присутствии каротиноидов.

Так как хлорофилл *a* и *b* и каротиноиды имеют максимумы поглощения при разных длинах волн, их легко можно определить в одном растворе спектрофотометрическим методом.

Фиксированную кипящим ацетоном пробу листьев растирают в фарфоровой ступке с добавлением кварцевого песка под слоем ацетона. В целях предотвращения феофитизации во время извлечения к ацетону добавляют карбонат кальция для нейтрализации кислот клеточного сока, а также немного (на кончике шпателя) карбонат натрия для обезвоживания пробы.

Используют несколько последовательных порций растворителя, сливая каждую предыдущую через стеклянный фильтр, укрепленный в колбе Бунзена с водоструйным насосом. Каждую порцию растворителя сливают после нескольких минут дополнительного растворения и растирания массы. Обычно требуется не менее 5-7 порций до полного обесцвечивания последней из них. В конце экстракции остается сероватая масса, суспензия которой не обнаруживает спектральных признаков пигментов. Следует обратить внимание на возможные потери пигментов и тщательно смывать все со стенок фарфо-

ровой ступки, по которым пигменты поднимаются при испарении растворителя.

Объединенные порции экстракта переносят в мерную колбу (на 25 или 50 мл), доводят ацетоном до метки, промывая пробирку для отсасывания. Колбу закрывают притертой пробкой, экстракт перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длинах волн 662, 644 (хлорофиллы) и 440,5 нм (каротиноиды) в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве стандарта используют 100% ацетон.

Содержание пигментов в листьях рассчитывается по формулам:

$$C_a = 9.78 \cdot E_{662} - 0.99 \cdot E_{644}$$

$$C_b = 21.42 \cdot E_{644} - 4.65 \cdot E_{662}$$

$$C_{a+b} = C_a + C_b$$

$$C_k = 4.69 \cdot E_{440.5} - 0.268 \cdot C_{a+b}$$

C_a - концентрация хлорофилла *a* (мг/л),

C_b - концентрация хлорофилла *b* (мг/л),

C_k - концентрация каротиноидов (мг/л),

E_{662} - оптическая плотность раствора при 662 нм и толщине слоя 1 см,

E_{644} - оптическая плотность раствора при 644 нм и толщине слоя 1 см,

$E_{440.5}$ - оптическая плотность раствора при 440.5 нм и толщине слоя 1 см.

Исходя из найденных концентраций пигментов, рассчитывают их содержание в исследуемом образце по формуле:

$$X = \frac{C_{хл} \cdot V \cdot 0.001}{m}$$

где X - содержание пигмента в исследуемом образце (мг/г),

$C_{хл}$ - концентрация пигмента (мг/л),

V - объем экстракта пигментов (мл),

m - навеска исследуемого вещества (г),

1, 01 — коэффициент пересчета концентрации пигмента.

В качестве показателей, характеризующих состояние пигментного

комплекса растений, в условиях химического загрязнения используются:

- содержание пигментов (мг/г сырой массы, мг/г сухой массы),
- сумма хлорофиллов (мг/г сырой массы, мг/г сухой массы),
- соотношение хлорофиллов а/б,
- соотношение хлорофиллы/каротиноиды.

Для проведения экологического мониторинга рекомендуется отбирать наиболее чувствительные к химическому загрязнению виды растений: черника (*Vaccinium myrtillus* L.); брусника (листья 2 года жизни) (*Vaccinium vitis-idaea* L.), сосна (хвоя сосны) (*Pinus sylvestris* L.), лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.), манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.), подорожник большой (*Plantago major* L.), чина луговая (*Lathyrus pratensis* L.), горошек мышиный (*Vicia cracca* L.), клевер средний (*Trifolium medium* L.), клевер луговой (*Trifolium pratense* L.).

2.3. Палинологические методы индикации: определение доли abortивных пыльцевых зерен и жизнеспособности пыльцы

По состоянию морфологических (листья) и репродуктивных органов высших растений можно дать оценку качества окружающей среды. В качестве индикаторов традиционно используются следующие индикационные признаки: частота встречаемости морфологических отклонений, величина показателей флуктуирующей асимметрии [4,5], комплекс признаков у хвойных, палинологические методы (качество и жизнеспособность пыльцы и др.) [6-11].

Определение количества пыльцы в поле зрения микроскопа - сравнительный показатель, при котором за норму принимается количество пыльцы растений, произрастающих на контрольной территории.

Для снижения вероятности артефактов добиваются максимального единообразия приемов проведения анализа.

В ходе исследований на протяжении одного сезона цветения (апрель-июнь) изучаются популяции растений сосны обыкновенной, осои волосистой, звездчатки жестковолосистой, ольхи клейкой, лещины обыкновенной, березы повислой.

Названные виды растений очень удобны в качестве объектов исследования в сравнении с другими, так как имеют широкое распространение, большое количество пыльцы, несложное и равномерное ее отделение из пыльников.

Отбор проб производится непосредственно на стационарных площадках пробоотбора, а также на контрольных образцах пыльцы тех же видов, отобранных на контрольной площадке в экологически-чистом районе за пределами зоны техногенного влияния. Эти показания являются точкой отсчета (фоном), отражающей зависимость качественного и количественного состояния пыльцы, взятой из разных точек пробоотбора (Рис. 11.).

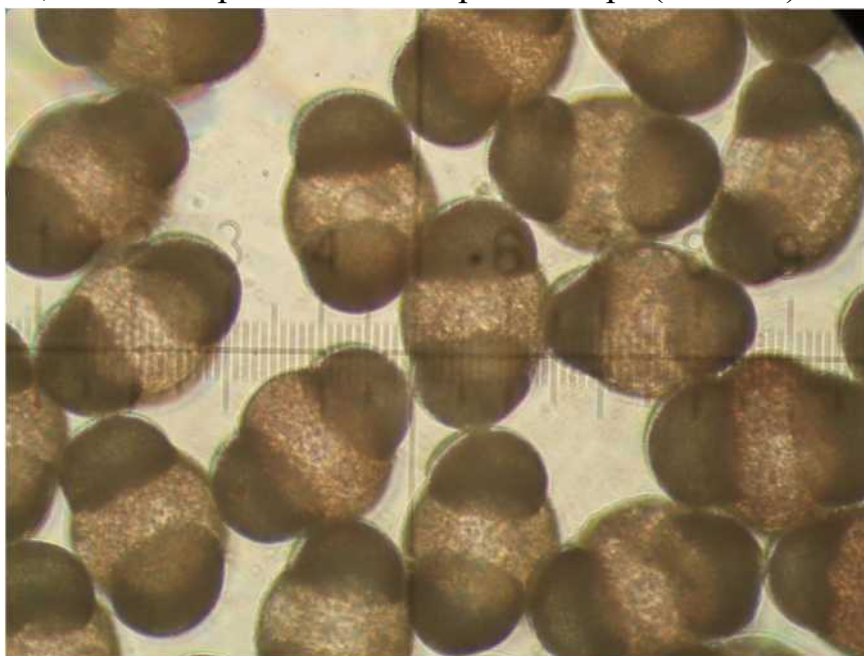


Рис. 11. Состояние пыльцы сосны обыкновенной с контрольной площадки

Погодные условия могут отразиться на полученных результатах, поэтому сравнение данных с предыдущими должно проводиться с ориента-

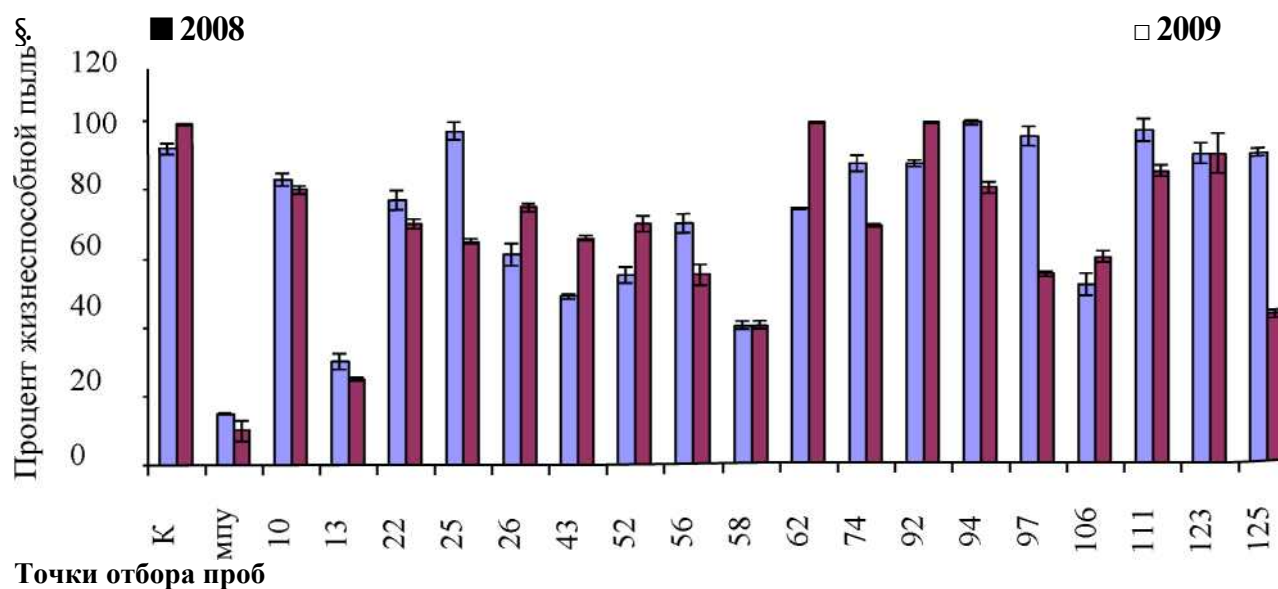
цией на одинаковые погодные условия. Показатель «количество пыльцевых зерен в поле зрения» в большей степени зависит от особенностей вегетационного периода растений. Данные для сравнительного анализа и

выводы о жизнеспособности пыльцы сосны обыкновенной осуществляется по итогам рассмотрения табличных данных. Пример представления данных приведен в таблице 1.

Таблица 1 - Показатели жизнеспособности пыльцы на стационарных

№ площадки в СЗЗ и репера	пыльцевых зерен в поле зрения (среднее арифметическое)	жизнеспособной пыльцы (среднее арифметическое)	Ошибка средней	Стандартное отклонение	Достоверность различий (критерий Манна-Уитни)	Выводы и заключения
Контроль	110	92	1,7	3	—	
25	79	97	2,7	4,6	>0,05	
13	12	30	2,3	4	<0,05	
22	45	77	2,9	5	>0,05	

Для наглядного отображения динамики показателей строятся диаграммы в координатах осей точки отбора проб и % жизнеспособной пыльцы



Точки отбора проб

Рис. 12. Динамика показателей жизнеспособности пыльцы сосны обыкновенной

(рис. 12).

Исследование палинологического материала растений сосны обыкновенной проводится с целью изучения динамики влияния химического

загрязнения на морфологию пыльцевых зерен. Для установления тенденции в изменении экологических условий материал отбирается на одних и тех же пробных площадках. Появление пыльцы с резко выраженными морфологическими изменениями - свидетельство химического воздействия загрязняющих веществ.

В качестве морфологических отклонений при визуальном изучении отмечаются следующие признаки: недоразвитие генеративной клетки пыльцевого зерна, деградация воздушных мешков, деформация, кривизна, а также полиморфизм пыльцевых зерен растений сосны обыкновенной, произрастающих на разных пробных площадях (рис. 13)

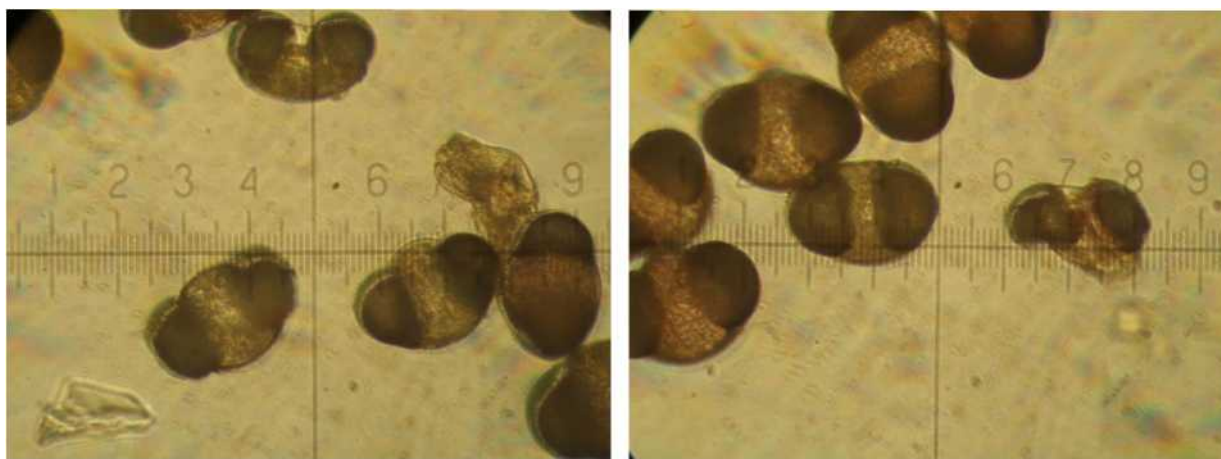


Рис. 13. Существенные морфологические аномалии пыльцы сосны обыкновенной

Размеры пыльцевых зерен, воздушных мешков не рассматриваются как морфологические отклонения, поскольку являются, с большой вероятностью, индивидуальными эколого-морфологическими особенностями растений разных биотопов, а также формируются погодным условиям в период формирования пыльцы.

В качестве дополнительного критерия используются размеры, полученные при помощи окуляра-микрометра, причем фиксировались минимальные, средние и максимальные размеры. Иллюстрации, отражающие состояние пыльцы сосны обыкновенной, в сравнении с контрольными данными, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели количества пыльцы сосны обыкновенной с резкими морфологическими отклонениями на ППП в СЗЗ и ЗЗМ УХО

№ репера	Процент уродливой пыльцы (среднее арифметическое)	Размер пыльцевых зерен, мкм			Процент уродливой пыльцы (среднее арифметическое)	Ошибка средней	Стандартное отклонение	Достоверность различий (критерий Манна-Уитни)	Вывод, заключение
		Мин.	Сред.	Макс					
Контроль		2,43	5,4	5,94	1	0,12	0,2	-	
1		3,51	7,02	7,29	62	3,5	6	<0,05	
10		3,51	5,4	6,21	18	1,2	2Д	<0,05	
22		4,86	5,67	7,02	8	1,5	2,6	>0,05	

Аналогичным образом исследуется негативное влияние загрязняющих веществ на жизнеспособность пыльцевых зерен осои волокнистой. По изменениям состояния их жизнеспособности и морфологии выявляются площадки, где растения испытывают негативное воздействие, а также отслеживается динамика происходящих изменений. Отмечается, что на исследуемых площадках, находящихся вблизи рекультивируемых территорий, состояние пыльцевых зерен осои значительно улучшается (рис. 14).

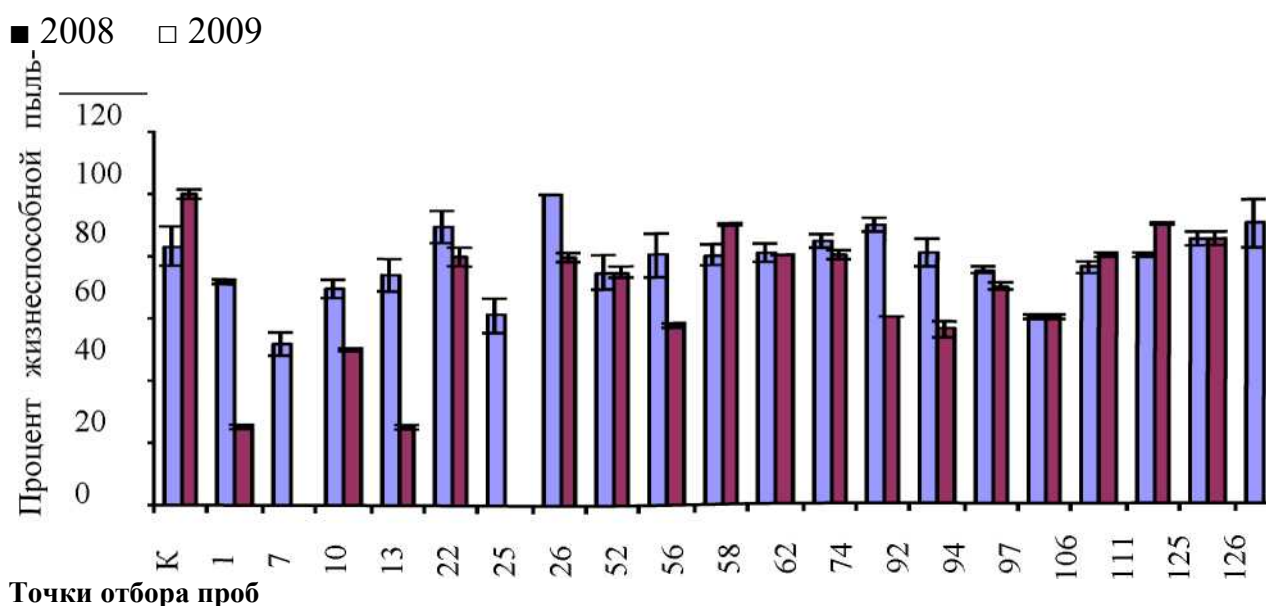
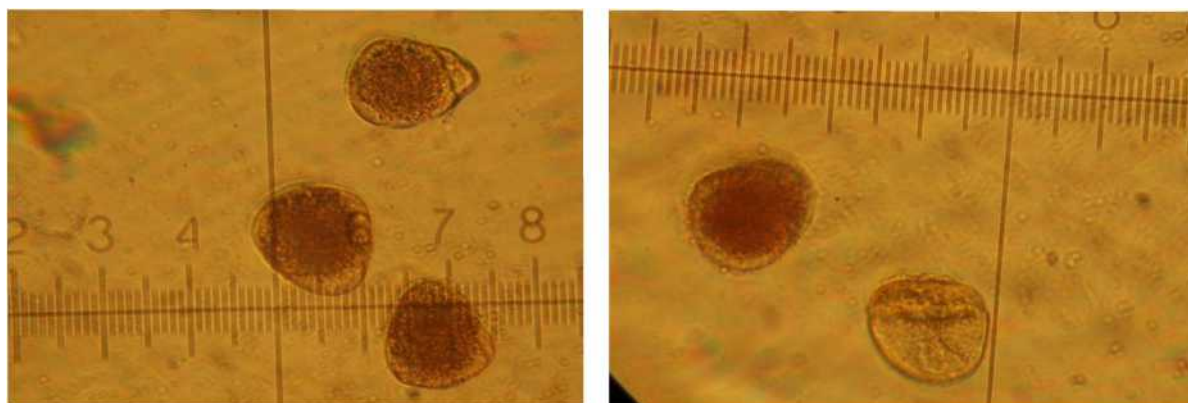


Рис. 14. Динамика показателей жизнеспособности пыльцы осои волосистой на разных пробных площадках в 2008-09 гг.

Патологии в развитии пыльцевых зерен позволяют выявить негативное влияние загрязняющих веществ. Расчет количества аномальных пыльцевых зерен является важным критерием в оценке состояния среды в месте произрастания растения. В качестве основных видов морфологических отклонений при визуальном изучении отмечают: палочковидная форма, деградация оболочек пыльцевого зерна, кривизна и иные виды деформации. При наиболее широком варьировании размеров пыльцевых зерен типичная форма их при этом может изменяться незначительно (рис. 15, 16). Может отмечаться полиморфизм пыльцевых зерен растений осоки волосистой у растений, произрастающих на разных пробных площадках, хотя эти морфологические отклонения больше типичны для характеристики индивидуальных особенностей растений разных экологических биотопов.



а)
б)
Рис. 15. а) пыльцевые зерна осоки волосистой правильной формы; б) отклонение в морфологии пыльцевого зерна

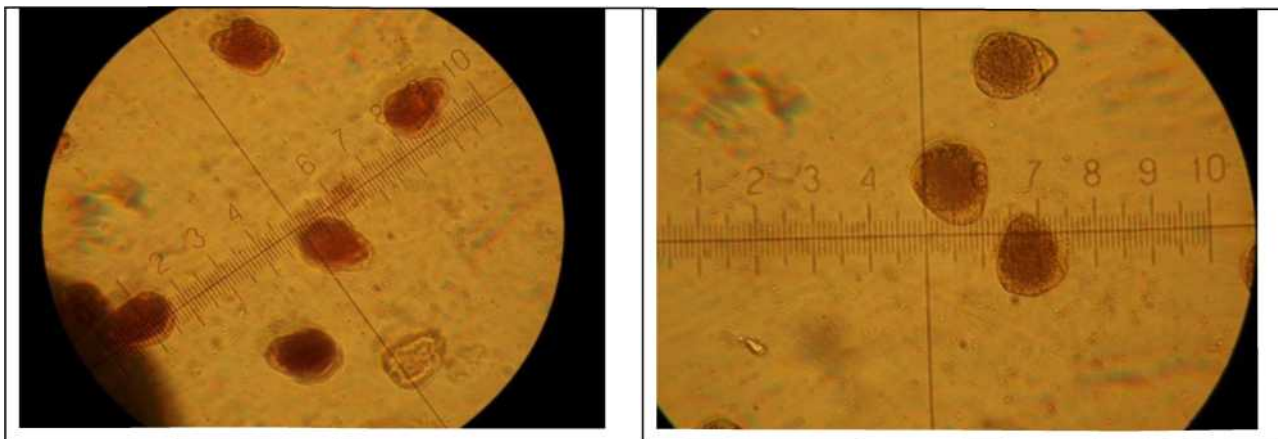


Рис. 16. Виды типичных отклонений формы пыльцевого зерна осоки волосистой

В качестве дополнительного критерия описания пыльцевых зерен используется проведение измерения их размера при помощи окуляр-микрометра, причем фиксируются минимальные, средние и максимальные размеры.

Лещина обыкновенная представляет собой чувствительный и очень перспективный объект палинологических исследований. В ходе исследований обнаружено, что в местах относительно неблагоприятной экологической обстановки значительная доля соцветий лещины обыкновенной имеет существенные морфологические отклонения.

Палинологические исследования с использованием лещины обыкновенной позволяют получать достоверные результаты. Негативное влияние на генеративные показатели этого растения оказывают как радиационные воздействия, так и загрязняющие вещества атмосферы. На фоне этих влияний происходят изменения соцветий (рис. 17,18). В контрольных биотопах подобных особенностей соцветий не зафиксировано.



а)

б)

Рис. 17- а) Соцветия лещины обыкновенной правильной формы;

б) Морфологические отклонения соцветий лещины обыкновенной

Показатель количества пыльцы лещины обыкновенной с резкими морфологическими отклонениями позволяет выявить патологии в развитии пыльцевых зерен. Расчет количества аномальных пыльцевых зерен может служить важным критерием в оценке состояния среды в месте произраста-

ния растения. Примерами морфологических аномалий служат: недоразвитие, отсутствие развитых воздушных мешков, разрывы интины и т.п. Анализ морфологических отклонений пыльцы растений лещины обыкновенной, произрастающей на разных пробных площадках, свидетельствует о следующей общей закономерности. Пыльцевые зерна, имеющие отклонения в строении, как правило, нежизнеспособны.

В качестве одного из критериев является размер пыльцевых зерен, определяемый при помощи окуляра-микрометра, причем фиксируются минимальные, средние и максимальные размеры. Пример варьирования результатов приведен на рис. 18.

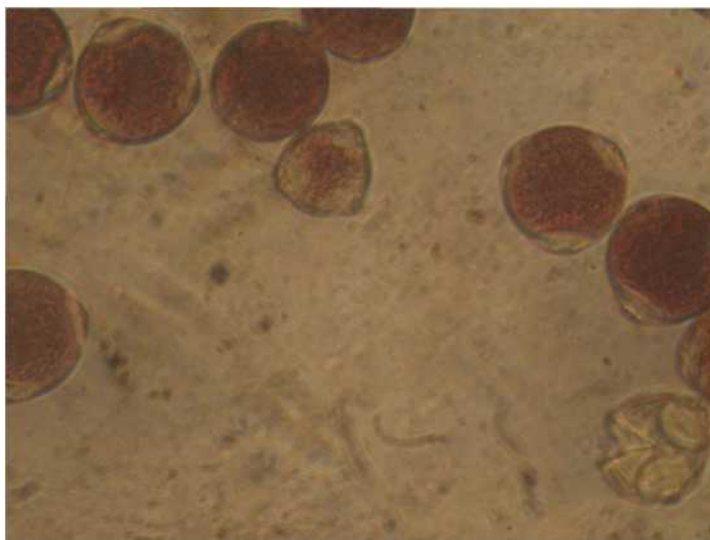


Рис. 17. Морфологические аномалии пыльцы лещины обыкновенной

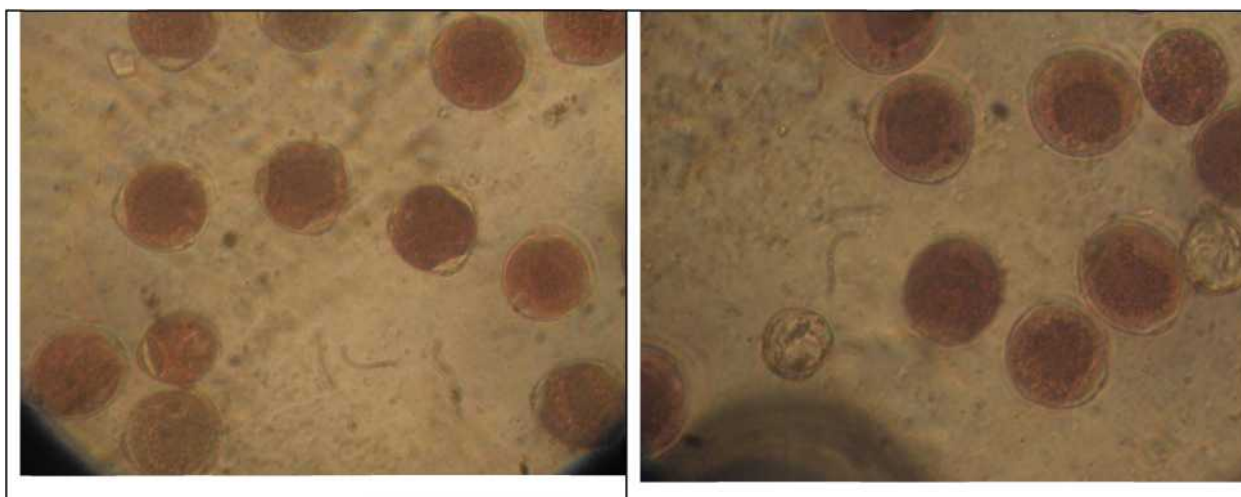
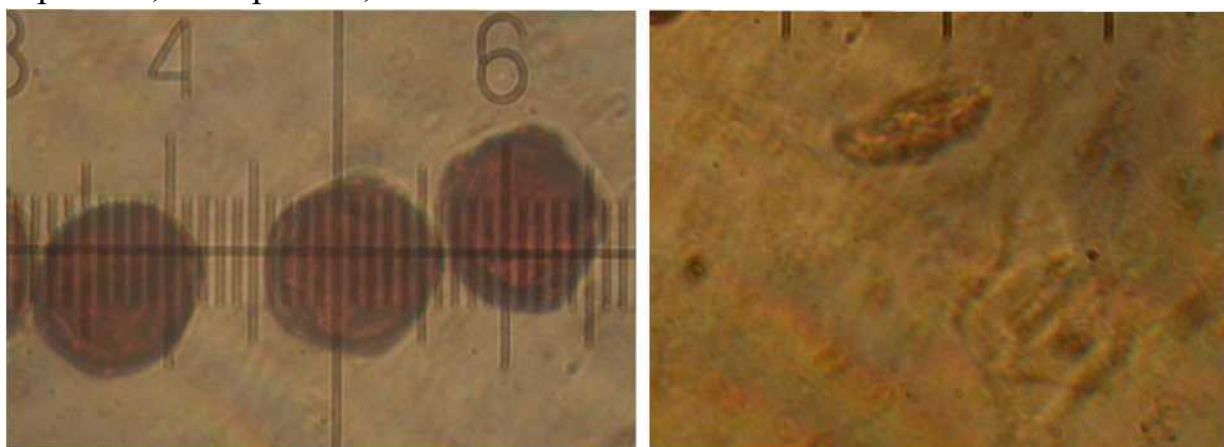


Рис. 18. Варьирование размера пыльцевых зерен лещины обыкновенной

Ольха клейкая, как и лещина обыкновенная применяется в качестве объекта биоиндикационных исследований. Это растение характеризуется достаточным распространением на территории РФ. Палинологические исследования с использованием ольхи клейкой позволяют получать достоверные результаты. У растений ольхи клейкой, произрастающих в местах с повышенной антропогенной нагрузкой, отмечается тенденция к изменениям в морфологии соцветий. Основными морфологическими признаками, свидетельствующими подверженности негативному влиянию на ольху, являются изменения окраски цветковых чешуй от бурой до темно-коричневой, а также редуцированность части цветков в соцветиях.

Исследования, проводимые по биоиндикации окружающей среды с использованием ольхи клейкой, показали восприимчивость ее репродуктивных органов к загрязнению атмосферы. В процессе работы выявлено следующее: в местах с повышенной антропогенной нагрузкой имеются существенные морфологические аномалии развития соцветий и пыльцевых зерен вплоть до лизиса содержимого (рис. 19 и 20).

При анализе морфологических отклонений вновь была обнаружена следующая общая закономерность: пыльцевые зерна, имеющие отклонения в строении, как правило, нежизнеспособны или маложизнеспособны.



а)

б

Рис. 19,- а) Пыльцевые зерна правильной формы; б) лизированные пыльцевые зерна ольхи клейкой.



а)



б)

Рис. 20. а) Соцветия ольхи клейкой правильной формы; б) деформированные соцветия ольхи клейкой

Береза повислая, как и ольха клейкая характеризуется достаточным распространением на территории РФ. Палинологические исследования с использованием березы повислой позволили получить достоверные результаты. Показатели жизнеспособности пыльцы березы повислой на разных стационарных площадках значительно варьируют в зависимости от качества атмосферного воздуха.

Итоги исследования жизнеспособности пыльцы березы повислой представляются графически (рис.21) или сводятся в таблицу и прослеживается динамика происходящих изменений.

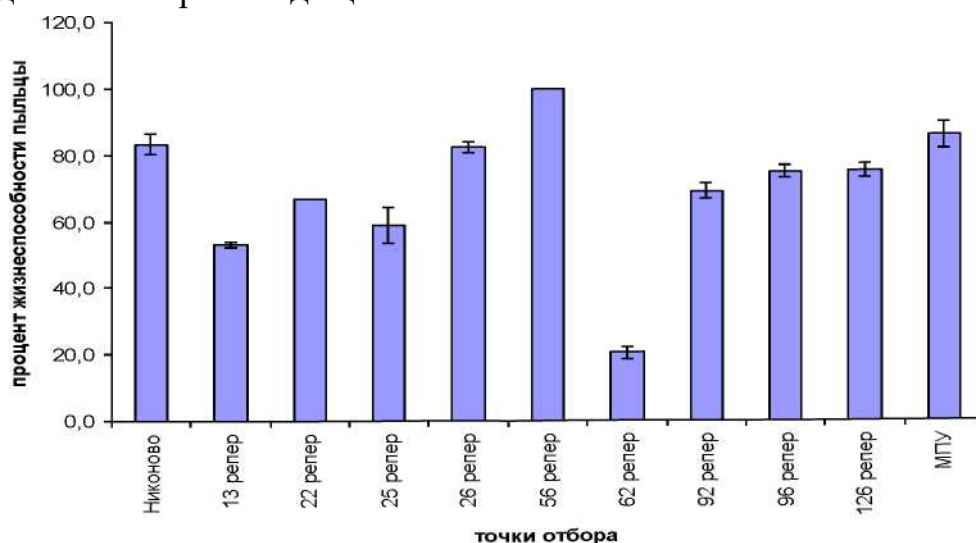
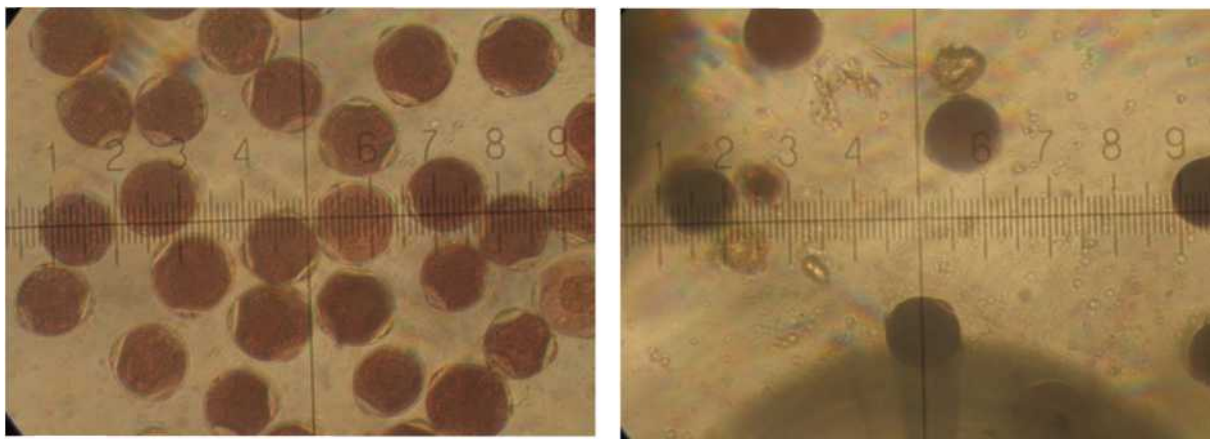


Рис. 21. Показатели жизнеспособности березы повислой на разных пробных площадках

Установлено, что качество окружающей среды влияет на генеративные органы березы повислой (рис. 22).

При анализе морфологических отклонений пыльцы березы повислой также была обнаружена следующая общая закономерность: пыльцевые зерна, имеющие отклонения в строении, как правило, нежизнеспособны или мажужизнеспособны.



a

б

Рис. 22- а) пыльца березы повислой правильной формы; б) пыльца березы повислой с морфологическими отклонениями

Таким образом, палинологические методы биоиндикации являются весьма перспективными для оценки качества природной среды в районах расположения опасных промышленных предприятий.

2.4. Использование индикаторных видов мелких грызунов

Среди возможных для использования в качестве тест-объектов особое место занимают мелкие теплокровные животные (грызуны), которые как биотесты в системе экологического мониторинга опасных промышленных объектов используются редко. Как правило, мелкие млекопитающие используются при проведении биоиндикации природной среды [12]. Однако, именно исследования на мелких грызунах по-

зволят получить результаты, наиболее точно отражающие воздействие загрязнения окружающей среды на организм человека, так как многие физиологические и биохимические процессы, протекающие в организме человека и этих животных, сходны.

Оперативными и достаточно простыми способами оценки загрязнения природной среды и токсичности продуктов деструкции химических отравляющих веществ ОУХО могут стать методы, основанные на измерении гематологических, биохимических и иммунологических показателей, как лабораторных мышей, так и отдельных представительных видов мелких грызунов. Среди них особую значимость имеют показатели антиоксидантной системы - перекисного окисления белков и липидов, показатели энергетического обмена, показатели белковообразующей и выделительной функции печени и почек, показатели иммунной системы. Важнейшим аргументом в пользу этих методов является то, что скорость размножения и процессы метаболизма у мышей и крыс в десятки раз выше, чем у человека. Это позволит делать достаточно быстро достоверные долгосрочные прогнозы по влиянию загрязняющих веществ в системах «токсикант - окружающая среда», «токсикант - живой организм», «доза - ответная реакция» для проведения природоохранных мер.

Экотоксикологические исследования предполагают комплексное использование гематологических, биохимических и иммунологических показателей, по которым можно выявить экологические нарушения при самых низких уровнях загрязнения, когда еще нет серьезной опасности для здоровья населения. Это даст возможность принять меры для предотвращения дальнейшего поступления загрязнителей в окружающую среду и не допустить необратимых изменений в экосистемах и ущерба здоровью человека.

Результаты экотоксикологических исследований индикаторных видов мелких грызунов должны иметь количественные показатели, а

выборка должна быть достаточной для оценки достоверности различий. Полученные результаты должны оформляться по формам, обеспечивающим возможность их включение в информационные базы данных.

Структура системы экотоксикологических исследований природных экосистем в районе расположения объекта включает следующие направления: организацию стационарных пунктов контроля (площадок); проведение полевых и лабораторных исследований; накопление и статистический анализ данных; выявление комплекса антропогенных воздействий; передачу данных мониторинга в специализированную экспертно-аналитическую систему для оценки и прогноза экологической ситуации.

Количество и расположение постоянных пробных площадок, в пределах которых проводится мониторинг животного мира, должно быть достаточным и статистически обоснованным для оценки состояния наиболее распространенных в данной местности индикаторных видов мелких грызунов.

Для экотоксикологических исследований выбираются 1-2 индикаторных вида. Индикаторные виды должны встречаться на большинстве пробных площадок или в радиусе 500 м от них.

Стационарные пробные площадки выбираются в соответствии с системой пробоотбора ГЭМ. Пробные площадки должны быть расположены по следующему принципу: граница СЗЗ, V_i радиуса ЗЗМ, граница ЗЗМ. Кроме того, одна контрольная площадка должна располагаться за пределами ЗЗМ, где полностью исключено влияние промышленных объектов. В случае отсутствия на площадках системы пробоотбора ГЭМ индикаторных видов возможен отбор проб биоматериала в радиусе до 500 м.

Для отлова живых мелких млекопитающих (грызунов, насекомоядных) применяют разного рода живоловки (сетчатые или ящичного типа), либо сооружают ловчие канавки или заборчики с вкопанными цилиндрами или конусами (последние менее трудоемки в установке). Мле-

копитающих средней величины (сусликов, крыс, пищух, мелких куньих и др.) отлавливают дуговыми капканами № 0 или 1, более крупных (сурков) - капканами № 2 или 3. Канавки и заборчики обходят утром и собирают из цилиндров пойманных зверьков. При использовании этого метода для определения численности носителей единицей учета служит число особей, попавших в среднем в один цилиндр за 10 дней работы канавки или заборчика (13,14).

Литература

1. Научно-методическое руководство по организации подсистемы биологического мониторинга природных сред и объектов в рамках государственного экологического контроля и мониторинга объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров. 2006.

2. Сапожников Д.И., Маслова Т.Г., Попова О.Ф., Попова И.А., Королева О.Я. Метод фиксации и хранения листьев для количественного определения пигментов пластид // Ботанический журнал, 1978. Т. 63. № 11. С.1586-1592.

3. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154-171.

4. Методические рекомендации по выполнению оценки качества среды по состоянию живых существ (оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур). М. МПР РФ. 2003. 24с. 5. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И. и др. Здоровье среды: методика оценки. - М., 2000,- 63с.

6. Воронов А.Г. Геоботаника. - Москва, Изд. «Высшая школа», 1973.- 384 с.

7. Ипатов В.С., Кирикова Л.А. Фитоценология. - СПб., 1999.-316 с.

8. Нешатаев Ю.Н. Методы анализа геоботанических материалов.- Л., 1987.-192 с.

9. Шенников А.П. Введение в геоботанику. Л., 1964.
10. Цыганов Д.Н. Фитоиндикация экологических режимов в подзоне хвойно-широколиственных лесов. М.:Наука, 1983. 198 с.
11. Экологический мониторинг: Учебно-методическое пособие/М.: Академический Проект, 2005. С. 149-151.
12. Катаев Г. Д. Роль мелких млекопитающих в биоиндикации природной среды Кольского Севера //Экотоксикология и охрана природы. М., 1988. С. 195-199.
13. Ларина Н.И., Голикова В.Л., Лебедева Л.А. Учебное пособие по методике полевых исследований экологии наземных позвоночных. Саратов, 1981. -136 с.
14. Новиков Г.А., 1949. Полевые исследования экологии наземных позвоночных животных. Москва: Советская наука. 601с.

Глава 3. БИОТЕСТИРОВАНИЕ И БИОИНДИКАЦИЯ КАЧЕСТВА ПРИРОДНЫХ СРЕД

3.1. Биотестирование и биоиндикация водной среды

Под биологическим методом исследования водных объектов понимается оценка состояния водоема по составу растительного и животного населения и тестам на токсичность. Водоем реагирует на загрязнения целым комплексом взаимосвязей биотической и абиотической среды. Поэтому при биологическом исследовании изучается водоем в целом - вода, дно, берега, а не только организмы, населяющие его. Преимуществом биологического метода наблюдения является возможность показать не только единовременное состояние водоема, но также предшествующие условия, в которых развились обнаруженные биоценозы, а также состояние водного объекта в ближайшей перспективе.

Организмы водоема относятся к планктону и бентосу, ряд из которых составляет перифитон (обрастание). Наиболее характерными для оценки загрязнения водоема являются бентос и обрастания. В состав биоценоза бентоса входят все формы растений и животных, которые своей жизнью тесно связаны с дном водоема. Организмы зообентоса принято разделять в зависимости от размеров и способов лова на макробентос, мезобентос и микробентос. Организмы обрастаний, поскольку они связаны с дном, также можно отнести к бентосу. Фитобентос представлен в водоеме макрофитами (высшая водная растительность) и микроводорослями (мелкие одноклеточные, нитчатые и колониальные низшие водоросли).

В планктон включаются животные и растения, которые проводят всю жизнь во взвешенном состоянии в толще воды. К фитопланктону принадлежат микроводоросли, к зоопланктону - животные.

При исследовании водного объекта биологическое обследование (микроскопирование живых проб) предшествует всем остальным определениям (химическим, гельминтологическим, бактериологическим, радиологическим и т.п.). На основании полученных результатов составляется план дальнейших работ.

Прежде чем приступить к работе по дальнейшему обследованию, необходимо иметь морфометрические сведения о водоеме, расходах воды, характере водосборной площади, расположении, наличии загрязненных территорий вдоль берегов водоема. Кроме того отмечается температура воды, прозрачность, наличие или отсутствие пленок на поверхности воды, запах, особенности цвета воды, наличие водной растительности - макрофитов, загрязнение берегов, заиленность дна и характер ила, пленки нефтепродуктов на дне, характер биологических обрастаний.

При обследовании отмечается также наличие макрофитов, фауны зарослей и перифитона на водных растениях.

В чистом и умеренно загрязненных водных объектах обрастания обычно состоят из бахромы зеленых или бурого налета диатомовых водорослей, а в загрязненных местах - из хлопьевидных белых или серых обрастаний нитчатых бактерий, грибов или инфузорий.

По степени густоты зарослей и внешнему виду судят о наличии вредных загрязнений, а по внешнему развитию - о присутствии биогенных веществ, о контурах распространения мягких илов. В образовании мягких илов участвуют высшие водные растения, создавая естественное или вторичное загрязнение водоема; или загрязнение, способствующее эвтрофикации, повышению образования в нем органического вещества Скопления гниющих растений, отлагающихся в глубоких местах реки с замедленным течением, вызывает загрязнение дна даже в водоемах, имеющих ресурс к самоочищению.

При исследовании обычно применяют следующие способы отбора проб:

Обрастания собираются скребком, переносятся в лабораторию в термосе с целью сохранения пробы в живом виде. В результате микроскопирования определяются виды, с учетом зоны сапробности, и частота встречаемости организмов.

Бентос. Организмы макробентоса собираются дночерпателем и промываются в сите для освобождения животных от грунта. Животных макробентоса учитывают в экземплярах или граммах биомассы на 1 м² площади

во-

доема.

Микробентос отбирают илососом или трубчатым дночерпателем. Микроскопируют в свежем виде, учитывая частоту встречаемости организмов. Отсутствие или бедность фауны микробентоса указывает на токсичность.

Зоопланктон концентрируют фильтрацией через планктонную сетку и фиксируют на месте 2%-ным раствором формальдегида. Организмы учитываются в количестве экземпляров на 1л воды, учитывая их по группам: простейшие, колвратки, ветвистоусые, веслоногие и пр. Если все виды определены, то определяется зона сапробности.

Фитопланктон. Проба воды, с добавленным формалином для фиксации, отфильтровывается через мембранный фильтр №6. Организмы просчитываются в счетной камере. Фитопланктон обычно учитывается только во время летнего вегетационного периода.

Для биологической индикации качества вод могут быть использованы практически все группы организмов, населяющие водоемы: планктонные и бентосные беспозвоночные, простейшие, водоросли, макрофиты, бактерии и рыбы [1-7]. Каждая из них, выступая в роли биологического индикатора, имеет свои преимущества и недостатки, которые определяют границы ее использования при решении задач биоиндикации, так как все эти группы играют ведущую роль в общем круговороте веществ в водоеме. Организмы, которые обычно используют в качестве биоиндикаторов, ответственны за самоочищение водоема, участвуют в создании первичной продукции, осуществляют трансформацию веществ и энергии в водных экосистемах. Всякое заключение по результатам биологического исследования строится на основании совокупности всех полученных данных, а не на основании единичных находок индикаторных организмов. Как при выполнении исследования, так и при оценке полученных результатов необходимо иметь в виду возможность случайных, местных загрязнений в точке наблюдения. Например, разлагающиеся растительные остатки, труп ля-

гушки или рыбы могут вызывать местные изменения в характере населения водоема.

Известно, что качество воды, ее биологическая полноценность в значительной мере определяются состоянием гидробиоценозов. Экосистемы пресных водоемов являются весьма уязвимыми объектами природной среды. В результате сброса биогенов, термофикации, токсификации и ряда других антропогенных воздействий происходит экстремизация водных экосистем, обуславливающая их структурно-функциональное упрощение и утрату биосферных функций.

Осуществление гидробиологического мониторинга позволяет получить интегративную оценку загрязнения водоемов, выявить отклик водных экосистем на техногенное воздействие.

Однако, по мнению большинства специалистов-гидробиологов, в преобладающем числе водоемов наиболее четко отражают степень загрязнения организмы зообентоса и их сообщества.

Наиболее разработанной оценкой степени загрязненности вод по индикаторным организмам является *система сапробности*.

Зона сапробности. Под сапробностью понимается степень распада органических веществ в загрязненных водах. Зоны сапробности - это зоны различной степени разложения органического вещества (Табл. 3). Распад органических загрязнений в водоеме приводит к усиленному потреблению кислорода и накоплению ядовитых продуктов распада (углекислота, сероводород, органические кислоты и др.). Способность организмов обитать в условиях разной степени сапробности объясняется потребностью их в органическом питании и выносливостью к вредным веществам, образующимся в процессе разложения органического вещества. Микроорганизмы, обитающие в водном объекте являются индикаторами загрязнения, или различных ступеней разложения органических веществ.

В водоеме сапробность развивается в двух противоположных направлениях. Первое - от чистого к загрязненному: олиго-сапробность —► бета - мезосапробность —► альфа-мезосапробность —► чюлисапробность, которые принято обозначать О —► рт —► шп —► р. Второе - в обратном

направ-

лении от загрязненного водного объекта к чистому $p \rightarrow \text{шп} \rightarrow \text{рт} \rightarrow O$

-

показатель процессов самоочищения.

Таблица 3 . Основная характеристика зон сапробности

Показатель	полисапробная	альфа-мезосапробная	бета-мезосапробная	олиго-сапробная
Кислородные условия	Анаэробные	Полуанаэробные	Аэробные	
Азотистые соединения	Белковые вещества	Аммиак, аминокислоты	Аммонийные соли, нитриты, нитраты	Нитраты
Сероводород	Много *	Порядочно	Мало	Нет
Загниваемость	Загнивает		Не загнивает	
Содержание бактерий в 1 мл воды	Сотни тысяч, миллионы	Сотни тысяч	Десятки тысяч	Сотни, десятки
Преобладание отдельных видов	Очень сильное	Сильное	Слабое	Обычно слабое
Разнообразие видов	Очень малое	Небольшое	Значительное	Очень большое
Количественное богатство форм	Часто высокое или низкое	Очень высокое	»	Невысокое
Смена сообществ	Катастрофическая	Часто катастрофическая	Довольно медленная	
Потребность организмов в кислороде	Ничтожная	Слабая	Большая	Очень большая
Главные группы организмов	Бактерии, бесцветные жгутиковые, серные бактерии, инфузории	Грибы, бактерии, инфузории, сине-зеленые водоросли, зеленые жгутиковые	Сине-зеленые водоросли, диатомовые водоросли, зеленые жгутиковые, инфузории, колониальные, ракообразные, рыбы	Зеленые водоросли, диатомовые водоросли, перидини, хризомонады, колониальные, ракообразные; рыбы

Зообентос представлен донными беспозвоночными животными, которые полностью или часть жизненного цикла проводят в воде и участвуют практически во всех пищевых цепях внутри водоема. Большинство представителей донных макробеспозвоночных имеет продолжительный жизненный цикл - несколько месяцев и лет, поэтому их сообщества аккумулируют изменения условий существования в течение достаточно длительных периодов.

Бентофауна определенного участка водоема является надежным индикатором долговременных процессов трансформации водных экосистем под влиянием антропогенного фактора. При этом изменения, которые происходят в донных биоценозах, отражают характер и степень загрязнения, как водных масс, так и грунта.

Показатели зообентоса входят в качестве основных элементов в программу гидробиологических наблюдений, проведение которой определено ГОСТом 17.1.3.07-82 «Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков» [8].

В состав бентофауны входят виды водных беспозвоночных, обладающих повышенной чувствительностью к веществам антихолинэстеразного действия (ракообразные рода *Gammarus*, *Asellus aquaticus*, пиявки рода *Eg-pobdella*).

В качестве основных контролируемых показателей используются следующие структурные характеристики бентоценозов:

- общая численность (N , экз./м²);
- общая биомасса (B , г/м²); общее число видов;
- численность и биомасса основных групп макрозообентоса;
- массовые виды - индикаторы сапробности;
- биоиндикационные показатели: (биотический индекс Вудивисса, олигохетный индекс, индекс Балускиной и др.);
- индекс видового разнообразия Шеннона

Индекс Вудивисса учитывает сразу два параметра бентосного сообщества: общее разнообразие беспозвоночных и наличие в водоеме организмов, принадлежащих к "индикаторным" группам [9,10]. При повышении степени загрязненности водоема представители этих групп исчезают из него примерно в том порядке, в каком они приведены в таблице 4.

Индекс используется только для исследования рек умеренного пояса и дает оценку их состояния по пятнадцати балльной шкале. Методика непригодна для оценки состояния озер и прудов. Для оценки состояния водоема по методу Вудивисса нужно:

1. Выяснить, какие индикаторные группы имеются в исследуемом водоеме. Поиск начинают с наиболее чувствительных к загрязнению индикаторных групп: веснянок, затем поденок, ручейников и т.д. - именно в таком порядке индикаторные группы расположены в таблице 4. Если в исследуемом водоеме имеются личинки веснянок (*Plecoptera*) - самые "чуткие" организмы, то дальнейшая работа ведется по первой или второй строке таблицы. По первой - если найдено несколько видов веснянок, и по второй - если найден только один. Если нимф веснянок в наших пробах нет - ищем в них личинок поденок (*Ephemeroptera*) - это следующая по чувствительности индикаторная группа. Если они найдены, работаем с третьей или четвертой строкой таблицы (опять же по количеству найденных видов). При отсутствии нимф поденок обращаем внимание на наличие личинок ручейников (*Trichoptera*), и т.д.

2. Оценить общее разнообразие бентосных организмов. Методика Вудивисса не требует определить всех пойманных животных с точностью до вида. Достаточно определить количество обнаруженных в пробах "групп" бентосных организмов. За "группу" принимается:

- любой вид плоских червей, моллюсков, пиявок, ракообразных, водяных клещей;

- любой вид веснянок, жуков, любой вид личинок других летающих насекомых;

- класс малощетинковые черви;
- любой род поденок кроме *Baetis rhodani*;
- любое семейство ручейников;
- семейство комаров-звонцов (личинки) кроме вида *Chironomus sp.*;
- личинки мошки (семейство *Simuliidae*).

Определив количество обнаруженных в пробе групп, находят соответствующий столбец таблицы 4.

Таблица 4 - Биотический индекс Вудивисса (пример)

Наличие видов-индикаторов	Количество видов-индикаторов	Общее количество присутствующих групп бейтосных организмов					
		0-1	2-5	6 - 10	11 - 15	16 - 20	более 20
Личинки веснянок (Plecoptera)	более 1 1 вид	- -	7 6	8 7	9 8	10 9	11 10 - ...
Личинки поденок (Ephemeroptera)*	более 1 1 вид	- -	6 5	7 6	8 7	9 8	10 - ... 9 - ...
Личинки ручейников (Trichoptera)	более 1 1 вид	- 4	5 4	6 5	7 6	8 7	9 - ... 8 - ...
Gammarus sp.		3	4	5	6	7	8 - ...
Водяной ослик (Asellus aquaticus)		2	3	4	5	6	7 - ...
Олигохеты или личинки звонцов		1	2	3	4	5	6 - ...
Отсутствуют все приведенные выше группы		0	1	2	-	-	-

*- кроме вида *Baetis rhodani*

3. На перекрестке столбца и строки в таблице находят значение индекса Вудивисса, характеризующее исследуемый водоем.

Если водоем получает от 0 до 2 баллов - он сильно загрязнен, относится к полисапробной зоне, водное сообщество находится в сильно угнетенном состоянии. Оценка 3-5 баллов говорит о средней степени загрязненности (альфа-мезосапробный), а 6-7 баллов - о незначительном загрязнении водоема (бета-мезосапробный). Чистые (олигосапробные) реки обычно получают оценку 8-10 баллов, а особенно богатые водными обитателями участки могут быть оценены и более высокими значениями индекса.

Индекс Майера - более простая методика, основные преимущества которой: никаких беспозвоночных не нужно определять с точностью до ви-

да; методика годиться для любых типов водоемов. Метод использует приуроченность различных групп водных беспозвоночных к водоемам с определенным уровнем загрязненности (таблица 5). Организмы-индикаторы отнесены к одному из трех разделов:

Таблица 5 - Индекс Майера

Обитатели чистых вод	Организмы средней степени чувствительности	Обитатели загрязненных водоемов
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 индикаторных групп обнаружены в пробах. Количество обнаруженных групп из первого раздела таблицы 5 необходимо умножить на 3, количество групп из второго раздела - на 2, а из третьего - на 1. Получившиеся цифры складывают. Значение суммы и характеризует степень загрязненности водоема.

Если сумма более 22 - вода относится к 1 классу качества. Значения суммы от 17 до 21 говорят о втором классе качества (как и в первом случае, водоем будет охарактеризован как олигосапробный). От 11 до 16 баллов - 3 класс качества (бета-мезосапробная зона). Все значения меньше 11 характеризуют водоем как грязный (альфа-мезосапробный или же полисапробный).

Для оценки качества воды используют также ВПК - биохимическое потребление кислорода. Это показатель качества воды, характеризующий суммарное содержание в воде легко окисляемых органических веществ. ВПК определяют измерением количества кислорода, ушедшего на окисление этих веществ в ходе биохимических процессов за определенное время (ВПК₅ - за 5 суток). СоН-индекс - также один из показателей бактериального загрязнения воды, характеризующий наличие в ней кишечных палочек.

В настоящее время разработано большое количество биотестов для оценки качества воды, использующих в качестве тест-организмов разнообразных гидробионтов, таких как простейшие (инфузории, жгутиконосцы), кишечнополостные (гидры), черви (планарии, пиявки), моллюски (пластинчатожаберные, брюхоногие), ракообразные (дафнии, гаммарусы) и рыбы. Методы, использующие в качестве тест-объектов инфузорий основаны на оценке степени их спонтанной двигательной активности, выживаемости в остром опыте (15-60 мин.) или степени прироста их численности в хроническом 96-часовом опыте [11-14]. Исследуемую воду считают токсичной в случае снижения двигательной активности, выживаемости или прироста численности инфузорий по сравнению с контролем. Достоинствами указанных методов являются их относительная экспрессность (в среднем 1-4 суток) и надежность оценки, обусловленная однородностью указанных тест-организмов, поскольку последние, как правило, представляют собой разводимые в лабораториях культуры. Однако эти методы обладают и рядом недостатков, так как в связи с физиологическими особенностями простейших одноклеточных организмов их чувствительность ко многим факторам внешней среды, в том числе и некоторым токсикантам, крайне специфична и в целом ряде случаев не сопоставима с чувствительностью многоклеточных животных. Например, величины критических концентраций тяжелых металлов для инфузорий на несколько порядков ниже, а нитратов, нитритов и аммиака - на несколько порядков выше ПДК, установленных для позвоночных животных и человека [15, 16]. Все это существенно ограничивает возможности и соответственно применимость биотестов с простейшими. Указанные методы целесообразно использовать для индикации (выявления) в воде малых концентраций тяжелых металлов, но не для оценки общей токсичности загрязненных вод в отношении высших животных и человека.

Проводилась сравнительная оценка методов биотестирования речных и очищенных вод на цериодафниях, инфузориях, водорослях и лио-

филизированных мутантных бактериях *E. coli* [17]. Установлено, что наиболее пригодными для целей биотестирования являются методы с использованием цериодафний и инфузорий. Метод с использованием бактерий, показавший наименьшую чувствительность и сходимость результатов не может быть рекомендован для анализа очищенной воды станции аэрации и речной воды. Использование в качестве биотеста водорослей показало хорошую сходимость результатов с опытами на цериодафниях: совпадение тест-реакции для неразбавленной воды наблюдалось в семи случаях из восьми, а с учетом разбавлений совпадение составило 79% из 24-х определений. Однако часто наблюдался эффект стимуляции роста водорослей (в 14-ти случаях из 24-х), который был связан с высоким содержанием биогенных элементов в речной и очищенной воде. Наличие данного эффекта искажало результаты анализов, что позволило признать этот метод мало-приемлемым для оценки вод высокой сапробности.

Дафнии, по сравнению с моллюсками (прудовик) и позвоночными (рыбы, гуппи), более чувствительны к токсическим компонентам сточных вод [18]. Биотесты с применением пиявок основаны на регистрации изменения статических поз молодых животных после их 15 - 20 мин. пребывания в тестируемой воде [19, 20]. О наличии токсичности судят по уменьшению количества естественных статических поз у подопытных пиявок по сравнению с контрольными и по переходу их к динамическому состоянию (ползание, плавание, уход из токсической зоны). При возникновении динамических реакций дальнейшее пребывание пиявок в загрязненной воде приводит к развитию у них интоксикации и гибели через несколько часов или суток. Данные методы характеризуются повышенной экспрессностью (20 мин.) и простотой в исполнении, но, по существу, устанавливают только наличие или отсутствие острой токсичности исследуемой воды для определенных видов пиявок. Учитывая, что чувствительность этих методов к ряду токсикантов (тяжелые металлы, пестициды) не превышает 10-20 ПДК, указанные био-

тесты могут использоваться только в качестве сигнальных методов при плановом контроле сточных вод, загрязненных ограниченным кругом токси- кантов и к тому же в достаточно высоких концентрациях.

Другие способы биологической оценки токсичности вод основаны на регистрации закрытия створок раковин двустворчатых моллюсков при пропускании загрязненной воды через резервуары с моллюсками [21 - 24]. Показателем токсичности воды считают увеличение относительного числа моллюсков с закрытыми створками до 70% и более. Некоторые из данных методов автоматизированы. К их недостаткам относятся невысокая чувст- вительность и ненадежность, связанные с неоднозначностью реакций ис- пользуемых тест-организмов на разные виды токсикантов и тем более на их смеси, что затрудняет трактовку полученных в результате биотестирования данных. Поэтому указанные методы целесообразно применять для индика- ции сточных вод на протоке и только в комплексе с другими методами.

При биотестировании с помощью брюхоногих моллюсков в основ- ном используют прудовиков, а также лужанку и катушку, взятых из при- родных водоемов [25 - 28]. Оценку токсичности водной среды производят чаще всего в хронических опытах (5 - 60 дней) по изменению двигательной активности моллюсков, интенсивности их питания, размножения, плодови- тости или выживаемости. Методы требуют длительного, трудоемкого отбо- ра подопытных животных, включающего 10-30 дневную адаптацию их к лабораторным условиям и предварительную калибровку степени устойчи- вости и чувствительности моллюсков к эталонному токсиканту. В результа- те токсичность исследуемой воды оценивается по сравнению с эталонным токсикантом без учета возможной специфики действия токсических ве- ществ других классов. Биотесты с использованием взятых из природных водоемов брюхоногих моллюсков используют при установлении ПДКт ры- бохозяйственных водоемов и для целей мониторинга [28].

Биотесты, в которых в качестве тест-организмов используют раз- личные виды ветвистоусых рачков дафний основаны на оценке изменений

определенного набора таких форм поведения, как кувыркание, скучивание, равномерное распределение в заданном объеме [29], или физиологического состояния (изменение дыхательных ритмов, сердцебиения, окраски тела, абортации яиц и зародышей и т. п.) [30 - 32], двигательной активности (изменения частоты движения эпилеподитов) [33] либо выживаемости и плодовитости [34 - 37] при помещении в тестируемую воду. О токсичности воды судят по достоверному изменению по сравнению с контролем одного - двух из регистрируемых параметров. Некоторые из методов частично автоматизированы. Среди них есть как хронические (2-10 сут.) [31, 36], так и экспрессные биотесты, занимающие несколько часов [32,33]. На основании результатов хронических и острых экспериментов с *D. magna* можно оценить общую токсичность тестируемой воды по специальным трех- или пятибалльным шкалам и провести сравнение токсичности вод с различным составом загрязнителей, а также определить необходимое разбавление сточных вод. Биотесты с дафниями рекомендуется применять для контроля сточных вод в установленном режиме и выявления потенциально опасных источников загрязнения водных объектов токсическими веществами [38]. В настоящее время тесты с дафниями наиболее распространены, что обусловлено простотой культивирования этих рачков и их незначительными размерами, которые позволяют работать с относительно небольшими по объему пробами воды [39].

В странах ЕЭС принят стандарт на биотестирование сточных вод и определение токсичности отдельных веществ с помощью - *D. magna* [40]. По существу этот метод сводится к установлению ЕС50 (48 и 24 ч) тестируемого вещества для данного вида дафний. Методы с использованием дафний позволяют сравнивать токсичность вод, содержащих разнообразные загрязнители, однако, в связи с разведением в разных лабораториях неодинаковых клонов дафний они дают значительный разброс результатов, достигающий 35% и более [37,40]. Таким образом, несмотря на ряд достоинств, биотесты с дафниями не могут претендовать на универсальность и унифицированность. Желательно

их использование в комплексе с другими биологическими и гидрохимическими методами. В международном стандарте на биотест с дафниями особо оговаривается применимость его результатов только в отношении *D. magna*.

Существует большая группа биотестов, основанных на использовании поведенческих и физиологических реакций рыб. Первые экспресс-методы оценки токсичности воды на протоке с помощью рыб были разработаны и стали применяться на производствах с начала века [41, 42], многие из них стали уже классическими. Метод рыбной пробы заключается в том, что в резервуар с исследуемой проточной водой помещают 2-3 вида рыб, обладающих разной чувствительностью к токсикантам. По изменениям их физиологических и поведенческих реакций или гибели судят о появлении токсикантов. В дальнейшем метод видоизменялся и усовершенствовался рядом авторов [43, 44 - 50]. В нашей стране методы с использованием рыб рассматриваются как перспективные. С целью повышения чувствительности созданы новые биотесты, основанные на регистрации поведенческих реакций и устанавливающие токсичность воды по реакции ухода рыб из опасной зоны [42,44,45, 48, 49] или изменению их дыхательного ритма и сердцебиения [46, 47, 50]. Рекомендовано проводить биотесты на ограниченном числе видов, таких как речной окунь, гольян и карп [38]. В США и Великобритании несколько методов с использованием рыб стандартизировано и широко применяется для контроля острой токсичности сточных вод и определения необходимого их разбавления [43, 51]. Однако в большинстве методов рыбной пробы, включая и стандартизированные, не оговаривается обязательное использование конкретных видов рыб, их размера, возраста. Тест-организмы берутся из разных водоемов, популяций, и поэтому всякий раз обладают неизвестной до опыта чувствительностью и резистентностью к токсикантам. Все это существенно снижает точность и чувствительность биотестов и затрудняет интерпретацию полученных данных. В этой связи в стандарте США указано, что результаты биотестирования методом рыбной

пробы корректны только в отношении непосредственно используемых в каждом конкретном опыте рыб [51].

Как видно из приведенных материалов, большая часть разработанных в нашей стране и за рубежом биотестов не обладает высокой надежностью и чувствительностью и не может использоваться на водах с широким диапазоном токсичности. Существенным препятствием для широкого применения биологических методов определения общей токсичности вод разного целевого назначения является также и сложность интерпретации полученных данных и вследствие этого использование в каждом биотесте для оценки качества тестируемой воды новых, несравнимых друг с другом условных единиц.

Неодинаковая чувствительность и резистентность гидробионтов разных видов не позволяет в настоящее время в рамках существующего к биотестированию подхода решить проблему переноса результатов, полученных на каком-либо одном тест-организме, на другие виды гидробионтов и тем более на высших животных и на человека.

Для решения этой проблемы в ряде случаев используют методы биотестирования с несколькими тест-организмами [41,45,52,53]. Чаще всего в этих биотестах применяют следующий набор гидробионтов: аквариумные рыбки гуппи *Poecilia reticulata*, моллюск из семейства прудовиков и рачки дафнии. При установлении степени токсичности воды рассматривают 50%-ную гибель животных каждого из трех видов. При этом если гибнут 50% животных одного вида, то определяют слабую токсичность, если всех трех видов - то сильную. Такие методы могут быть рекомендованы как сигнальные методы для постоянного проточного биотестирования стоков и для экологического мониторинга как в лабораторных, так и в полевых условиях [52, 53]. Однако проблему интерпретации полученных данных они решить не могут, поскольку с целью уточнения результатов пришлось бы неограниченно увеличивать число используемых в опыте видов животных. В связи со всем вышесказанным очевидна необходимость разработки и внедрения в

практику новых, унифицированных биотестов с гидробионтами, характеризующихся повышенной надежностью и диапазоном применимости, результаты которых представляли бы собой простые цифровые значения, понятные не только специалистам и позволяющие делать выводы о степени токсичности исследуемой воды для высших животных и человека. Возможность создания унифицированных биотестов, позволяющих давать оценку общей токсичности воды, обеспечивается тем, что вызванное действием различных токсикантов патологическое состояние организма зависит от интенсивности неспецифической стрессовой реакции. Стереотипность развития этой реакции у достаточно высокоорганизованных животных предопределяет значительное единообразие их реагирования на действия токсикантов различной природы, что позволяет оценивать общую токсичность загрязненных вод с помощью универсальных (интегрирующих) критериев, устанавливаемых в соответствии тех или иных тест-функций. Основные недостатки имеющихся в настоящее время биотестов связаны, прежде всего, с отсутствием научного подхода к их разработке. Выбор тест-организмов и тест-функций носит в основном случайный характер и часто не соответствует решаемым задачам. Создание новых биотестов, отвечающих современным требованиям, невозможно без научного подхода к биотестированию, учитывающего как физиологические закономерности и особенности важнейших адаптационных процессов, так и поведенческие, физиологические и экологические особенности применяемых в качестве тест-организмов гидробионтов.

По целям биологические методы определения токсичности вод можно разделить на две большие группы: универсальные методы оценки общей токсичности вод и методы индикации в воде определенных загрязнителей, например фенолов, ряда тяжелых металлов и т. п.

Цели, стоящие перед будущим биологическим методом должны являться главным фактором, определяющим методологию его разработки, выбор оптимальных тест-организмов и тест-функций. Так, биологические ме-

тоды оценки общей токсичности воды целесообразно строить на данных, характеризующих интенсивность развития стрессовой реакции. В биотестах, рассчитанных на установленное наличие в воде конкретных загрязнителей, токсичность лучше оценивать по изменению параметров функционирования какого-либо специфически чувствительного к воздействию определяемого токсиканта органа, ткани, или системы органов тест-организма, так называемой «мишени». В этом случае в качестве тест-организма может выступать любой биологический объект, обладающий достаточно чувствительной «мишенью», важно только, чтобы реакция этой «мишени» была легко регистрируемой, не маскировалась изменениями, происходящими в других анатомо-физиологических системах организма. Этого легче всего достичь, используя в качестве тест-организмов относительно просто организованных гидробионтов, таких как простейшие (инфузории), плоские черви, мшанки и т.п. Например, инфузории удобно использовать для выявления в воде тяжелых металлов, причем даже в очень низких концентрациях.

Стратегия выбора оптимального тест-организма для определения общей токсичности воды должна основываться на том, что общая токсичность может быть установлена только в соответствии с изменением функционального состояния всего организма, которое определяется характером взаимодействия его основных анатомо-физиологических систем. Из этого следует, что для определения общей токсичности может быть использован только такой тест-организм, который обладает теми же основными системами, нарушение функционирования которых могут приводить к развитию стресса, как и у организмов, на которых предполагается распространять результаты тестирования. Например, если необходимо установить общую токсичность вод хозяйственно-питьевого назначения, иначе говоря, результаты биотестирования должны быть распространены на человека и сельскохозяйственных животных, то в качестве тест-организмов нецелесообразно использовать таких низкоорганизованных животных, как кишечнополостные, мшанки, плоские черви, и тем более не допустимо применение простейших и бак-

терий. Многие гидробионты, относящиеся к позвоночным также не могут служить в качестве оптимальных тест-организмов для оценки общей токсичности вод, хотя их организация наиболее близка к организации высших животных и человека. Причина нежелательности использования позвоночных животных в качестве тест-организмов состоит в том, что у них в лабораторных условиях возникает сильный стресс на проводимые с ними операции, что может маскировать их реакции на оцениваемый токсикологический фактор и соответственно приводить к снижению точности и достоверности получаемых результатов. Прежде всего, это относится к рыбам, взятым из природных популяций. В стандарте США прямо сказано, что до начала проведения биотестирования с помощью рыб необходима длительная (не менее 10 дней) адаптация их в экспериментальных условиях. Более того, рыб рекомендуется использовать для тестирования лишь после того, как их смертность в отобранной группе не будет превышать 10% в течение 4-х дней, непосредственно предшествующих тестированию [51]. Поэтому биотесты [38,43,54], предусматривающие рассаживание отдельных особей таких стайных и высокоподвижных рыб, как окунь, гольян, форель в небольшие изолированные камеры, где их способность к адаптации в условиях эксперимента еще более снижается, представляются неперспективными. В этой связи, считают, что малоперспективными являются также методы, описанные в работах [19,20,55,56], в основе которых лежит определение общей токсичности воды, на фоне специально вводимых с целями повышения чувствительности метода или его ускорения повреждающих факторов - повышенной температуры, гипоксии, голодания, заражения гельминтами и т.п. Дополнительное введение неподдающихся строгому учету повреждающих факторов должно снизить воспроизводимость и достоверность получаемых в результате тестирования данных [57]. Наиболее перспективными тест-организмами для оценки общей токсичности воды являются обитающие в водной среде высшие беспозвоночные животные - моллюски, членистоногие и т.п. Они обладают всеми основными, характерными для высших жи-

вотных анатомо-физиологическими системами и в то же время легче и без существенных стрессовых реакций приспосабливаются к условиям экспериментов [58]. Известно принципиальное сходство процессов индивидуальной фенотипической адаптации у всех достаточно эволюционно продвинутых первично- и вторичноротых животных [16, 59 - 63], а также общие принципы организации выполняющих у них аналогичные функции тканей и органов [64] позволяют решить проблему переноса данных, полученных при биотестировании с помощью беспозвоночных на высших позвоночных и человека.

В качестве примера оптимального биотеста можно привести универсальный экспресс - метод оценки общей токсичности вод - «бегущая улитка» [65]. В указанном методе в качестве тест-организма используют чистую линию разводимых в лабораторных «экологически чистых» условиях тропических брюхоногих моллюсков. Степень токсичности вод оценивают путем количественной регистрации изменения интенсивности и степени реализации ориентировочного, поискового пищевого и оборонительного поведения, а также спонтанной локомоторной активности и частоты дыхательных актов тест-организма, причем, анализ поведенческих реакций осуществляют как в фазе первичной реакции, так и в фазе акклимации. Высокую токсичность вод (свыше 10 ПДК_x) определяют через один час после начала тестирования, окончательные результаты представляют спустя 72 ч.

В отличие от других способов биотестирования общей токсичности воды метод «бегущая улитка» обладает повышенной надежностью и позволяет оценить общую токсичность водопроводной, природной и сточной вод по оригинальным 8-балльным шкалам, находящимся в соответствии с принятыми для этих вод нормативами или ПДК по основным классам токси-кантов.

Для экспертной оценки качества воды утверждены следующие методики биотестирования:

1. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек по водорослям Ф Р 1. 39. 2001. 00284 [66].

2. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. ПНД ФТ 14. 1: 2: 3: 4-2000 [67].

3. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. Ф.Р. 1. 39. 2001. 00283 [68].

4. Методика определения токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий. ПНД ФТ 14. 1: 2: 3: 4. 2 - 98 [69].

5. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». МПР РФ.— М.: 2004. 16 с. [70].

Условия проведения биотестирования изложены в ряде методических рекомендаций [71, 72]. Острую токсичность воды с помощью вышеперечисленных методик можно определить в течение 96 часов, а хроническую токсичность в течение 24 суток. Экспресс - метод определения токсичности с помощью прибора Биотестер-2 позволяет определить токсичность воды в течение двух часов.

Разработана и запатентована методика определения содержания фитотоксических веществ в водных растворах [73]. Методика может быть использована для оперативного контроля за токсичностью природных и сточных вод, а также в аналитических и контрольно-токсикологических лабораториях для обнаружения и последующего определения содержания химических веществ, обладающих фитотоксической активностью. Регистрируют амплитуду индукционного максимума замедленной флуоресценции водоросли хлореллы в миллисекундном интервале затухания при возбуждении светом сначала высокой (50-100 Вт/м), а затем низкой (5-10 Вт/м) интенсивностью. В качестве показателя фитотоксичности используют отношение регистрируемых величин замедленной флуоресценции в указанных услови-

ях, пронормированных к контрольной пробе водоросли, не содержащей токсиканта.

Степень загрязненности пресноводных водоемов можно оценить с помощью нового метода биотестирования - по содержанию белков металло-тионеинов в органах и тканях двустворчатых моллюсков [74].

Сотрудниками Экологического центра Министерства обороны РФ разработана методика биоиндикации загрязнения водной среды [75]. Принцип методики - визуальное определение состояния биоиндикаторов (видового состава моллюсков) поверхностных вод на загрязненных территориях и сравнение полученных данных с данными контрольных (фоновых участков) местности.

В экспериментах по изучению вариабельности интегрального биохимического индекса у рыб под влиянием техногенных вод горно-обогатительного комбината установлено, что процентная доля биохимических признаков, выходящих за крайние значения нормы - прямо пропорциональна концентрации действующего загрязнителя [76].

Установлено, что периферическую кровь лягушек рода *Rana* (количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу) можно использовать как тест-систему для оценки загрязненности воды пестицидами, предварительно определив эти показатели у контрольных животных из чистого водоема [77].

Под влиянием даже слабого негативного воздействия со стороны окружающей среды, пути развития организма несколько отклоняются от генетически детерминированной траектории, вследствие чего возникает флуктуирующая асимметрия. Так, при оценке состояния природных популяций озерной лягушки в районе интенсивного химического загрязнения обнаружили высокий уровень флуктуирующей асимметрии и цитогенетических повреждений [78].

Активности кислой и щелочной фосфатаз, а также пероксидазы растений могут повышаться при загрязнении воды тяжелыми металлами [79, 80].

Водные растения, относящиеся к семейству рясковых, используются в качестве биоиндикаторов, так как они широко распространены и обладают высокой чувствительностью к загрязнению водной среды. При биотестировании загрязнения воды с помощью ряски малой, используют следующие показатели: количество листецов, количество растений, длина корней, диаметр листецов, торможение фототаксиса хлоропластов [81, 82].

3.2. Биотестирование и биоиндикация загрязнений почв

Почва является местом обитания многочисленных организмов и питательной средой для растительных сообществ.

Оценка состояния почв биоиндикационными методами представляет собой систему наблюдения за индикаторными сообществами, т.е. проведение анализа их состава и структуры, распространения растений-индикаторов или определенных индикационных признаков у отдельных видов растений, а также процессов происходящих в местах их обитания. Кроме того, немаловажным фактором определения состояния почв являются популяции различных организмов, населяющих ее.

В исследовании динамики качества почв широко распространены фитоиндикационные методы. Например, путем анализа растительного сообщества можно установить качественный состав почвы, ее механический и химический состав.

Каждый вид в пределах своего ареала встречается только в тех местообитаниях, которые обеспечивают полный комплекс необходимых для проявления жизнедеятельности условий.

М.С.Гиляровым в 1949 г. было сформулировано представление об «экологическом стандарте» вида — потребности вида в определенном комплексе условий среды. На этой основе получил развитие почвенно-зоологический метод биоиндикации.

Для биоиндикации используется метод исследования всего комплекса организмов, из которых одни могут быть индикаторами на влаж-

ность, другие — на температуру, третьи — на химический или механический состав. Чем больше общих видов почвенных животных встречается на сравниваемых участках, тем с большей долей вероятности можно судить о сходстве их режимов, а, следовательно, о единстве почвообразовательного процесса.

Наиболее хорошо изучены индикаторные свойства панцирных клещей. Состав их комплексов сообществ зависит не только от почвенных условий, но и от характера и флористического состава растительности, поэтому данный объект перспективно использовать для индикации повреждающих воздействий на почву.

Особенно ценны и удобны для индикационных работ сообщества крупных беспозвоночных (дождевые черви, многоножки, личинки насекомых). Например, стафилиниды рода *Bledius* и чернотелки рода *Belopus* показательны для солончаково-солонцовых почв; многоножки-кивсяки, некоторые мокрецы и легочные моллюски служат индикаторами содержания в почве извести. Дождевые черви *Octolasion lacteum* и некоторые виды проволочников являются показателями высокого содержания кальция в грунтовых водах.

Интерес представляет почвенно-альгологическая диагностика, в основе которой лежит положение о том, что зональности почв и растительности соответствует зональность водорослевых группировок. Она проявляется в общем видовом составе и комплексе доминантных видов водорослей, наличии специфических видов, характере распространения по почвенному профилю, преобладании определенных жизненных форм.

Микробиологическая и биохимическая характеристика почв — наиболее сложные разделы почвенной биодиагностики. Микроорганизмы — очень чуткие индикаторы, резко реагирующие на различные изменения в среде. Отсюда необычайная динамичность микробиологических показателей. Почва характеризуется не только составом и численностью разных групп биоты, но и их суммарной активностью, а также активностью био-

химических процессов, обусловленных наличием определенного пула ферментов, выделенных в результате жизнедеятельности растений, животных и микроорганизмов, а также аккумулярованных почвой после разрушения клеток. Показателями биологической активности почв, применяемых в биоиндикации, могут служить количественные характери-

ки численности и биомассы разных групп почвенной биоты, их общая продуктивность, некоторые энергетические данные, активность основных процессов, связанных с круговоротом элементов, ферментативная активность почв, а также количество и скорость накопления некоторых продуктов жизнедеятельности почвообитающих организмов.

Для определения размеров микробной биомассы и продуктивности используют не только прямые подсчеты числа клеток, но и косвенные методы — биохимические и физиологические. Например, биомассу водорослей предложено определять по количеству хлорофилла, бактерий — по специфической для прокариот мурамовой кислоте, грибов — по хитину, который входит в состав их клеточной стенки. Микробную активность в почве определяют также по уровню АТФ и полифосфатов, содержанию ДНК, РНК и аминокислот

Наиболее общими являются методы, позволяющие оценить суммарные биологические процессы по исходным или конечным продуктам: методы определения дыхания почвы по поглощению O_2 или выделению CO_2 ; учет активности азотфиксации по восстановлению ацетилена; микрокалориметрические измерения для установления уровня термостойкости; аппликационные методы с применением специальных материалов (целлюлозы, хроматографической бумаги, целлофана) для оценки скорости и степени их разложения и накопления продуктов метаболизма, например аминокислот.

Для биотестирования почв перспективно применение цианобактерий (ЦБ). Исследования, проведенные с различными видами цианобактерий показали, что для биотестирования почв в качестве тест-организмов на загрязнение субстратов различными поллютантами, могут использоваться четыре штамма цианобактерий *Nostoc paludosum*, *Nostoc linckia*, *Nostoc muscorum*, *Microchaeta tenera* [83]. Критерием чувствительности цианобактерий служит жизнеспособность клеток, которая определяется по об-

S0

разованию в них кристаллов формазана после обработки ЦБ суспензии трифенилтетразолий хлоридом.

Преимущества ЦБ в качестве организмов для биотестирования по сравнению с эукариотными водорослями является наличие наивысшего биотического потенциала и особо стойких и наиболее чувствительных к внешним воздействиям штаммов. Цианобактерии сравнительно легко выделяются в альгологически чистую культуру из окружающей среды, так как многие виды фактически являются моно доминантными культурами при «цветении» воды и почвы. С ними проще работать, чем с другими бактериями вследствие естественной окраски и более крупных размеров, и проще, чем с водорослями, так как они не имеют целлюлозной клеточной стенки и обладают гораздо большим разнообразием путей метаболизма.

Для определения уровня токсического воздействия на ЦБ ксенобиотиков применяется модификация тетразолюно-топографического метода определения дегидрогеназной активности живых клеток. При этом в качестве субстрата используются бесцветные соли тетразолия, в частности 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ), который, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформазан (ТФФ), имеющий красную или малиновую окраску [84].

Одной из процветающих групп почвенных организмов являются грибы, обилие которых колеблется в широких пределах в зависимости от типа почвы и характера растительных ассоциаций. В некоторых случаях длина грибного мицелия может достигать нескольких километров на 1 г почвы, а их биомасса - нескольких тонн на 1 га. В грибных популяциях при прямом микроскопическом исследовании невозможно установление видовой и даже родовой принадлежности. Однако очень легко дифференцируются популяции микромицетов, имеющие бесцветный и окрашенный мицелий. Меланизация мицелия рассматривается как один из способов приспособления грибов к экстремальным внешним воздействиям: сильной инсоляции, радиации

или накоплению в среде обитания химических соединений, обладающих жёстким репрессивным воздействием. Поэтому вполне логично для оценки состояния техногенных территорий использовать микологический анализ почвенных образцов, основанный на анализе структуры грибных популяций. С этой целью предлагается два подхода: измерение под микроскопом длины окрашенного и бесцветного мицелия или подсчёт под микроскопом бесцветных и окрашенных фрагментов грибного мицелия (коэффициент корреляции между показателем фрагментов мицелия и длиной мицелия 0,90) [84]. Исходя из величины коэффициента корреляции, который фактически является свидетельством прямолинейной зависимости между содержанием фрагментов мицелия и его длиной, можно трудоёмкий метод измерения длины с помощью окуляр-микрометра заменить на более лёгкий и экспрессный метод подсчёта под микроскопом грибных зачатков для определения степени загрязнения почвы.

Загрязнение почвы токсичными веществами приводит к снижению ее биологической активности, что проявляется в подавлении почвенного дыхания, уменьшения численности микроорганизмов и изменении активности почвенных ферментов. Наиболее часто для оценки биологической активности почв используется определение активности инвертазы [85]. Инвертаза широко распространена в природе, она имеется у многих микроорганизмов, встречается почти во всех типах почв. Инвертаза производит расщепление сахарозы на эквимольные количества глюкозы и фруктозы.

Одним из характерных показателей биологической активности почвы является активность почвенной каталазы. Каталазу синтезируют практически все живые организмы, поэтому данный фермент всегда можно обнаружить в почве. Каталаза (H_2O_2 -оксидоредуктаза) разлагает ядовитую для клеток перекись водорода, образующуюся в процессе дыхания живых организмов и в результате различных биохимических реакций окисления органических веществ.

Среди энзиматических показателей, используемых для диагностики загрязнения почвы, наиболее часто устанавливают активность гидролитического фермента - фосфатазы. Фосфатаза гидролизует фосфорорганические соединения с образованием ортофосфорной кислоты и ее производных.

Для биотестирования качества почв обычно используют следующие методики: 1) методику определения токсичности почвы и донных отложений по хемотаксической реакции инфузорий ПНД ФТ 16. 2: 2: 2. 3 - 98 [86]; 2) методику определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний Ф.Р. 1. 39. 2001. 00283 [87]; 3) методику определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системы «Эколюм». ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2:3:3.8-04 [88].

Методика определения токсичности почвы с помощью прибора Биотестер-2 позволяет получить результат в течение двух часов. Данные об острой токсичности почвы при использовании в качестве тест-объекта дафний можно получить через 96 часов после начала биотестирования.

Токсичность почвы можно оценить по репродуктивной способности растений. Показано, что наибольшей чувствительностью по отношению к внешним воздействиям обладают генеративные органы растений [89]. Оценивают семенную продуктивность, количество семян в корзинке, длину семянки, всхожесть, уровень пигментных нарушений у проростков семян. Так, подсчет проростков с пигментными нарушениями выявил высокий уровень аномалий у семян одуванчика, заселявшего все техногенные участки, при максимальном выходе этого типа повреждений у растений придорожного фитоценоза [90]. Для корректной оценки уровня техногенной нагрузки предлагается использовать одновременно несколько индикаторных признаков, что дает возможность определить различия в направленности реакции растений, подверженных разным по количественному и качественному составу поллютантов, техногенным воздействиям.

Оценка видового разнообразия беспозвоночных животных и количественного распределения организмов, обитающих в почвах, позволяет выявить зоны экологических аномалий [91, 92].

Растения могут служить хорошими показателями водного режима, трофности, кислотности почв, а также их загрязнения отдельными элементами. Поэтому даже по присутствию тех или иных видов растений на исследуемой территории можно получить некоторые сведения о состоянии здесь почв. Выделяют три основные группы растений по отношению к кислотности почв: ацидофилы - растения кислых почв, нейтрофилы - обитатели нейтральных почв, базифилы - растут на щелочных почвах. Обнаружив на исследуемой территории тот или иной вид растения и зная его принадлежность к одной из выше названных групп, можно примерно оценить кислотность почв (таблица 6).

Таблица 6 - Растения - индикаторы кислотности почв

Группа растений	Виды-биоиндикаторы	Кислотность почвы
Крайние ацидофилы	Сфагнум, зеленые мхи (гилокомиум, дикранум), плауны (булавовидный, годичный, сплюснутый), ожика волосистая, пушица влагалищная, подбел многолистный, кошачья лапка, Кассандра, петрария, белоус, щучка дернистая, хвощ полевой, щавелек малый	3,0—4,5
Умеренные ацидофилы	Черника, брусника, багульник, калужница болотная, сушеница, толокнянка, седмичник европейский, белозор болотный, фиалка собачья, сердечник луговой, вейник наземный	4,5—6,0
Слабые ацидофилы	Папоротник мужской, орляк, ветреница лютичная, медуница неясная, зеленчук непарный, колокольчик крапиволистный и широколистный, бор развесистый, осока волосистая, осока ранняя, малина, смородина черная, вероника длиннолистная, горец змеиный, иван-да-марья, кисличка заячья	5,0—6,7
Ацидофил-нейтральные	Ива козья, мох плеврозиум Шребера	4,5-7,0
Нейтрофилы	Сныть европейская, лисохвост луговой, клевер горный, клевер луговой, мыльнянка лекарственная, аистник цикутный, борщевик сибирский, мятлик луговой	6,0-7,3
Нейтрально-базофильные	Мать-и-мачеха, пупавка красильная, люцерна серповидная, келерия, осока мохнатая, лядвенец рогатый, лапчатка гусиная	6,7-7,8
Базифильные	Бузина сибирская, вяз шершавый, бересклет бородавчатый	7,8—9,0

Растения могут весьма чувствительно реагировать на избыточное содержание некоторых элементов, в частности, металлов, в почве (Таблица 7).

При этом может изменяться окраска листовой пластинки, наблюдаются хлорозы и некрозы. Следовательно, оценив состояние растений на той или иной территории, можно сделать некоторые выводы о загрязненности почвы.

Таблица 7 - Признаки избыточного содержания некоторых микроэлементов в почве

Элемент	Реакция растения
Цинк	Обесцвечивание и отмирание тканей листа, пожелтение молодых листьев, отмирание верхушечных почек, окрашивание жилок в красный или черный цвет. Первые признаки проявляются на молодых растениях.
Медь	Хлороз молодых листьев. При этом жилки остаются зелеными.
Марганец	Междужилковый хлороз, некроз тканей. Молодые листья искривляются и сморщиваются.
Железо	На молодых листьях хлороз между жилками, которые остаются зелеными. Позднее лист становится беловатым или желтым.
Кобальт	Вдоль основных жилок листа появляются заполненные водой прозрачные участки. Идет некроз ткани. Позднее листья приобретают коричневую окраску и опадают.
Фосфор	Общее пожелтение листьев взрослых растений. Некроз тканей. У старых листьев на конце и по краям появляются некротические пятна.
Магний	Листья слегка темнеют и немного уменьшаются. На поздних стадиях роста их концы втянуты и отмирают.
Калий	На ранних стадиях наблюдается слабый рост растений, удлинение междоузлий, светло-зеленая окраска листьев. На поздних стадиях на листьях появляются сухие пятна, листья вянут и опадают.
Сера	Общее огрубление растений, уменьшение листьев, отвердение стебля. Позднее листья могут скручиваться внутрь, их края становятся коричневыми, а затем бледно-желтыми.
Хлор	общее огрубление растений, листья мелкие, тускло-зеленые. У некоторых растений на старых листьях появляются пурпурно-коричневые пятна и листья опадают.
Азот	Местное повреждение. На краях листьев развивается хлороз, распространяющийся между жилками. Позднее появляется коричневый некроз, листья сворачиваются и опадают.
Кальций	Междужилковый хлороз с беловатыми и некротическими пятнами, которые могут быть окрашены или заполнены водой. Иногда наблюдается рост листовых розеток, отмирание побегов и опадение листьев.
Бор	Хлороз концов и краев листьев, распространяющийся между жилками. Листья становятся бледно-желтыми или беловатыми. На краях листьев наблюдаются ожоги и некроз.

Для оптимизации программы экологического мониторинга почв рекомендуется использовать нижеуказанный ряд (рис.23).

Среди большого количества используемых в экологическом мониторинге для оценки состояния почв тестируемых показателей выявлен ряд информативности:

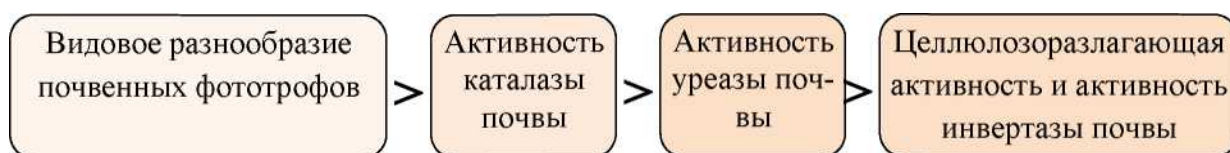


Рис 23 . Ряд информативности тест показателей для определения качества почв
Алгоритм оценки качества почвы можно представить в виде следующей схемы (рис. 24).

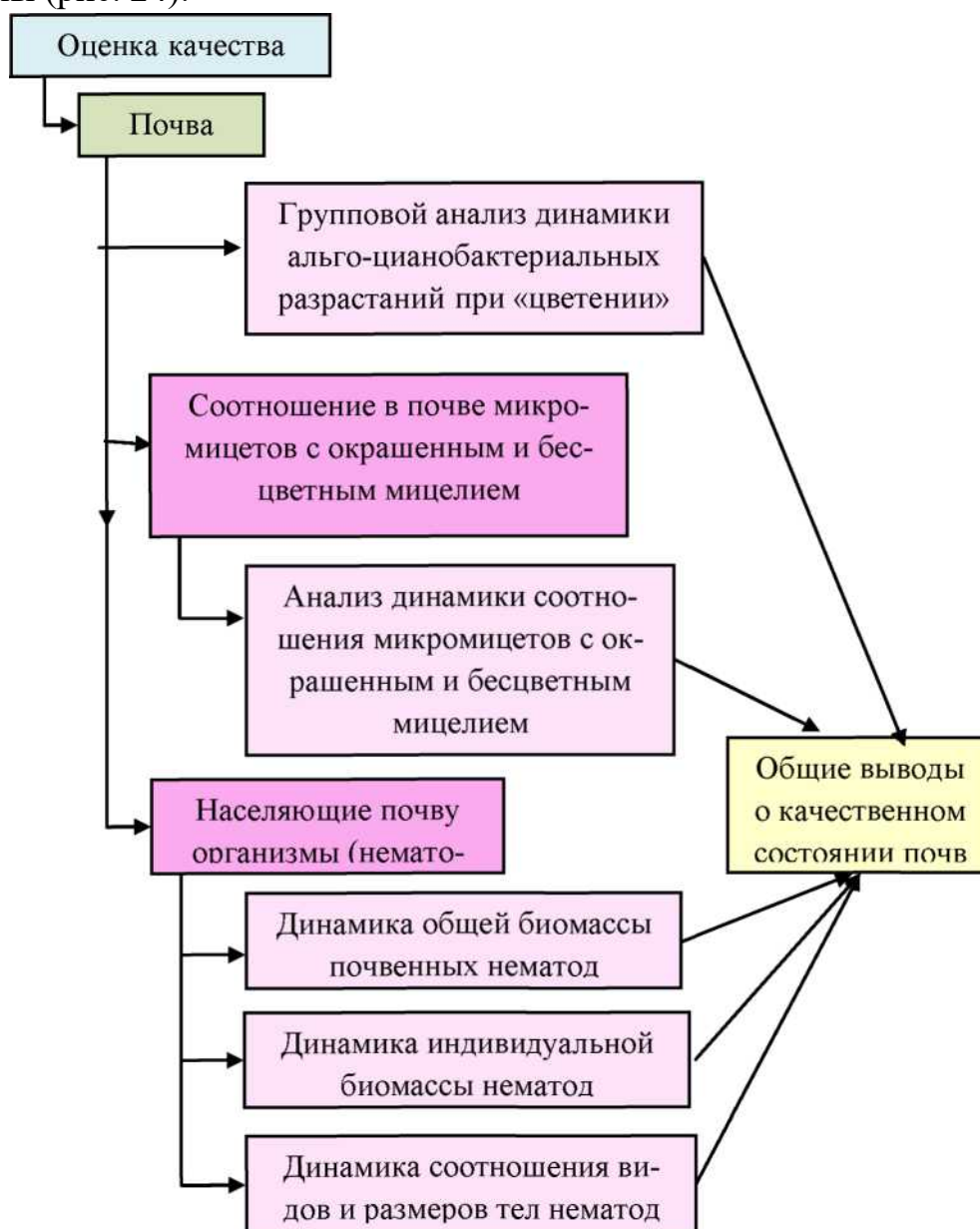


Рис. 24. Алгоритм оценки качества почвы на 111111 в СЗЗ и ЗЗМ

3.3. Биотестирование и биоиндикация загрязнений атмосферного воздуха

Мутагенную активность атмосферного воздуха можно оценить по тесту соматических мутаций в волосках тычинок традесканции. Происходит изменение голубой окраски клеток тычинок на розовую [93].

Признаки повреждения растений при загрязнении атмосферы различны и зависят от характера химического вещества и вида растения [94 - 98]. Так, табак сорта Bel W3 очень чувствителен к озону под влиянием которого на листьях образуются некротические пятна.

Индикаторным признаком нарушений, вызываемых у растений загрязнителями воздушной среды, является флуоресценция хлорофилла листьев и феллодермы [99].

Древесные и кустарниковые растения в настоящее время широко применяются для биоиндикации воздушных загрязнений. Исследователи наблюдали видимые изменения в фотосинтетических структурах: набухание и разрушение хлоропластов, утолщение и изменение формы тилакоидов, снижение содержания хлорофиллов, изменение отношения хлорофиллов а/б, биохимические изменения. Вследствие этого отмечались хлорозы и некрозы листьев у растений вблизи промышленных предприятий, усыхание верхушечных частей побегов. На подобных, визуально различимых морфологических изменениях, как правило, основано большинство методов фитоиндикации атмосферных поллютантов. Однако высокая трудоемкость данных методических подходов, значительная вариабельность используемых признаков, а также невозможность обнаружения начальных проявлений деструктивных изменений в растительном организме существенно ограничивают их широкое использование для биоиндикационных целей.

Вместе с тем регистрация такого параметра, как замедленная флуоресценция хлорофилла, позволяет быстро оценить величину токсического воздействия на растительный организм [100-102]. С ее помощью можно

легко контролировать изменения, происходящие во всех фотоассимилирующих тканях дерева. Данные методические подходы хорошо зарекомендовали себя при работе с лишайниками [103].

Лишайники являются признанными индикаторами химического загрязнения воздушной среды. Обладая высокой чувствительностью ко многим из известных загрязнителей, они своим исчезновением сигнализируют об экологическом неблагополучии окружающей их среды. Поэтому в качестве традиционного методического подхода при проведении лишеноиндикационного обследования местности чаще всего используются показатели видового состава произрастающих лишайников и их обилия [104-108]. Однако в результате длительного и интенсивного воздействия атмосферного загрязнения многие крупные промышленные центры стали в настоящее время зонами “лишайниковой пустыни”. Это обстоятельство существенно ограничивает практическое использование данного метода биоиндикационного картирования степени загрязнения урбанизированных территорий.

Вместе с тем, наряду с традиционным приемом лишеноиндикации чистоты воздушной среды показана возможность применения ее, так называемого, трансплантационного варианта [109-112]. Он состоит в том, что слоевища одного или нескольких видов лишайников вместе с субстратом трансплантируются на некоторое время в районы обследования. После требуемой экспозиции проводится оценка воздействия загрязнителей на трансплантаты каким-либо из методов. С этой целью измеряются скорости фотосинтеза, дыхания или фиксации азота, содержания хлорофилла, выход калия из клеток, изменение структуры клеточных элементов, а также другие морфологические и физиологические показатели. Однако, используемые методы не могут в полной мере удовлетворить предъявляемые к ним требования и поэтому трансплантационная лишеноиндикация загрязнения окружающей среды пока еще редко применяется для решения практических задач.

Под влиянием ухудшения качества атмосферного воздуха у отдельных особей или групп некоторых растений отмечаются различные измене-

ния: необычная окраска листвы, опадение листвы, изменение формы роста, плотности популяции, ареала вида и т.д. Эти изменения могут быть индикаторными показателями качества воздуха в процессе проведения биомониторинга.

Общая схема биомониторинга атмосферного воздуха представлена на рис 25.



Рис 25. Схема биомониторинга качества атмосферного воздуха на ППП в СЗЗ и ЗЗМ

3.4. Перспективные методы оценки генотоксичности природных сред в зоне влияния промышленных предприятий

В системе экологического мониторинга опасных промышленных объектов значительную роль играют методы биотестирования и биоиндикации.

Однако, методы изучения генотоксичности в настоящее время в российских лабораториях используются значительно реже чем в зарубежных.

Известно, что генетические последствия воздействия вредных химических веществ, как правило, могут проявиться не сразу, а лишь спустя несколько поколений. Поэтому генетические биотесты дают возможность оценить отдаленные последствия действия загрязняющих веществ и их применение является обязательным в процессе экологического мониторинга.

Считают, что оптимальными тест-системами для первого этапа генетического мониторинга загрязнения окружающей среды являются такие растительные тест-системы как *Crepis capillaris* L., *Tradescantia* клонов 02 и 4430 и мутантная по одному из генов синтеза хлорофилла линия сои (*Glycine max.* (L.) Merrill) [113]. Удобными тест-объектами являются также семена дикорастущих растений *Matricaria recutita* L., *Rumex confertus* Willd., *Taraxacum officinale* Wigg.s.l. и *Plantago major* L.. Указанные растительные тест системы были использованы для исследования генетического влияния как жидких, так и твердых отходов предприятий цветной металлургии и влияния продуктов горения и кустарной переработки нефти [114-116]. Все тест-системы оказались пригодными и высоко чувствительными к данным типам загрязнений. Причем, соя (*Glycine max.* (L.) Merrill) дает возможность определить не только наличие или отсутствие мутагенного эффекта, но и типы возникающих мутаций, что позволяет сделать предварительные выводы о возможных механизмах мутагенного действия загрязнителя. Перспективно использование гаплоидных растений для оценки мутагенности природных сред. Гаплоиды имеют один набор хромосом. Поэтому все мутации, в том числе рецессивные, проявляются в первом поколении. Традесканция (клоны 02 и 4430) отличается высокой чувствительностью к облучению и химическим мутагенам и обладает целым рядом преимуществ по сравнению с другими тест системами:

- пригодностью для обнаружения как газообразных, так и водорастворимых мутагенов;

- возможностью использовать *in situ* для обнаружения атмосферных загрязнений, методу относящемуся к группе экспресс-методов;

- нетребовательностью растений, их легкостью выращивания и цветением круглый год; не требуется стерильных условий;

У традесканции можно одновременно изучать: хромосомные aberrации и соматические мутации в одних и тех же клетках. Хромосомные aberrации можно изучать в микроспорах, кончиках корней и волосках тычиночных нитей; соматические мутации - в лепестках и волосках тычиночных нитей [117]; частоту мутаций в гаметах и соматических клетках, а также укорочение волосков тычиночных нитей за счет гибели клеток.

Наиболее удобными объектами являются соматические мутации в волосках тычиночных нитей, поскольку они более чувствительны к воздействию физических и химических мутагенов. Изменение голубой окраски клеток волосков тычиночных нитей на розовую рассматривается как фенотипическое проявление мутации в гетерозиготных по окраске клетках волосков тычинок (рис.26).

В результате деления мутантных клеток в зрелом волоске формируется сектор, включающий одну и более клеток с розовой окраской. Вероятными механизмами образования розовых мутантных событий считают соматический кроссинговер, предшествующий точковой мутации, замену пар оснований, сдвиг рамки считывания, делеции сегментов хромосом, несущих доминантный ген.

По данным разных авторов, спонтанная частота мутаций для клона 02 изменяется в зависимости от температуры и освещенности в пределах от 0,048 до 0,15 %. Традесканция удобна и для цитогенетического анализа, поскольку имеет небольшое количество ($2n=12$) относительно больших хромосом.

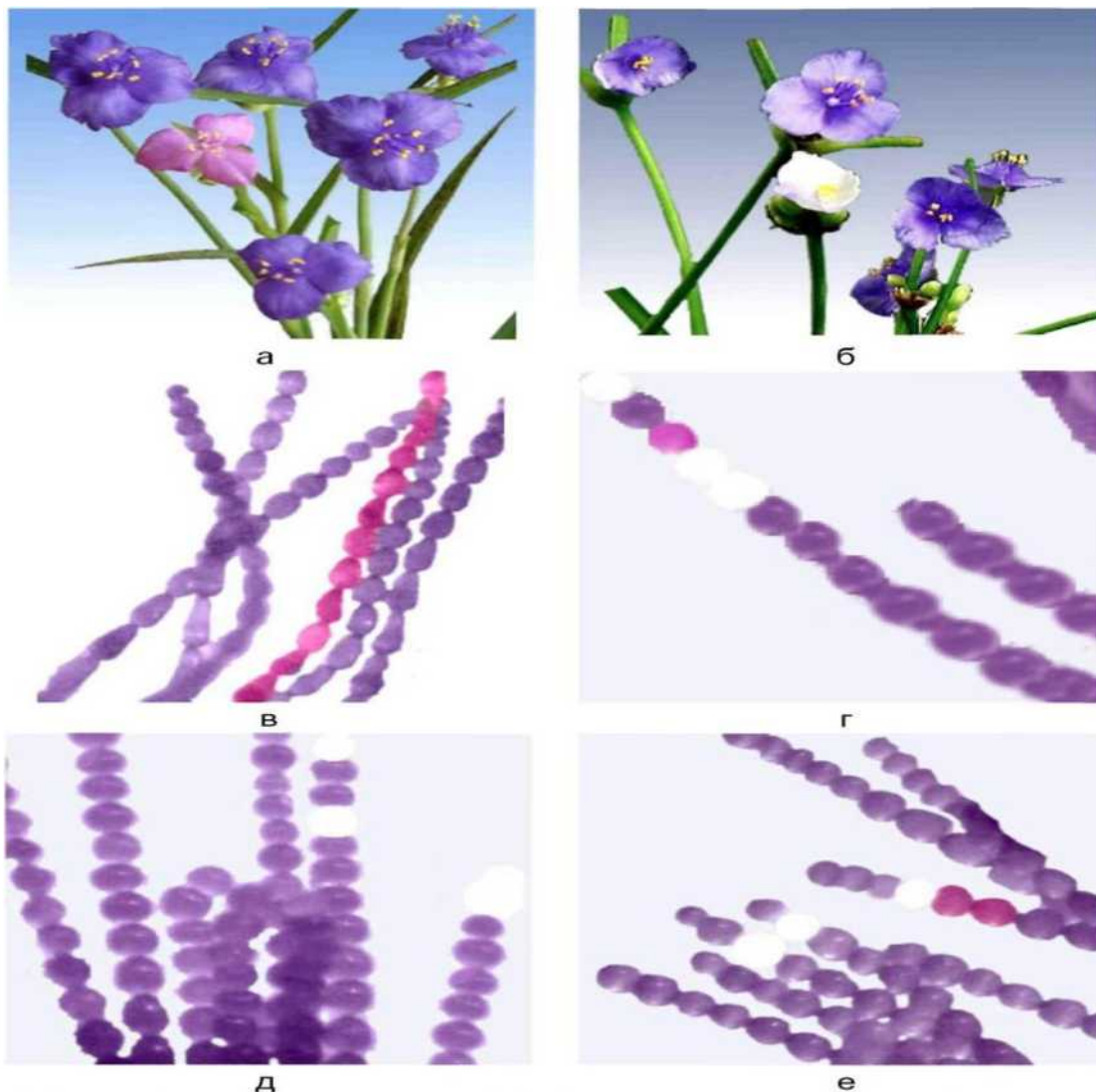


Рис.26. Внешний вид традесканции (клон-02): а) голубые и розовые цветы, б) аномалии цветов (голубые и белые цветы с двумя лепестками и чашелистиками). Соматические мутации: розовые и белые мутационные события в волосках тычиночных нитей традесканции: в) розовый волосок в результате одного (мутационного) события, г) белые и розовые клетки в результате трех событий, д) две белые клетки в результате двух событий и гигантская клетка в результате одного события, е) белые клетки в результате одного события, розовые и белые в результате двух событий.

В качестве тестового растения удобна также сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Это обусловлено рядом особенностей:

- многолетний жизненный цикл деревьев позволяет проследить влияние фактора в течение длительного времени (30-40 лет);
- вид, согласно многочисленным литературным данным по проблеме индуцированного мутагенеза, обладает высокой чувствительностью;
- методика цитогенетического анализа отличается высокой точностью, простотой применения и доступностью.

Для изучения влияния химического загрязнения на появление aberrаций хромосом проводится цитологический анализ митозов в корешках проростков семян сосны. Выход разного типа хромосомных aberrаций в клетках растений используется в качестве показателя, характеризующего цитогенетические повреждения. Частое использование корней для изучения роста и деления клеток обусловлено относительной простотой и четкостью их анатомического строения, более резким, чем в стебле, разделением меристемы и зоны растяжения по длине корня, наличием большого числа митозов в меристеме нормально растущего корня, стабильностью роста корня и легкостью обработки корней различными веществами. Учет нарушений хромосом ведется в стадии анафазы и начальной стадии телофазы на временных («давленных») препаратах. При работе по анализу структурных мутаций хромосом используются только препараты, отвечающие следующим требованиям:

- наличию однослойных целых клеток с неразорванной оболочкой, что исключает потерю хромосом;
- расположению хромосом внутри клетки в одной плоскости без наложений, чтобы не создавались возможности искажений при анализе;
- хромосомы должны быть хорошо окрашенными, лежащими на фоне прозрачной цитоплазмы;

- число хромосом в клетке должно было точно соответствовать ploидности (2n) изучаемой метафазы.

Для оценки мутагенных факторов окружающей среды часто применяют цитогенетические тесты на растениях [118]. Микроядрышковый тест основан на подсчёте клеток с микроядрами, которые представляют собой автономно существующие ацентрические фрагменты хромосом, возникающие в результате влияния генотоксических веществ на геном. Методика основана на определении увеличения количества микроядрышек в проростках семян и луковицах растений при действии генотоксических веществ, присутствующих в исследуемой пробе. Основным критерием генотоксичности является увеличение количества микроядрышек в корешках проростков семян и луковиц растений по сравнению с контролем на 10% и более. Определение генотоксического влияния проводят также с использованием анафазно-телофазного метода. Этот метод основан на регистрации хромосомных aberrаций, на стадии анафазы и телофазы. Аномальные анафазы имеют «мосты» и ацентрические фрагменты, возникающие в результате структурных aberrаций хромосом типа ассиметричных транслокаций и делеций. Повреждения хромосом в области центромеры приводят к отставанию целых хромосом или их фрагментов при движении их в метакинезе и при расхождении к полюсам. Следствием фрагментации хромосом является возникновение фрагментов. При воссоединении фрагментов, содержащих центромеру, образуется дицентрическая хромосома, которая испытывает воздействие обоих митотических центров, и, растягиваясь между дочерними группами анафазных или телофазных хромосом, образует «мост».

В зависимости от характера повреждения хромосом возникают «мосты» разного типа. При воссоединении двух разорванных хромосом возникает хромосомный (обычно двойной) «мост», а при боковом воссоединении двух разорванных сестринских хроматид - хроматидный «мост» (обычно одиночный). Методика основана на определении увеличения количества

хромосомных aberrаций в апикальной меристеме проростков семян растений при действии генотоксических веществ, присутствующих в исследуемой пробе, по сравнению с контролем на 2 и более %.

Проведение цитогенетического анализа перспективно с помощью комплекса ВидеоТесТ - Карио (рис.24). В состав комплекса ВидеоТесТ - Карио входит следующее оборудование: микроскоп, цифровая видеокамера, компьютер, принтер [119]. На компьютер установлена операционная система Microsoft Windows и специализированное программное обеспечение ВидеоТесТ — Карио (рис. 27).



Рис 27. Программно - аппаратный комплекс ВидеоТесТ - Карио.

Комплекс позволяет проводить автоматическое кариотипирование хромосом человека, а также ручное кариотипирование хромосом животных и растений. Основные возможности программы ВидеоТесТ-Карио:

- ввод изображений метафазных пластинок с помощью камеры, сканера, открытие с диска, передача из базы данных ВидеоТесТ-Альбом 4.0;
- улучшение качества исходного изображения, сопровождающееся графикой;
- работа с G, Q, R окрасками и автоматическим выделением хромосом;

- автоматическое разделение наложенных и контактирующих хромосом, кариотипирование хромосом человека с учетом морфологических параметров хромосом: длины и центромерного индекса (в версии Карио 3.0);
- автоматическое кариотипирование хромосом человека с учетом положения бендов на хромосомах (в версии Карио 3.1);
- ручное кариотипирование хромосом животных и растений;
- сравнение хромосом и идеограмм, сохранение и печать изображений и результатов анализа

Метод ДНК-комет («DNA-comet assay») используется для биомониторинга генотоксических факторов окружающей среды. Метод ДНК-комет является быстрым и весьма чувствительным методом регистрации повреждений ДНК и изучения репарации ДНК на уровне одиночных клеток. Применяется в системах *in vivo* и *in vitro*. Для исследования необходимо несколько тысяч клеток исследуемого образца[120].

Основные процедуры метода ДНК-комет заключаются в иммобилизации клеток в низкоплавкой агарозе, нанесенной на предметное стекло для микроскопии. Обработка образцов в буфере с высоким содержанием соли приводит к лизису клеточных мембран и экстракции белков. Молекулы ДНК разделяют электрофорезом, треки ДНК визуализируют посредством окрашивания флуоресцентным красителем, после чего образцы изучают микроскопически. При наличии разрывов ДНК нарушается структурная организация хроматина и утрачивается сверхспирализация ДНК, что приводит к релаксации этой биомакромолекулы, формируются фрагменты ДНК, не связанные с клеткой. В электрическом поле релаксированные петли и фрагменты ДНК вытягиваются по направлению к аноду, что и придает наблюдаемым объектам вид «комет». Количество ДНК, мигрировавшей по направлению к аноду и определяемое микрофотометром, может использоваться в качестве показателя характеризующего уровень повреждений ДНК в

изучаемых клетках. «Кометы» анализируют либо путем визуального наблюдения и дифференциации «комет» по степени поврежденности ДНК, либо с использованием компьютерных программных средств обработки изображений (рис. 28). Последний метод анализа «комет» особенно необходим для объективной оценки влияния небольшой концентрации повреждающего агента, или для выявления незначительных различий между субпопуляциями клеток.

В настоящее время большинство лабораторий, внедривших данный методический подход в исследования, разработали многочисленные вариации протокола, в частности продолжительности и условий лизиса клеток, денатурации, электрофореза и окрашивания ДНК. Подсчитывают 100-500 клеток на одном стекле в двух повторах. Результаты эксперимента являются достоверными при повторении не менее 6 раз. При визуальном анализе «ДНК-кометы» ранжируются на пять условных типов с соответствующим числовым значением от 0 до 4.

Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс «ДНК-комет» (ИДК), определяемый по формуле:

$$И = (O_n + I_n + 2n + 3n + 4n) / .,$$

где $O_n - 4n$ — число «ДНК-комет» каждого типа. — сумма подсчитанных «ДНК-комет» [121].

Программно-аппаратный комплекс включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров «ДНК-комет», характеризующих целостность структуры ДНК — длину «кометы», длину «хвоста», диаметр «головы», процентное содержание ДНК в «голове или хвосте». В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров «ДНК-комет» проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений [122-124].

Использование щелочного варианта метода ДНК-комет позволяет оценивать, главным образом выход одностранных разрывов и щелочелавильных сайтов, так как при использовании данного протокола двустранные разрывы составляют менее 5% общего выхода повреждений ДНК [125]. Методом ДНК-комет, проводимым в нейтральных условиях среды, детектируют преимущественно двустранные разрывы ДНК [126].

Для проведения исследования, как правило, используется следующее оборудование: флуоресцентный микроскоп, камера для горизонтального геля электрофореза, источник питания для электрофореза, микротермостат для пробирок типа эппендорф, набор полуавтоматических пипеток, персональный компьютер с платой видеозахвата, цифровая фотокамера или телекамера, водяной термостат, холодильник, плитка электрическая, центрифуга с бакет ротором, стекла предметные и покровные для микроскопии. Основные этапы выполнения метода:

приготовление клеточной суспензии, приготовление слайдов (3-12 шт): клетки иммобилизуются в агарозу (20 минут);

лизис клеток (получение нуклеоидов) (30-60 минут);
отмывка в соответствующем буфере с последующей обработкой ферментами, специфическими к конкретному типу повреждений в ДНК;

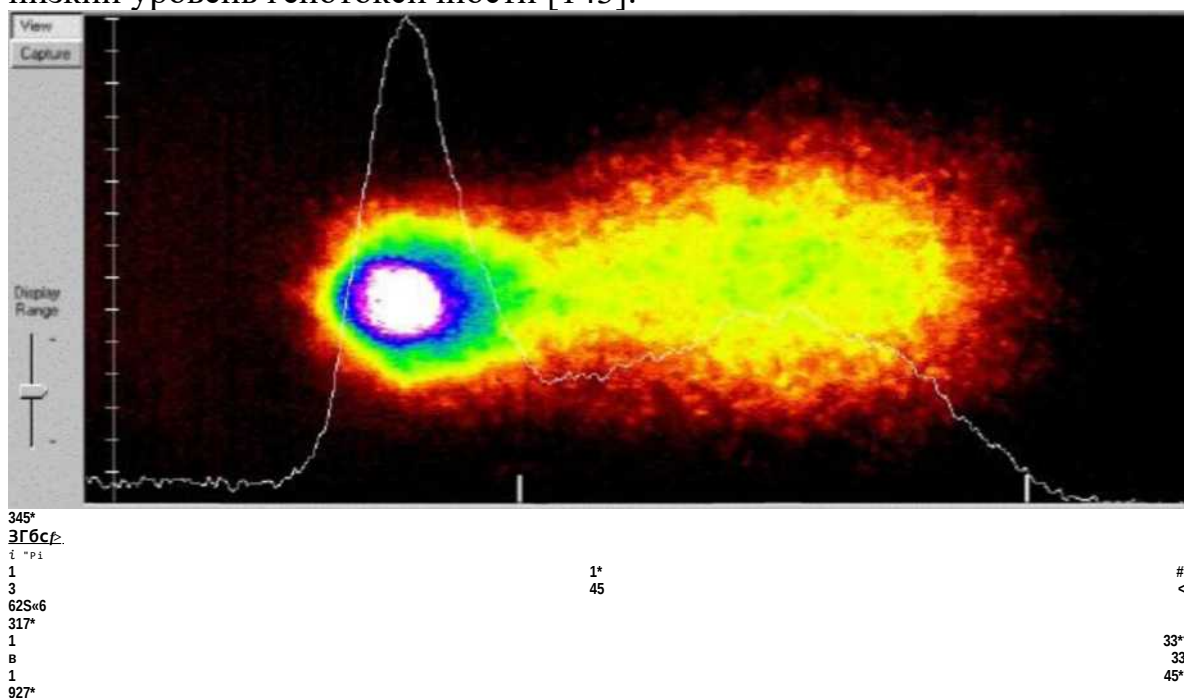
щелочная денатурация ДНК и превращение щелочелавильных сайтов в одиночные разрывы (20-40 минут);

электрофорез в щелочных условиях (20-40 минут);
нейтрализация щелочи (5-10 минут); окрашивание препаратов флуоресцентным красителем (10-60 минут); анализ изображений.

Сравнение метода ДНК-комет с другим традиционным тестом — образованием микроядер показало, что 49 из 54 тестируемых канцерогенов не индуцировали образование микроядер, но давали позитивный ответ в методе ДНК-комет. Весьма перспективно использовать метод ДНК-комет для оценки *in vivo* генотоксичности химических соединений [127-131].

Главное преимущество метода ДНК-комет перед другими методами регистрации повреждений ДНК заключается в возможности обнаружения повреждений на уровне одиночных клеток эукариот практически любого происхождения. Результаты исследований позволяют сделать заключение о том, что метод ДНК-комет в зависимости от тестируемого генотоксичного агента [132-134] сопоставим по чувствительности с традиционными цитогенетическими тестами и в ряде случаев превосходит их [135-142].

Метод ДНК-комет обладает более высокой чувствительностью по сравнению с микробиологическим тестом Эймса и тестом Циммерманна на дрожжах. Так, с помощью тестов Эймса и Циммерманна не обнаружено генотоксичности [143].



генотоксичности питьевой воды, а с помощью теста ДНК-комет обнаружен

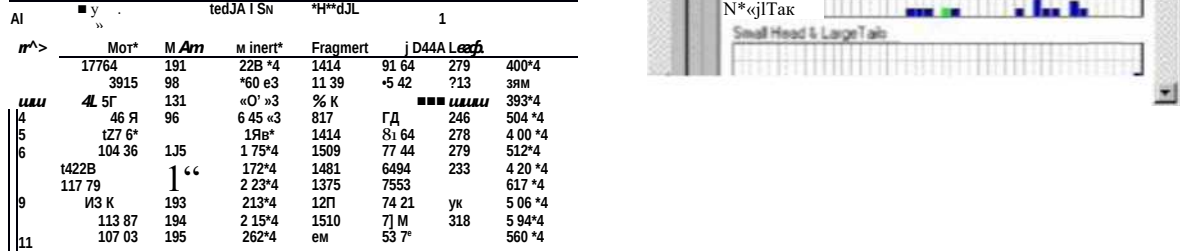


Рис. 28. Анализ «кометы» с использованием компьютерных программных средств обработки изображений

Для определения генотоксичности применяют также прибор GreenScreen ЕМ (рис.29). Степень генотоксичности оценивается на основа-

нии изменения флюоресценции клеток дрожжей, которые используются в этой методике в качестве тест-объекта. Преимуществом этого метода по сравнению с микробиологическим тестом Эймса является быстрота проведения анализов исследуемых проб и меньшие финансовые затраты.



Рис. 29. Прибор GreenScreen EM для анализа генотоксичности.

Следует отметить, что для целей государственного экологического контроля и мониторинга опасных промышленных объектов применяются, как правило, аттестованные методики, прошедшие метрологическую проверку [144]. Поэтому в настоящее время в первую очередь необходимо использовать имеющиеся аттестованные методики биотестирования [145-146].

Выделяют несколько классов мутаций, вызываемых различными генотоксическими факторами. Наиболее важный класс мутаций — это мутации генов. В этом случае никаких видимых изменений ни в числе хромосом, ни в их строении не наблюдается, а изменяется молекулярная структура гена. Структурные мутации хромосом связаны с изменением формы отдельных хромосом. Мутации могут заключаться также в кратном изменении числа хромосом. Это явление получило название полиплоидии. Другие, некратные изменения числа хромосом называются анеуплоидией.

Не существует одного метода способного выявлять все генотоксические воздействия. Поэтому общепринятым является использование набора тестов *in vivo* и *in vitro*. При этом в качестве тест-объектов служат самые различные виды организмов от микроорганизмов до трансгенных животных и клеток человека в условиях *in vitro* и *in vivo* [147]. Для оценки на мутагенность используют, как правило, минимум три генетических тест-системы, поскольку мутагены могут обладать видовой специфичностью.

Таким образом, система биотестов для оценки генотоксичности должна быть в идеальном варианте многокомпонентной и оценивать генные, хромосомные и геномные классы мутаций.

Литература

1. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. /Под ред. В.А. Абакумова. - Л.: Гидрометеиздат, 1983.
2. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР / Гл. ред. Кутикова Л. А., Старобогатов Я. И. - Л.: Гидрометиздат, 1977.
3. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / Под ред. С.Я. Цалолихина. Т. 1. Низшие беспозвоночные. - С-Пб., 1994. - 395 с.
4. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / Под ред. С.Я. Цалолихина. Т. 2. Ракообразные. - С-Пб., 1995.
5. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / Под ред. С.Я. Цалолихина. Т. 3. Паукообразные. Низшие насекомые. - СПб., 1997.
6. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / Под ред. С.Я. Цалолихина. Т. 4. Высшие насекомые. Двукрылые. - СПб., 1999.

7. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий / Под ред. С .Я. Цалолихина. Т. 5. Высшие насекомые. - СПб., 2000.

8. ГОСТ 17.1.3.07-82 Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков.

9. Вудивисс Ф. Биотический индекс р. Трент. Макробеспозвоночные и биологическое обследование. // Научные основы контроля качества поверхностных вод по гидробиологическим показателям. Труды Советско-английского семинара. - Л.: Гидрометеиздат, 1977. - с.132-161.

10. Вудивисс Ф. Совместные англо-советские биологические исследования в Ноттингеме в 1977 г. // Научные основы контроля качества поверхностных вод по гидробиологическим показателям. Труды II Советско-английского семинара. - Л.: Гидрометеиздат, 1981. — с. 117—189.

11. Айвазова Л.Е. и др. Метод биотестирования водной среды с использованием инфузорий // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С.37 -42.

12. Болдырева Н.М. Метод биотестирования сточных и природных вод на культуре инфузорий // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 42-43.

13. Пожаров А.В. и др. Метод биотестирования по хемотаксической реакции парameций // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 99- 103.

14. Тушмалова Н.А., Данильченко О.Г., Бресткина М.Д. Метод биотестирования природных и сточных вод по уровню двигательной активности инфузории спиростома // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 44-46.

15. Oliphant J.F. Influence of chemicals on ciliary beat in Paramecium // *Physiol. Zool.* 1942. v.15. P.443-452.

16. Проссер Л. Сравнительная физиология животных. М., 1978.
17. Щеголькова Н.М., Козлов М.Н., Данилович Д.А., Канцерова Т.А. Сравнительная оценка методов биотестирования речных и очищенных вод. Вода и экология. 2001, N 2, С. 2 - 8.
18. Строганов Н.С. и др. Метод токсикологического контроля сточных вод. Биологические науки (научные доклады высшей школы). 1979. N 2, С. 90 - 96.
19. Методические указания по биотестированию сточных и природных вод с использованием медицинской пиявки. М., 1986.
20. Флеров Б.А., Лапкина Л.Н., Жмур Н.С., Яковлева И.И. Метод биотестирования сточных вод, содержащих ионы металлов по смене статического состояния на динамическое у медицинской пиявки // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 114 - 117.
21. Крайнюкова А.Н., Рязанов В.В., Емельяненко В.В. Метод биотестирования по реакциям закрывания створок двустворчатых моллюсков // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 57 - 60.
22. А.с. N 946027 СССР / Рязанов А.В., Крайнюкова А.Н., Васенко А.Г. (СССР).
23. А.с. N1144203 СССР / Емельяненко В.В., Крайнюкова А.Н. (СССР).
24. Шаланки Я. Использование моллюсков для индикации загрязнения вод // Разработка и внедрение на комплексных фоновых станциях методов биологического мониторинга. Рига, 1983. Т.2. С. 45 - 57.
25. Методические рекомендации по установлению предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ для воды рыбохозяйственных

1986.

26. А.с. N 381336 СССР/ Аудулев К.К., Брагинский ЛИ., Бурльная Н.Л. (СССР).

27. А.с. N1270699/ Степаненко А.А., Хорунжая Т.А. (СССР).

28. Строганов И.С., Колосова Л.В. Изучение токсичности водной среды на брюхоногих моллюсках // Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971. С.216-218.

29. Лесников Л.А. Методика оценки влияния вод из природных водоемов на *Daphnia magna* Straus // Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971. С. 157 - 166.

30. Gersich E.M., Blanchard F.A., Applegath S.L., Park C.N. The precesion of daphnia (*Daphnia magna* Straus, 1820) static acute toxicity tests // Arch. Environ. Contain. Toxicol. **1986.V.15. P. 741 -749.**

31. Лесников Л.А. Основные задачи, возможности и ограничения тестирования // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград, 1983. С. 3- 13.

32. Колупаев Б.Н. Метод биотестирования по изменению дыхания и сердечной деятельности у дафний // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 103-104.

33. А.с. N 1068083 СССР / Емельяненко В.В., Крайнюкова А.Н., Катриченко Г.И., Васенко А.Г. (СССР).

34. Исакова Е.Ф., Колосова П.В. Метод биотестирования с использовани-
ем дафний // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 50 - 57.

35. Туманова А.А., Постнов И.Е., Осипова Н.И., Зимин А.Б. Химико-биологический метод оценки содержания фенола в воде с помощью дафний // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 104 - 106.

36. Флеров Б.А., Жмур Н.С., Очирова М.Н., Чалова И.В. Метод биотестирования природных и сточных вод с использованием рачка *Ceriodaphnia dubia* // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 111 - 114.

37. Munzinger A., Monicelli F. A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metall stress // Ecol. and Environ. Safety. 1991.v.22. P. 24-31.

38. Крайнюкова А.Н. Биотестирование в охране вод от загрязнения // Методы биотестирования вод. - Черноголовка, 1988. - С. 4 - 14.

39. Крайнюкова А.Н. Система токсикологической оценки и контроля источников загрязнения водных объектов // Биотестирование в решении экологических проблем. Санкт-Петербург, 1992. С. 46 - 62.

40. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* straus (Cladocera, Crustacea) // British Standard 6068: Section 5.1. Hempstead, G.B. 1990.

41. Строганов Н.С. и др. Основные принципы биотестирования сточных и оценка качества вод природных водоемов // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград, 1983. С.21 -29.

42. Строганов Н.С. Методики быстрого определения токсичности водной среды // Вести. МГУ. 1968. N.3. С. 40 -46.

43. Hellawell J.M. Biological surveillance and water quality monitoring.F.A.O. EIFAC/74/111-1. Paper presented at Aviemore. Scotland, May, 1974.

44. nar.N 2164702, 1971. ФРГ.

45. Бурковский А.Л. Биологический контроль за токсичностью многокомпонентных сточных вод на химическом предприятии методом рыб-ной пробы // Изв. НИИ озерн. и речи. рыбн. хоз-ва. 1974. Т.98. С. 127-129.
46. А.с. N 686698 СССР / Сахаров А.А. и др. (СССР).
47. А.с. N 789079 / Коробов Н.Н., Катриченко Г.И., Васенко А.Г. (СССР). 1980.
48. А.с. N 971186 СССР / Катриченко Г.Н. и др. (СССР).
49. Пат. N 252685 ГДР. 1988.
50. Пат. N 259764 ГДР. 1989.
51. Evaluating acute toxicity of water to fresh-water fishes // Standard Test Methods, ASTM D 1345-59. Reseapproved, 1974.
52. Строганов Н.С. и др. О применении экспресс-метода оценки острой токсичности промышленных стоков в экспедиционных условиях // Изв. Гос. Научно-иссл. Ин-та озерного и рыбного хозяйства. 1974. Т. 98. С.87-90.
53. Бурковский А.Л. Индикаторная установка для непрерывного биоконтроля состава токсичности сточных вод // Информационный листок о научно-технич. Достижениях. 1980. N 16 - 80. Сер. 0414. Волгоград. ЦНТИ.

54. Колупаев Б.И., Карпович Т.А., Маклаков В.В.
Биологический метод оценки токсичности промышленной сточных вод // Гидрохимические материалы. 1984. Т.89. С. 11 - 14.

55. Карпенко А.А., Тюрин А.Н. Исследования двигательной активности приморского гребешка // Биология морских беспозвоночных. Владивосток, 1990. С. 66 -72.

56. Стадниченко А.П., Головачева Л.Д. Влияние различных концентраций поверхностно-активных веществ на физико-химические свойства гемолимфы катушки (Mollusca, Bulinidae, Planorbis) в норме и при инвазии трематодами // Паразитология. 1990. Т.24. С.238 - 242.

57. Соколов С.А., Айвазова Л.Е. К вопросу об унификации методов проведения токсикологических экспериментов в целях биотестирования // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград. 1983. С. 79 -81.

58. Зайцева О.В., Ковалев В.В., Шувалова Н.Е. Современное биотестирование вод, требования к тест-организмам и тест-функциям с позиций сравнительной физиологии и физиологии адаптационных процессов. Ж. Эволюционной биохимии и физиологии. 1994. Т. 30 № 4. С. 575 - 592.

59. Precht et al. Reactionen und adaptationen wechselwarmer tiere nach einer anderung der anpassungstemperature und der zeitliche // Verlauf-

Kieler

Meeresuntersuch. 1964. Bd 13. H. 4. S. 369 -401.

60. Слоним А. Д. Учение о физиологических адаптациях // Экологическая физиология животных. Ч. 1. Общая экологическая физиология и физиология адаптаций. Л., 1981.

61. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л., 1979.

62. Меерсон Ф.З. Основные закономерности индивидуальной адаптации // Физиология адаптационных процессов. М., 1986. С. 10 -76.

63. Меерсон Ф.З. Общий механизм адаптации и роль в нем стресс-реакции, основные стадии процесса // Физиология адаптационных процессов. М., 1986. С. 77- 123.

64.Заварзин А.А. Основы частной цитологии и сравнительной гистологии многоклеточных животных. Л., Наука. 1976.

65.Зайцева О.В., Ковалев В.В., Шувалова Н.Е. Экспресс-способ биотестирования пресных вод « бегущая улитка» // Заявка на выдачу патента А01К61/00, С01 N 33/18, N гос. Регистр. 92001891 от 19 октября 1992 г.

66. Ф Р 1. 39. 2001. 00284 Жмур Н.С., Орлова Т.Л. Методика определения токсичности воды водных вытяжек по водорослям. М., Акварос 2001.44 с.

67. ПНД ФТ 14. 1: 2: 3: 4: 5 - 2000 Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. М., 2000. 32 с.

68. Ф.Р. 1. 39. 2001. 00283 Жмур Н.С., Орлова Т.Л. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М., Акварос 2001.48 с.

69. ПНД ФТ 14. 1: 2: 3: 4. 2 - 98 Методика определения токсичности

воды по хемотаксической реакции инфузорий. М., 1998. 13 с.

70. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». МПР РФ.— М.: 2004. 16 с.

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

72. МР № ЦОС ПВ Р 005 - 95 Методические рекомендации по применению биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения. 51с.

73. Патент Р Ф №2069851 Бюл. № 33 27.11.1996// Григорьев Ю.С.,
Фуряев Е.А., Андреев А. А.

74. Данилин И.А. и др. Экспериментальное обоснование нового метода биотестирования пресноводных водоемов по содержанию белков металло-тионеинов в органах и тканях двустворчатых моллюсков. Экология, 2002, № 5, С. 397-400.

75. Бадтиев Ю.С., Кулемин А.А. Биоиндикация
поверхностных вод
по состоянию пресноводных моллюсков. Экологический вестник
России,
2001, №5, С. 36-38.

76. Сидоров В.С. и др. Вариабельность интегрального
биохимиче-
ского индекса у рыб под влиянием техногенных вод горно-
обогатительного комбината. Экология. 2003, N4, С. 274 - 280.

77. Жукова Т.И., Пескова Т.Ю. Реакция крови бесхвостых амфибий на
пестицидное загрязнение. Экология 1999. № 4. С. 288 - 292.

78. Чубинишвили А.Т. Гомеостаз развития в популяциях
озерной ля-
гушки (*Rana ridibunda* Pall.) обитающих в условиях химического
загрязне-
ния в районе Средней Волги. Экология. 1998. № 1. С. 71 - 74.

79. Turner B.L. et al. Characterization of the phosphatase activities of
mosses in relation to their environment. Plant, Cell and Environment. V. 24, issue
11, P. 1165- 1176, Nov. 2001.

80. Ratkevicius N., Correa J. A., Moenne A. Copper
accumulation, syn-
thesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in
Enteromorpha
compressa (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal - enriched
environments
in northern Chile. Plant, Cell and Environment v. 26, issue 10, P. 1599-
1608,
oct. 2003.

81. Ломагин А.Г., Ульянова Л.В. Новый тест на загрязненность воды с использованием ряски *Lemna minor* L. Физиология растений, 1993, т.40, N 2, С. 327-328.

82. Цаценко Л.В., Малюга Н.Г. Чувствительность различных тестов

на загрязнение воды тяжелыми металлами и пестицидами с использовани-

ем ряски малой *Lemna minor*. Экология, 1998, N 5, С. 407 - 409.

83. Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я., Огородникова С.Ю., Олькова А. С., Фокина А.И. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязнённых средах // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 2. С. 23-28.

84. Кондакова Л., Домрачева Л., Дабах Е., Плетнёва А. Принципы диагностики состояния почвы с использованием количественных характеристик альго-микологических комплексов // Вестник Ин-та биологии Коми НЦ УрО РАН. 2008. №6. С. 12-15.

85. Хазиев Х.В. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 1990. 198 с.

86. Ф. 131.200.00735 Методика определения токсичности почвы и донных отложений по хемотаксической реакции инфузорий. М., 1998. 15с.

87. Ф.Р. 1. 39. 2001. 00283 Жмур Н.С., Орлова Т.Л. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М.,

Аква-

рос 2001. 48 с.

88. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2:3:3.8-04. Методика определения

токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции

тест-системы «Эколюм». МПР РФ.— М.: 2004. 16 с.

89. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. Киев: Наукова Думка, 1989. 384 с.

90. Евсеева Т.И. и др. Использование природных популяций *Tarax-*

acum officinale Wigg. Для оценки состояния техногенно нарушенных тер-

риторий. Экология. 2002. № 5 С. 393 - 396.

91. Методика экологического обследования состояния почвы методами биоиндикации. Экологический вестник России, 2002., № 9, С. 50 - 56.

92. Методика экологического обследования состояния почвы методами биоиндикации. Экологический вестник России, 2002., № 10, С. 48 - 51.

93. Евсеева Т.И., Зайнуллин В.Г. Исследование мутагенной активно-

сти атмосферного воздуха и снежного покрова г. Сыктывкара по тесту со-

матических мутаций в волосках тычинок традесканции (клон 02). Эколо-

гия, 2000, N 5, С. 343 - 348.

94. Wohlgemuth H. et al. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. Plant, Cell and Environment, v. 25, issue6, p. 717-726. Jun. 2002.

95. Уильям Дж. Мэннинг, Уильям А. Федер. Биомониторинг загрязнения атмосферы с помощью растений. Ленинград. Гидрометеиздат. 1985. 143 с.

96. Полякова А. и др. Биоиндикаторы и методы биоиндикации загрязнения среды. Экологический вестник России, 2002. № 11, С. 49 - 60.

97. Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей. Киев, Наукова Думка. 1986. 141 с

98. Despina Vokou et al. Lichens as bioindicators of temporal variations in air quality around Thessaloniki, northern Greece. Ecological Research, 1999, v.14, Issue 2, P. 89 - 96

99. Григорьев Ю.С., Бучельников М.А. Биоиндикация загрязнений воздушной среды на основе замедленной флуоресценции хлорофилла листьев и феллодермы деревьев. Экология. 1999, N 4, С. 303 - 305.

100. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Рубин А.Б. Замедленная флуоресценция и ее использование для оценки состояния растительного организма// Изв. АН СССР. Сер. биол. 1985. № 4. С.508 - 520.

101. Пахарькова Н.В., Бучельников М.А., Григорьев Ю.С. Влияние промышленного загрязнения на относительный показатель замедленной флуоресценции хлорофилла хвои и листьев некоторых древесных растений г. Красноярска// Ботан. иссл. в Сибири. Красноярск. 1995. Вып. 6. С. 33 - 38.

102. Кирпичникова Т.В., Шавнин С.А., Кривошеева А.А. Состояние фотосинтетического аппарата хвои сосны и ели в зонах промышленного за-

грязнения при различных микроклиматических условиях // Физиология растений. 1995. Т. 42. № 1. С. 107 - 113.

103. Григорьев Ю.С., Бучельников М.А. Трансплантационная
ли-
хеноиндикация загрязнения воздушной среды на основе
замедленной
флуоресценции хлорофилла. Экология. 1997. N 6, С. 465 - 467.

104. Андерсон Ф.К., Трешоу М. Реакция лишайников на атмо-
сферное загрязнение. Загрязнение воздуха и жизнь растений. Л.:
Гидроме-
теоиздат, 1988. С. 295 - 326.

105. Инсарова И.Д., Инсаров Г.Э. Сравнительные оценки
чувстви-
тельности эпифитных лишайников различных видов к загрязнению
возду-
ха // Проблемы экологического мониторинга и моделирования
экосистем.
Л.: Гидрометеоиздат, 1989. Т. 12, С. 113 - 175.

106. Шапиро И.А. Физиолого-биохимические изменения у
лишай-
ников под влиянием атмосферного загрязнения // Усп. совр. биол.
1996. Т.
116. №2. С.158 - 171.

107. Трасс Х.Х. Классы полеотолерантности лишайников и экологи-
ческий мониторинг // Проблемы экологического мониторинга и моделиро-
вания экосистем. Л.: Гидрометеоиздат, 1984. Т. 7. С. 144 - 159.

108. Михайлова И.Н., Воробейник Е.Л. Эпифитные лишайники в
условиях химического загрязнения: зависимости доза - эффект. // Экология.
1995. № 6. С. 455 - 460.

109. Brodo ГМ. Transplant experiments with corticolous lichens using a new technique // Ecology. 1961. V.42. № 4. P. 838 - 841.

110. Brodo I.M. Lichens growth and cities: a study on Lohg Island, New York // The Bryologist. 1966. V. 69. № 4. P. 427 - 449.

111. LeBlanc F., Rao D.N. Effect of sulphur dioxide on lichen and moss transplants // Ecology. 1973. V. 54. № 3. P. 612 - 617.

112. Трасс Х.Х. Трансплантационные методы лихеноиндикации// Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. Л.: Гидрометеиздат, 1985. Т. 8. С. 140 - 144.

III

113. Реутова Н.В., Джамбетова П.М. Оптимальные тест-системы для I этапа генетического мониторинга загрязнения окружающей среды // Успехи современного естествознания. 2006. № 4. С. 77-78.

114. Джамбетова П. М., Реутова Н. В., Ситников М. Н. Влияние нефтезагрязнений на морфологические и цитогенетические характеристики растений // Экологическая генетика. 2005. Т. 3., № 4. С. 5-11.

115. Реутова Н. В., Воробьева Т. И., Реутова В. Некоторые подходы к оценке мутагенного влияния отходов промышленных предприятий на окружающую среду. //Генетика. 2005. Т. 41.,№6. С. 753-758.

116. Джамбетова П.М., Реутова Н.В. Чувствительность растительных и бактериальных тест-систем при определении мутагенного влияния нефтезагрязнений на окружающую среду // Экологическая генетика. 2006. Т. 4. № 1. С. 22-27.

117. Евсеева Т.И., Зайнулин В.Г., Исследования мутагенной активности атмосферного воздуха и снежного покрова г. Сыктывкара по тесту соматических мутаций в волосках тычинок традесканции (клон 02) // Экология.2000. №5. С. 343-348.

118. Федорова А.И., Катаев В.Н., Плахотина А.Ю. Биоиндикация мутагенного эффекта радона с использованием ядрышкового теста в клетках корней традесканции // Вестник ВГУ, Серия: Химия, Биология, Фармация. 2004. №2. С. 151-156.

119. Руководство пользователя ВИДЕОТЕСТ - КАРИО. Санкт-Петербург. 2008. 179 с.

120. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. 2008. Т.10. №3. С. 303-309.

121. Struwe M, Greulich KO, Suter W, Plappert-Helbig U. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutat. Res.* 2007; 632 (1-2): 44-57.

122. Chaubey RC. Computerized image analysis software for the comet assay. *Methods Mol. Biol.* 2005; 291: 97-106.

123. Francesconi A, Del Terra E, Meli A, Ambesi-Impiombato FS. Standardization of the comet assay technique on FRTL5 cells. *Phys. Med.* 2001; 17 (1): 232-234.

124. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность. Методические указания. Вильнюс, 1989. 35 с

125. Olive PL. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999; 75: 395-405.

126. Xie H, Wise SS, Holmes AL, et al. Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutat. Res.* 2005; 586 (2): 160-72.

127. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B. Single cell gel/ Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35: 206-21.

128. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, et al. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2004; 14 (6): 473-86.

129. Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, et al. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 2004; 19(1): 51-9.

130. Yamasaki H, Ashby J, Bignami M, et al. Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat. Res.* 1996; 353: 47-56.

131. Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, et al. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity

with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP Carcinogenicity Database. *Crit. Rev. Toxicol.* 2000; 30 (6): 629-799.

132. Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 96 (1): 1-2.

133. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, et al. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2004; 14 (6): 473-86.

134. Gocke E, Muller L, Guzzie PJ, et al. Considerations on photochemical genotoxicity: Report of the International Workshop on Genotoxicity. *Env. Mol. Mutagenesis* 2000; 35 (3): 173-84.

135. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств фармакологических и лекарственных средств. Ведомости Фармакологического комитета 1998; 1: 21-24.

136. Wirzinger G, Weltje L, Gercken J, Sordyl H. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? *Mutat. Res.* 2007; 628 (1): 19-30.

137. Gichner T, Ptacek O, Stavreva DA, et al. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mut. Res.* 2000; 470: 1-9.

138. Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, et al. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and US NTP Carcinogenicity Database. *Crit. Rev. Toxicol.* 2000; 30 (6): 629-799.

139. Frenzilli G, Scarcelli V, Fornai F, et al. The comet assay as a method of assessment of neurotoxicity: usefulness for drugs of abuse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1074: 478-81.

140. Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mut. Res.* 2000; 463: 13-3E

141. de Oliveira E, Suzuki MF, do Nascimento PA, et al. Evaluation of the effect of ⁹⁰Sr beta-radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mut. Res.* 2001; 476: 109-21.

142. Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SE. Human sperm DNA integrity assessed by the comet and ELISA assays. *Mutagenesis.* 1999; 14: 71-75.

143. Barbara Lah, Brigita Zinko, Tatjana Tisler, Romana Marinsek-Logar. Genotoxicity Detection in Drinking Water by Arnes Test, Zimmermann Test and Comet Assay//*Acta Chim. Slov.* 2005, 52, 341-348.

144. Капашин В.П., Пункевич Б.С., Зубрилин В.П. и др. Проблемные вопросы метрологического обеспечения уничтожения химического оружия // *Российский химический журнал.* 2002. Т. 46. № 6. С. 4-10.

145. Методика определения токсичности питьевых, природных, сточных вод, донных отложений, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов с использованием микроядрышкового теста на проростках семян и луковицах растений. Свидетельство об аттестации МВИ № 24.01.17.066/2009.

146. Методика определения токсичности питьевых, природных, сточных вод, донных отложений, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению уровня хромосомных aberrаций в апикальной меристеме проростков семян и луковицах растений. Свидетельство об аттестации МВИ № 224.01.17.067/2009.

147. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ// *Гигиенические критерии состояния окружающей среды.* № 51. - Женева: ВОЗ, 1989.-212с.

Глава 4. ПРИМЕНЕНИЕ В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

В последние годы исследователи при изучении состояния природных сред все чаще применяют методы биотестирования, в которых используются культуры клеток человека и животных. Подобный подход связан с необходимостью более глубокого изучения влияния антропогенных факторов на различные группы организмов и сложностями проведения исследований на животных тест-объектах. Главное преимущество культивируемых клеток - это возможность прижизненного наблюдения клеток. Существенно, что при работе с культурами клеток в эксперименте используются здоровые клетки и что они сохраняют жизнеспособность в течение всего эксперимента.

Нами рассмотрены возможности применения методов биотестирования на культурах клеток человека и животных при проведении экологического мониторинга, а также необходимое для этого лабораторное оборудование.

4.1. Клеточные культуры в системе биотестирования качества природных сред

Ни один из взятых отдельно методов биотестирования не позволяет сделать достаточно обоснованное заключение о токсичности природных сред. В связи с этим возникает необходимость использования нескольких биологических объектов и методов, т.е. систем тестирования [1]. Такие системы включают ряд представителей различных систематических групп организмов, а также культуры клеток, что позволяет дать более точную качественную и количественную оценку токсичности воды, почвы и воздуха.

Основные требования, предъявляемые к тест-системам, заключаются в следующем: повышенная чувствительность к воздействию загряз-

няющих веществ и возможность работы на уровне малых доз; быстрота и экономичность, воспроизводимость, т. е. возможность получения с помощью данной тест-системы результатов в пределах случайных ошибок другими специалистами аналогичного профиля; регистрация токсических эффектов не только самих веществ, но и их метаболитов. В то же время тест-системы должны обеспечивать возможность экстраполяции полученных результатов от условий воздействия токсикантов *in vitro* на условия *in vivo*, от одних типов клеток на другие, особенно от соматических к зародышевым, поскольку мутации именно последних создают реальную опасность изменения наследственности, от одних биологических видов на другие, в том числе на человека, обладающего исключительно низкими возможностями генетической адаптации к воздействию мутагенов.

Клетки, выращенные *in vitro*, сохраняют многие черты метаболизма исходных тканей хозяина и в то же время лишены тканевых и органных взаимосвязей, регуляторных влияний нервной и эндокринной систем, обладают весьма ограниченными компенсаторными возможностями. Эти особенности культур клеток дают возможность исследовать взаимодействие химических агентов с клеткой в «чистом виде», выявить изменения клеточных и субклеточных структур, которые в условиях целостного организма могут маскироваться или видоизменяться указанными выше компенсаторными и регуляторными механизмами на ранних этапах развития токсического процесса или при действии низких концентраций химических агентов.

Однако, клеточные тест-системы имеют ряд ограничений, обусловленных самой природой метода. Так, в исследованиях на культурах клеток не могут быть учтены такие важные с общетоксикологических позиций моменты, как путь поступления химического агента в организм, его распределение, выведение и другие вопросы токсикодинамики. Как и при применении других модельных тест-систем, экстраполяция полученных результатов на цело-

ственный организм требует большой осторожности, особенно когда речь идет о количественных показателях [2].

Метод биотестирования с использованием клеточных культур может заменить опыты на лабораторных животных по следующим причинам:

- дешевизна и доступность используемого материала (для выращивания клеточной культуры достаточно изъять клетки органов у 1-2 животных и полученные клеточные линии могут использоваться в течение длительного периода, в отличие от биомониторинга, в котором гибнут десятки и сотни животных;
- возможность быстрого получения результатов и прижизненного наблюдения за моделью в течение всего эксперимента;
- полученные клеточные линии сохраняют высокую видовую специфичность [3].

Кроме того, при исследованиях на клеточных культурах возможно использование радиоактивных изотопов для изучения биосинтеза белка и ДНК [4].

Перечень типов клеток, которые в настоящее время можно культивировать, достаточно велик. Это элементы соединительной ткани (фибробласты), скелетные ткани (кость, и хрящи), скелетные, сердечная и гладкие мышцы, эпителиальные ткани (печень, легкие, молочная железа, кожа, мочевой пузырь, почки), клетки нервной системы (глиальные клетки и нейроны, хотя последние лишены способности к пролиферации), эндокринные клетки (надпочечники, гипофиз, клетки островков Лангерганса), меланоциты и различные типы опухолевых клеток.

В научных исследованиях часто используются различные линии мышечных эмбриональных фибробластов, гетероплоидные клетки глиобластомы человека (GL-6), диплоидные эмбриональные клетки человека. Типичные

диплоидные клетки человека включают: клеточный штамм MRC-5 (ATCC, CCL 171), клеточный штамм WI-38 (ATCC, CCL 75) и клеточный штамм HEL 299 (ATCC, CCL 137), лимфобластоиды человека IM-9 (ATCC, CCL 159), штамм диплоидных клеток фибробластов легких эмбриона человека LBHEL (KCTC 0127 BP).

Клетки мезодермального происхождения (фибробласты, клетки эндотелия, миобласты) легче культивировать, чем эпителиальные клетки, нейроны и клетки эндокринных тканей.

Для выращивания клеточных культур, как правило, применяют следующие питательные среды: среда 199, Игла MEM и Игла в модификации Дульбекко с добавлением 10—15 % эмбриональной сыворотки плодов коровы. Для культивирования лимфобластоидной клеточной линии IM-9 используется среда MDM (Sigma, USA). В состав среды входят необходимые добавки: 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-глутамина, 0,1 % антибиотиков (пенициллин-стрептомициновый комплекс). Диплоидные эмбриональные клетки человека культивируют в виде монослоя в плоских флаконах.

Культуры, полученные из эмбриональных тканей, как правило, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с культурами из соответствующих «взрослых» тканей. Это отражает, по-видимому, более низкий уровень специализации и наличие реплицирующихся клеток-предшественников или стволовых клеток в эмбрионах. «Взрослые» ткани, как правило, характеризуются пониженным пролиферативным пулом и более высоким содержанием неделящихся специализированных клеток, часто ассоциированных с более структурированным и слабо дезагрегирующим внеклеточным матриксом. Получение первичных культур клеток «взрослых» тканей и их размножение являются более сложной задачей, и продолжительность жизни таких культур, как правило, невелика.

Для экотоксикологических исследований перспективно использовать культуру диплоидных эмбриональных клеток человека [5]. Преиму-

щества диплоидных эмбриональных клеток человека перед остальными культурами клеток следующие:

- высокая чувствительность к минимальным концентрациям любых субстанций и достаточная стабильность биологических свойств;
- генетическая однородность и сохранность свойств донора на протяжении 45-50 пассажей;
- абсолютная воспроизводимость результатов;
- отсутствие зависимости от человека донора для первичных клеток лимфоцитов и фибробластов;
- возможность моделирования, изучения и прогнозирования летальной, сублетальной и скрытой формы поражения клеток;
- возможность продолжительных наблюдений за поврежденными клетками.

Культуры клеток человека и животных как тест-объекты для исследования потенциальной токсичности и мутагенной активности промышленных загрязнителей широко используются в экотоксикологических исследованиях [6-11].

4.2. Оборудование для работы с культурами клеток

Технические средства, предназначенные для лаборатории культуры клеток, должны образовывать определенную систему. При подборе оборудования полезно составлять так называемые номенклатурные перечни. При этом все технические средства группируют по их месту в процессе работ с клеточными культурами:

- приборы и устройства, обеспечивающие работу с клеточными культурами; микроскопы;
- приборы и устройства для культивирования клеток;
- устройства для криоконсервации и хранения клеточных культур

[12].

Для получения сверхчистой и общелабораторной воды, используемой для приготовления питательных сред, мытья посуды, предназначенной для выращивания культур тканей и других целей, применяют установки ОВ-1, ОВ-2, ОВ-3. Установка ОВ-1 представляет собой последовательно соединенные установки ОВ-2 и ОВ-3. В практике работ с клеточными культурами часто возникает необходимость в массовом дозировании, отборе проб или разведении биологически активных жидкостей. Величина единичной дозы в большинстве случаев находится в диапазоне от 1 мкл до 10 мл. Жесткие требования предъявляют также к точности и воспроизводимости разовой дозы. Значительно облегчает проведение этой технологической операции использование автоматических или полуавтоматических устройств, которые в разных источниках называют дозаторами-дилюторами, автоматическими пипетками и т.п. Сменные наконечники можно подвергнуть паровой стерилизации и повторно использовать. За рубежом широко применяют устройства, относящиеся к малой лабораторной технике, не являющиеся по своей сути дозаторами, но значительно облегчающие этот процесс и делающие его более безопасным для оператора. Речь идёт о так называемых приборах «Pipet-Aid»; которые предназначены для отбора проб и выдачи дозы при работе с пастеровскими пипетками и любыми градуированными пипетками емкостью до 75 мл. Пипетку вставляют в специальный держатель, соединенный с малогабаритным вакуумным насосом. Отбор проб и дозирование проводят путем создания вакуума или избыточного давления в пипетке. Оператор управляет работой прибора с помощью кнопок, размещенных на держателе. Скорость набора и выдачи дозы регулируют с помощью установки производительности насоса или силой нажатия соответствующих кнопок управления. В данных приборах предусмотрена защита от попадания дозируемой жидкости в прибор, а также имеются воздушные фильтры, исключающие загрязнение дозируемой жидкости при выдаче дозы. Одним из основных требований к жидким питательным сре-

дам для клеточных культур является их стерильность, достигаемая, в частности, с помощью так называемой стерилизующей фильтрации, освобождающей питательные среды от примесей, бактерий и коллоидов. Различают микро- и ультрафильтрацию сред. При микрофильтрации из жидкости удаляют частицы примесей и бактерии размером от 0,25 до 10 мкм. Ультрафильтрация позволяет извлечь из раствора очень мелкие частицы и коллоиды, а также молекулы растворенных веществ с молекулярной массой от 1000 до 1.000.000. Мембранные фильтры, пригодные для очистки питательных сред, производят ряд фирм. Наиболее широкое применение в практике нашли миллипоровые фильтры. Размеры мембранных фильтров (13, 25, 47, 90, 142 и 293 мм) стали в какой-то мере стандартными. Для фильтрации средних по объему количеств питательных сред (25-50 л) наиболее удобны установки с мембранными фильтрами диаметром 90 и 142 мм. В общем случае установка для стерилизующей фильтрации состоит из системы, предназначенной для создания избыточного давления на фильтруемую жидкость, стерилизуемого держателя фильтра, фильтрующей мембраны, трубопроводов и сосудов для размещения фильтруемой жидкости и фильтрата. При подборе и расчете фильтрующей системы рекомендуется предварительно сформулировать задачу (вид среды, подлежащей фильтрации, ее температура, вязкость, химический состав, размер частиц, подлежащих фильтрации, режим фильтрации - непрерывный или порционный и т.п.) и подобрать соответствующие мембрану и держатель, а также определить величину избыточного давления, необходимого для фильтрации.

Стерильность при работе с культурами клеток обычно достигается путем проведения исследования в ламинарных боксах.

Для очистки клеток было разработано несколько подходов, в том числе высокоэффективная сортировка на основе мультипараметрического иммунофенотипирования или иммунофенотипирование в сочетании с функциональными тестами. Высокопроизводительный сортер клеток MoFlo позволяет выделить необходимую популяцию клеток. Окрашенные

клетки загружаются в MoFlo. При помощи программного обеспечения Summit, по отношению прямого и бокового рассеяния идентифицируется основная клеточная популяция. Затем по отношению синей и красной флуоресценции красителя Hoechst 33342 идентифицируется минорная популяция клеток. Очищенные клетки полностью сохраняют функциональные свойства, что делает возможным их долгосрочное культивирование.

Для подсчета количества клеток часто используется электронный счетчик Коултера (Coulter counter Multisizer II).

Лабораторные термостаты для культивирования клеток должны отвечать определенным требованиям: обеспечивать высокую стабильность заданной температуры, создавать минимальный градиент температуры по полезному объему, иметь систему быстрого восстановления температуры после кратковременного охлаждения. Внутренняя поверхность термостатов должна быть изготовлена из биологически пассивных материалов, т.е. не влияющих на жизнедеятельность клеток и стойких к воздействию компонентов питательных сред. Материалы, из которых изготавливают внутренние и наружные части термостата, и покрытия должны выдерживать деконтаминацию водными растворами спирта-ректификата и стерилизацию УФ-излучением. Современные модели этих приборов имеют полезный объем от 20 до 1400 л. Полезный объем образуется полированными пластинами из нержавеющей стали или меди (у дорогих моделей). Как правило, термостаты имеют наружную и внутреннюю двери. Последнюю изготавливают из прозрачного материала, что позволяет наблюдать за содержимым термостата без нарушения температурного режима: Многие модели подобных приборов имеют секционную внутреннюю дверь, обеспечивающую доступ в термостат с минимальным нарушением теплового режима в полезном объеме. Температуру в рабочей камере термостатов обычно можно задавать в диапазоне от превышающей комнатную на 5 °C до 80 °C. В некоторых моделях термостатов имеется встроенная холодильная установка, позволяющая задавать температуру в диапазоне от -10 до 80 °C и поддерживать её при помещении в полезный объем приборов, выделяю-

щих дополнительное тепло, например роллерных установок, встряхивателей и т.п.

В связи с необходимостью поддержания постоянного рН питательной среды и ее минимального испарения в период инкубации клеток были созданы специальные приборы, предназначенные для этой цели, — так называемые углекислотные инкубаторы. По своей конструкции и основным параметрам они полностью соответствуют описанным выше термостатам. Основным отличием является наличие систем создания и поддержания определенного состава газовой среды в полезном объеме и высокой относительной влажности в нем. В газовой среде камер углекислотного инкубатора повышена концентрация кислорода и углекислого газа, в большинстве случаев только углекислого газа; концентрацию задают в зависимости от условий культивирования и поддерживают автоматически с точностью до $\pm 0,1$ %. Современные модели этих приборов позволяют регулировать количество кислорода и углекислого газа в диапазоне от 1 до 95 об. %.

Для оперативного получения качественной информации о состоянии культивируемых клеток используют специальные инвертированные микроскопы. Принцип инвертированности (перевернутости) заключается в том, что объект наблюдения освещается сверху, а наблюдение ведется через объективы, расположенные под объектом. Это позволяет наблюдать за живыми клетками в культуре, т.е. непосредственно в сосудах, где происходит процесс их роста. В микроскопах с обычной оптической схемой исключается возможность помещения таких сосудов между столиком, и объективом из-за недостаточности этого расстояния [13].

Табл. 8. Основное лабораторное оборудование для работы с клеточными культурами

Наименование	Количество
1. Ламинарный бокс	2
2. Инкубатор CO ₂	1
3. Центрифуга с охлаждением	1
4. Микроскоп инвертированный	1
5. Весы лабораторные	1
6. Сосуды Дьюара	2
7. Лампы кварцевые бактерицидные	2
8. Холодильник с морозильной камерой	2
9. Сортиер клеток MoFlo	1
10. Термостат-шейкер для планшетов	1
11. Вортекс для пробирок	1
12. Термостат суховоздушный	1
13. Центрифуга ОПН-3	1
14. Счетчик Коултера	1
15. ELISA-ридер	1

Основное оборудование, которое необходимо для работы с клеточными культурами представлено в табл. 8.

В заключение, следует отметить, что культуры клеток человека и животных при биотестировании необходимо использовать в составе системы тест-объектов, которые относятся к различным систематическим группам организмов. Только при этом условии применение культуры клеток человека и животных в качестве тест-объекта существенно повышает качество экотоксикологического анализа природных сред в зоне влияния опасных промышленных предприятий.

Литература

1. Чупис В.Н., Лушай Е.А., Ларин И.Н., Загреков А.А., Ильина Е.В., Иванов Д.Е. Система биотестов для экологического мониторинга // Экология и промышленность России,- 2008, №1, январь, с.44-45.

2. Рязанова Р.А., Елизарова О.Н., Василос А.Ф., Шройт И.Г., Дмитриенко В.Д. Применение метода клеточных культур для исследования биологического действия пестицидов (методические рекомендации) // В кн. Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды. М.1999. С. 50-68.

3. Михайлова Л.П. Возможности и области применения метода биоиндикации на клеточных культурах человека и животных <http://www.sinor.ru/-Che/bio.htm>

4. Hasspieler B.M., Haffner G.D, Adeli K. In vitro toxicological methods for environmental health testing. - 1996, №4, p. 213-227.

5. Червонская Г.П., Панкратова Г.П., Миронова Л.Л., Крючкова Г.П., Фрейдин М.И. Методические указания по использованию культуры диплоидных эмбриональных клеток человека, рекомендуемых для токсиколого-гигиенических исследований // В кн. Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды (методическое пособие). М.1999. с. 79-88.

6. Виталиев А.Б., Туребаев М.Н., Елемесова М.Ш., Бигалиева Р.К. Культура клеток как тест-система для исследования потенциальной мутагенной активности промышленных загрязнителей // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып.2. М., Изд-во «Мысль». 1977. С. 74-84.

7. Дубинина Л.Г. Культура лейкоцитов человека как тест-система при анализе мутагенности факторов среды // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып.1. М., Изд-во «Наука». 1977. С. 89-95.

8. Бочков Н.П., Кулешов Н.П., Журков В.С., Яковенко К.Н. Изучение спонтанных хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов человека // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. Вып.1. М., Изд-во «Наука». 1977. С. 106-110.

9. Hasspieler B.M. Toxicological assessment of industrial solvents using human cell bioassays: assessment of short-term cytotoxicity and long-term genotoxicity potential // Toxicology and Industrial Health.- 2006, V.22, №7, p.301-315.

10. Hasspieler, B., Haffner, D., Adeli, K. Human bioassays to assess environmental genotoxicity: development of a DNA break bioassay in HepG2 cells // Clinical Biochemistry. - 1995, V. 28, p. 113-116.

11. Dambach D. M., Andrews B. A., Moulin F. New Technologies and Screening Strategies for Hepatotoxicity: Use of In Vitro Models // Toxicologic Pathology. - 2005, V. 33, № 1, p. 17-26.

12. Культивирование клеток и тканей. «ЛабОБШтория» (www.primer.ru), 2003.

13. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. - М.: Мир, 1983, 263 с.

Глава 5. СИСТЕМА ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЗОНЫ ВЛИЯНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОБЪЕКТОВ

Оценка качества природных сред имеет специфику в зависимости от целевой установки. В ряде случаев требуется быстро и достоверно произвести оценку качества природных сред. Такие ситуации могут возникнуть, например, при авариях на химических заводах. В случаях подобным чрезвычайным ситуациям важно в кратчайшие сроки оценить экологическую обстановку в районе опасного промышленного объекта и принять адекватные меры.

Для экспресс-оценки качества природных сред нами предложена система биотестов, которая включает в себя следующие тест-объекты: цериодафнии (*Ceriodaphnia qffinis*), дафнии (*Daphnia Magna Straus*), хлореллу (*Chlorella vulgaris Beijer*), инфузории (*Paramecium caudatum*), люминесцентные бактерии (*Escherichia coli* — рекомбинантный штамм М-17) и семена кресс-салата (*Lepidium sativum*). Используемые в многокомпонентной тест-системе организмы относятся к низшим и высшим растениям, бактериям, беспозвоночным одноклеточным и многоклеточным животным.

Инфузория-туфелька относится к простейшим одноклеточным животным (рис.27). Основную пищу инфузории составляют бактерии и дрожжи. Размножение происходит путем поперечного деления клетки. Время генерации может составлять от нескольких часов до нескольких суток. Скорость движения инфузории при комнатной температуре — 2 мм/с. Изменение внешних условий (температура, химический состав среды и др.) воспринимаются клеткой, и первая ответная реакция — изменение характера движения: уменьшение или увеличение скорости, частоты остановок и разворотов,

разнообразные таксисы. Инфузория-туфелька широко распространена в пресных водоемах.

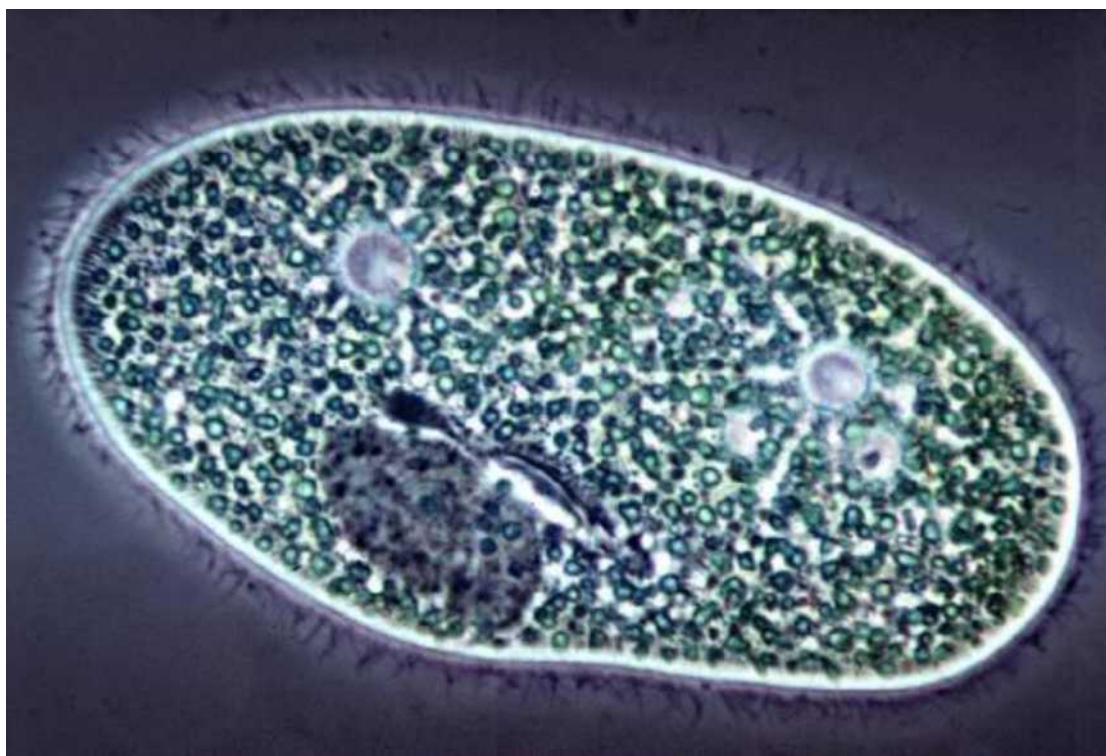


Рис.27. Инфузория-туфелька

Дафнии относятся к низшим ракообразным, отряду ветвистоусых (рис.28). При оптимальных условиях культивирования дафнии размножаются без оплодотворения — партеногенетически (рождаются только самки). При резком изменении условий существования или культивирования (похолодание, голод, перенаселенность и др.) в культуре появляются самцы. Резкое изменение условий существования вызывает переход к половому размножению. По характеру питания относятся к фильтраторам, в природе дафнии питаются взвешенными в воде бактериями, одноклеточными водорослями, растворенными органическими веществами.

Люминесцентные бактерии (генно-инженерные бактерии *Escherichia coli*, M-17) содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений.



Рис.28. Дафния

Хлорелла — одноклеточная зеленая водоросль (рис.29). Размножение бесполое — автоспорами, образующимися в результате деления содержимого материнской клетки. Деление происходит, как правило, один раз в сутки, однако в условиях интенсивной культуры она способна и к более активному размножению (4-6 делений в сутки). Кресс-салат является однолетним высшим растением.

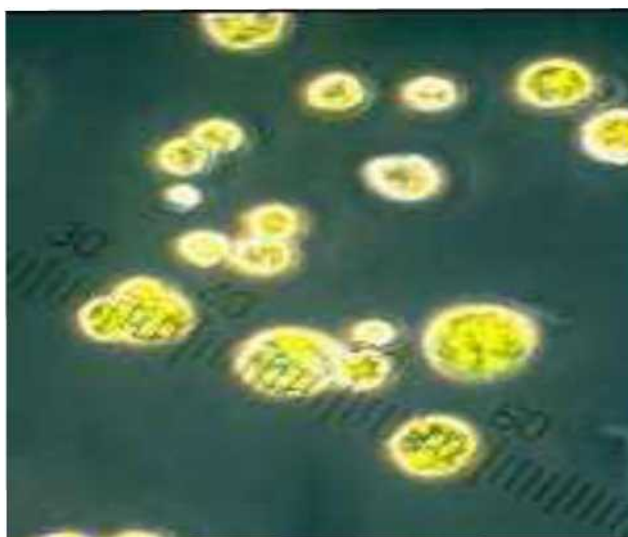


Рис. 29 Хлорелла

Критериями острой токсичности почвы и воды являются такие показатели, как смертность цериодафний и дафний [1,2], изменение оптической плотности культуры водоросли хлорелла (снижение средней величины оптической плотности по сравнению с контрольным вариантом на 20% и более или ее повышение на 30% и более) [3]. Метод определения токсичности с помощью инфузорий основан на способности тест-объектов реагировать на присутствие в пробах веществ, представляющих опасность для их жизнедеятельности, и направленно перемещаться по градиенту концентраций этих веществ (хемотаксическая реакция), избегая их вредного воздействия [4]. В опытах с кресс-салатом изучается количество проросших семян и длина корешков по сравнению с контролем [5]. Токсичность оценивается по наиболее чувствительному тест-объекту.

Продолжительность биотестирования пробы с помощью цериодафний, дафний и семян кресс-салата составляет 48 часов. Биотестирование на хлорелле проводится в течение 22 часов, а на инфузориях и бактериях — 2 часа. Аппаратура для биотестирования проб на хлорелле разработана в Красноярском Государственном Университете профессором Ю. С. Григорьевым (рис.30).

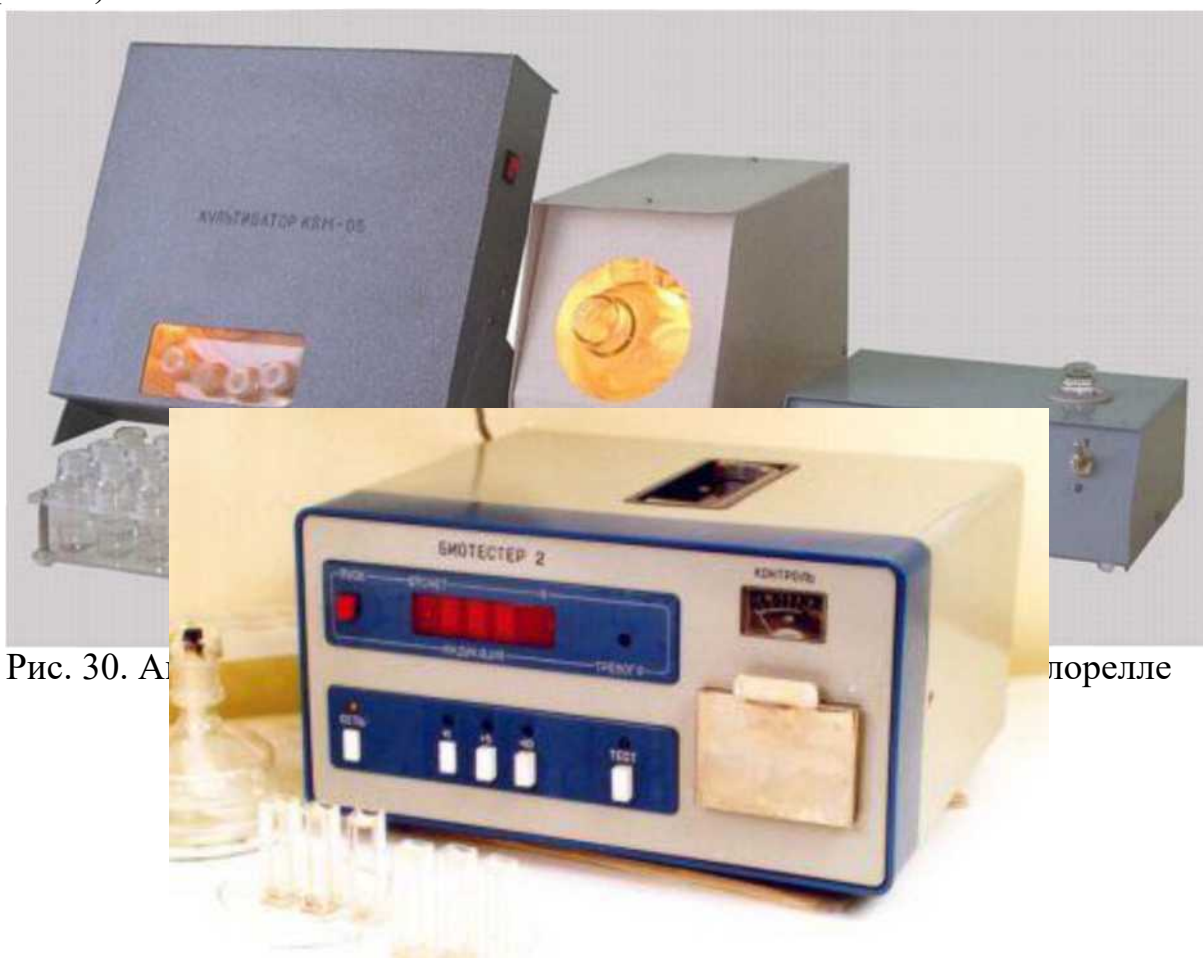


Рис. 30. А

лорелле

Рис 31. Прибор Биотестер-2

Биотестирование с помощью инфузорий проводится на импульсном фотометре «Биотестер-2» (рис.31), который разработан фирмой «Спектр-М» (г. Санкт-Петербург). Интенсивность биолюминесценции бактерий оценивается с помощью люминометра «Биотокс-10М» [6] (рис.32).

Для экспресс-оценки качества природных сред можно использовать методику определения токсичности окружающей среды с помощью цериодафний при $t=36\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Рис. 32. «Биотокс-10М»

Методика основана на повышении чувствительности организма при повышении температуры культивационной среды и процедура биотестирования длится всего два часа [7]. Применение этой методики позволяет значительно сократить сроки определения загрязнения окружающей среды по сравнению с общепринятыми классическими.

Существует также экспресс-методика оценки токсичности по степени заполнения пищеварительного тракта дафний. Эта методика основана на изменении пищевых рефлексов у дафний и цериодафний при нахождении в токсичной среде. В этих условиях у тест-объектов нарушается поглощение корма (зеленых водорослей) и, просматривая их под микроскопом, можно

обнаружить незаполненный пищеварительный тракт. У контрольных особей желудок и кишечник имеют интенсивную зеленую окраску, что свидетельствует о физиологически нормальном поглощении водорослей [8].

Для более полной экотоксикологической оценки качества природных сред необходимо дополнительно проводить изучение генотоксичности с помощью экспресс-тестов «Mutatox», «GreenScreen EM» и «SOS-Chromotest». Тест-объектами для определения мутагенности являются бактерии и дрожжи [9,10].

Литература

1. Григорьев Ю. С., Таттатткова Т. Л. Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной, природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia Magna* Straus. — М., 2006. — 44 с.
2. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодovitости цериодафний. — М.: Акварос, 2001. — 52 с.
3. Григорьев Ю. С. Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла. — Красноярск: КГУ. — 2004. — 19 с.
4. Методика определения токсичности проб вод (природных, хозяйственных-но-питьевых, промышленных сточных) экспресс-методом с применением прибора «Биотестер». — СПб.: Спектр-М, 2005. — 13 с.

5. Остроумов С.А. Некоторые аспекты оценки биологической активности

ксенобиотиков // Вестник Московского Университета. — Серия Биология. — 1990,—№2, —С. 27-34.

6. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». МПР РФ.— М.,2004. — 16 с.

7. Jun B.H., Lee S.I., Ryu H.D., Kim Y.J. Temperature-based rapid toxicity test using *Ceriodaphnia dubia* //Water Science & Technology, 2006. — Vol. 53. № 4-5. — P. 347-355.

8. Lee S.I., Na E.J., Cho Y.O., Koopman B., Bitton G. Short-Term Toxicity Test Based on Algal Uptake by *Ceriodaphnia-Dubia* //Water Environment Research, 1997, —V. 69. № 7. — P. 1207-1210.

9. Canna-Michaelidou S., Nicolaou A.S. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus // Sci. Total. Environ., 1996. — V. 193. №1. — P. 27-35.

10. Daniel M., Sharpe A., Driver J. et al. // Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents // J. Environ. Monit., 2004. №6. —P. 855 - 865.

Глава 6. БИОМОНИТОРИНГ ЗОНЫ ВЛИЯНИЯ ОПАСНЫХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

6.1. Оценка качества воды водоема-охладителя Балаковской атомной электростанции методами биомониторинга.

Атомная электростанция является опасным промышленным объектом, требующим пристального внимания экологических служб. Поэтому в настоящей работе нами была проведена оценка методами биомониторинга качества воды водоема-охладителя Балаковской АЭС (Саратовская область).

Работа всех тепловых и атомных электростанций основана на одном принципе. Электроэнергия вырабатывается при передаче тепла от нагретого в реакторе пара к «холодильнику» - окружающей среде. При этом большая часть энергии топлива как отходы производства рассеивается в окружающей среде. В качестве наиболее доступного и удобного теплоносителя используется вода. Существует два основных способа водоснабжения станций.

При использовании закрытого способа нагретая вода для охлаждения поступает в башню-градирню. Водоем-охладитель при этом не используется, но на крупных станциях такой метод охлаждения невыгоден.

В открытом способе в качестве холодильника используется водоем-охладитель. В этом случае схема водоснабжения может быть «прямоточной», когда вода проходит охлаждающие агрегаты станции только один раз. Этот способ обычно реализуется на крупных реках или водохранилищах. Водозабор находится выше по течению от водосброса. При «оборотной» схеме вода сбрасывается в замкнутый водоем-охладитель, водосброс по возможности отдаляется от водозабора, и в агрегаты станции поступает уже в той или иной степени охладившаяся вода. Электростанции забирают из водоемов массы воды и сбрасывают их обратно подогретыми на 8-12°C. Средний расход охлаждающей воды на 1000 МВт получаемой энергии составляет для ТЭС 30

м³/с, а для АЭС - 50 м³/с. Иными словами с точки зрения расхода воды атомные электростанции менее экономичны, чем тепловые [1,2].

Эксплуатация водоемов-охладителей сопровождается подогревом воды и усилением испарения с поверхности водоемов, что приводит к изменению микроклимата прилегающей территории. В водоеме-охладителе усиливается циркуляция и перемешивание воды за счет течений от водосброса и забора станции. Существуют и другие побочные влияния на водоем-охладитель со стороны электростанции. В водоем-охладитель могут поступать стоки с промышленной площадки станции и из цеха химической водочистки, нефтепродукты, тяжелые металлы, бытовые загрязнители.

Для оценки качества воды мы использовали систему биотестов, в которой тест-объектами являлись люминесцентные бактерии, дафнии, бокоплавы и хлорелла.

Острое токсическое действие растворов на бактерии определялось по гашению их биолюминесценции за 30-ти минутный период экспозиции [3].

Влияние на рост водоросли хлореллы (*Chlorella vulgaris* Beijer) изучали с помощью методики [4]. Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде не содержащих токсических веществ (контроль) и тестируемых проб, в которых эти вещества присутствуют. Критерием токсичности воды являлось снижение на 20% (подавление роста) или увеличение на 30% (стимуляция роста) величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов на тестируемом растворе, по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде.

Влияние проб воды на смертность дафний (*Daphnia magna* Straus) исследовали с помощью методики [5], позволяющей достоверно определить степень токсичности среды. Острое токсическое действие исследуемых проб на дафний определяли по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности являлась гибель 50% и бо-

более тест-объектов за 96 часов в исследуемом растворе при условии, что в контрольном эксперименте их гибель не превышала 10%.

Сбор бокоплавов проводился по общепринятым гидробиологическим методикам на мелководьях (до 1 м) в верхней зоне Волгоградского, на приплотинном участке Саратовского водохранилища и водоеме-охладителе БАЭС (Саратовская область). На станциях 1-6 было взято 20 выборок и на станциях 1 и 3-5 - 10 выборок (рис. 33, табл. 9), в общей сложности исследовано 2462 особи бокоплавов.

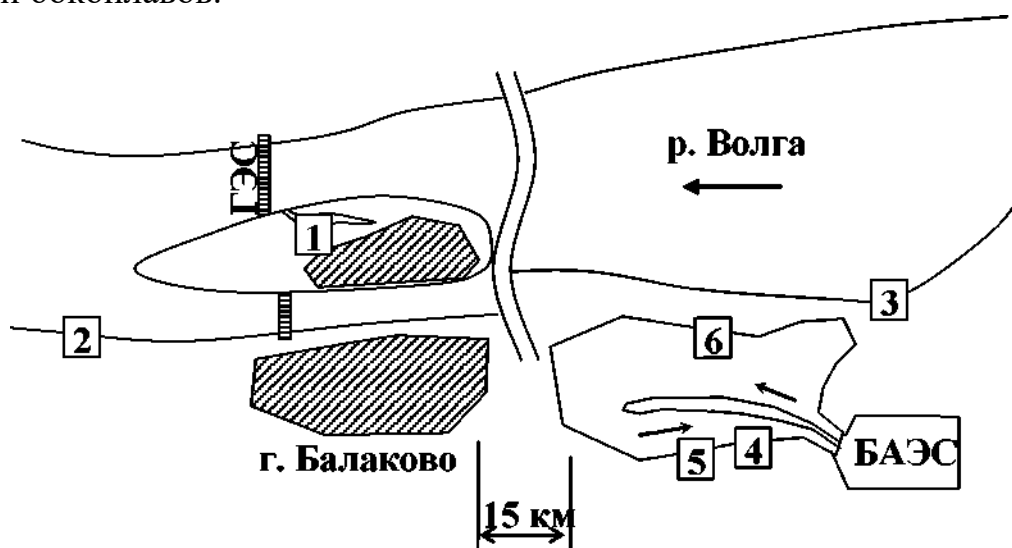


Рис. 33. Схема расположения мест отбора бокоплавов для биоиндикации.

Для определения плотности популяций бокоплавов отбирали количественные пробы. Материал фиксировали 70% спиртом [6]. Определение видов осуществляли по определителю пресноводных беспозвоночных [7].

При обработке проб у животных отмечали отклонения от нормальной морфологии глаз, пигментные пятна на месте обломанных конечностей и повреждений кутикулы, укороченные конечности как результат незаконченной регенерации.

Для определения природы изменчивости использовали критерии В.М. Захарова [8,9].

Таблица 9 - Описание мест отбора проб

№	Станции	t воды, °C		Тип грунта	Плотность популяций бокоплавов (ранговые значения)
		июнь	май		
1	Р. Балаковка, приток р. Волги, у городского водозабора	22.0	5.0	мелкий заиленный щебень	II
2	Р. Волга ниже БАЭС и г.Балаково	22.5	-	песок	III
3	Р. Волга выше БАЭС и г. Балаково, мелководный прогреваемый залив	25.5	0.5	мелкий песок	V
4	Холодноводный канал пруда-охладителя БАЭС	28.5	13.3	песок	IV
5	Холодноводный канал пруда-охладителя БАЭС	28.6	12.6	щебень	VI
6	Тепловодный канал	31.5	-	песок	I

Ненаправленность различий между сторонами определяли по Б.Л. Астаурову (1927) с использованием ϕ критерия Фишера и подтверждали по z критерию знаков. Взаимосвязь проявления признака на правой и левой сторонах тела оценивали по коэффициенту корреляции Фехнера (r_{ϕ}). Достоверность различий между разными выборками по доле особей с морфологическими нарушениями при попарном сравнении проверяли по ϕ критерию Фишера.

Статистическая обработка выполнена с использованием пакетов программ Excel 2000, Matcad 2000 Pro, Statistica 6.0.

При биотестировании проб (№ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,16) на бактериях обнаружена острая токсичность у шести проб воды водоема-охладителя (№ 2,3,4,5,6,7, Таблица 10). Острая токсичность отсутствует у проб №1,8,9,11,12,16. Точка №1 находится в районе насосной станции подпитки водоема-охладителя АЭС, а точки № 8,9,11,12,16 находятся в акватории реки Волги и вода там чище, чем в других местах отбора проб (рис.34).

Карта-схема водоема-охладителя Балаковской АЭС с указанием точек отбора проб воды изображена на рис. 34

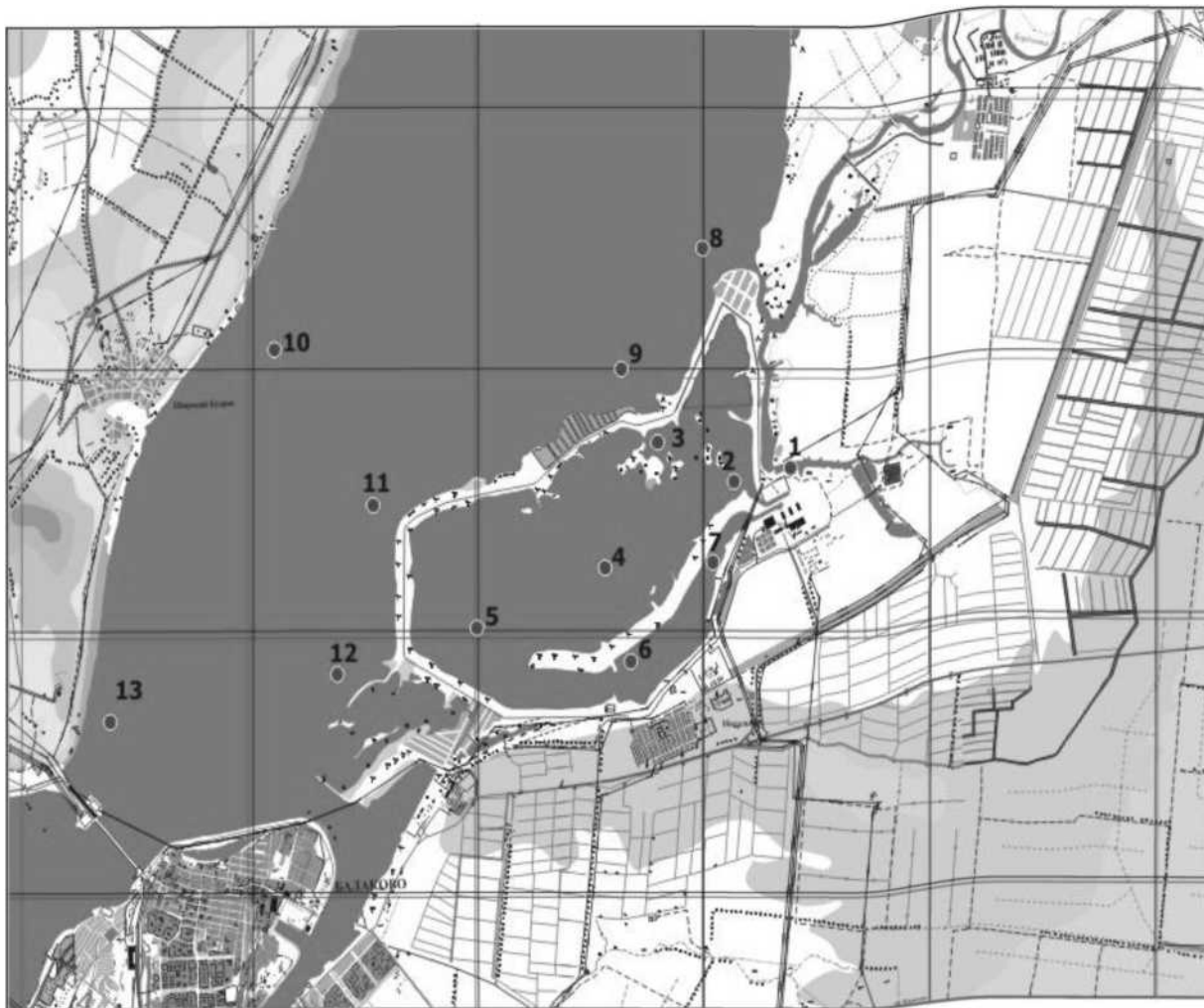


Рис. 34. Схема расположения точек отбора проб воды для биотестирования

Кроме этого, проведено биотестирование семи проб из водоема-охладителя (№ 1,2,3,4,5,6,7) на хлорелле. Установлено, что пробы № 1,2,6,7 - слаботоксичны, № 4,5 - среднетоксичны и №1,2,6,7 - слаботоксичны (таблица 11).

При биотестировании на дафниях пробы не оказывали острого токсического действия (таблица 12). Однако, имелась тенденция большей смертности дафний в пробах из водоема-охладителя (точки № 2,3,4,5,6,7) по сравнению с пробами из акватории реки Волги (8,9,10,11,12,14,15,16).

Таблица 10 - Результаты биотестирования проб воды (тест-объект - люминесцентные бактерии)

№ точек	Степень разбавления тестируемых вод, %	Норматив 1)T<20 2)20<T<50 3)T>50	Индекс токсичности (Т)	Г руппа токсичности
1	100	T<20	0	Проба не токсична
2	100	T>50	65,91±5,47	Проба сильно токсична
3	100	T>50	78,38±2,76	Проба сильно токсична
4	100	T>50	58,07±6,65	Проба сильно токсична
5	100	T>50	86,28±7,00	Проба сильно токсична
6	100	T>50	78,65±2,37	Проба сильно токсична
7	100	T>50	88,38±3,76	Проба сильно токсична
8	100	T<20	0	Проба не токсична
9	100	T<20	0	Проба не токсична
11	100	T<20	0	Проба не токсична
12	100	T<20	0	Проба не токсична
16	100	T<20	0	Проба не токсична

Таблица 11 - Результаты измерения оптической плотности тест культуры хлореллы

№ то-чек	Степень раз-бавления тестируемых вод, %	Результаты ана-лиза (оптическая плотность)	Про-центное отклоне-ние от контроля	Оценка качества исследованной среды: оказы-вает (не оказывает) ост-рое токсическое дейст-вие
1	100 33	0,203 0,363	34 -17	слаботоксичная

Таблица 12 - Результаты определения смертности тест культуры дафнии магны

№ точки	Степень раз-бавления тестируемых вод, %	№ пробы	Степень раз-ведения, %	Результаты ана-лиза (смертность, %)	Оценка тестируемой пробы
2		1	100 30 1	7 4 0	Не оказывает острое токсическое действие
3		2	100 30 1	10 7 0	Не оказывает острое токсическое действие
5		3	100 30 1	0 0 0	Не оказывает острое токсическое действие
		4	100 30 1	10 7 0	Не оказывает острое токсическое действие
6		5	100 30 1	0 0 0	Не оказывает острое токсическое действие
		6	100 30 1	7 4 0	Не оказывает острое токсическое действие
7		7	100 30 1	13 9,3 0	Не оказывает острое токсическое действие

Уровень флуктуирующей асимметрии измеряли с использованием двух дублирующих методов: по доле асимметричных особей в выборке, а также по частоте проявления нарушений развития глаз (отношения количества глаз, ненормальной для данного вида формы или развития к общему числу глаз в выборке). Статистически значимых различий уровня флуктуирующей асимметрии между выборками, взятыми весной обнаружено не было. Это, возможно, связано с их небольшим объемом, и с большей однородностью условий среды внутри водоема. Между более объемными летними пробами отмечен ряд статистически значимых различий (табл. 13).

Флуктуирующая асимметрия считается показателем стабильности развития, неспецифически возрастающим при любом стрессовом воздействии на организм. Уровень этого показателя в популяциях, расположенных на экологической и географической периферии ареала вида, обычно выше, нежели в центральных и благополучных популяциях. В географически удаленных друг от друга популяциях уровень флуктуирующей асимметрии может значительно отличаться в силу ряда причин: центрального или периферического положения популяции в пределах ареала, климатических особенностей и т.д. Отбор проб проводили на станциях, располагающихся на относительно небольшом отдалении друг от друга (около 15 км, см. рис 33), что позволило избежать влияния на результат различий между географически удаленными популяциями. Поэтому можно утверждать, что все различия стабильности развития между особями из разных популяций наблюдались в силу локального действия экологических факторов. Различия уровня флуктуирующей асимметрии в разных популяциях могут также объясняться различной плотностью животных в них. Между ними обычно отмечается положительная зависимость.

У *Ch. warpachowskyi* наименьший уровень флуктуирующей асимметрии отмечен на станциях с максимальной и минимальной плотностью (см. таб.). Наибольшее же количество асимметричных особей обнаружено со средними значениями численности. Соответствие между плотностью популяции и уровнем флуктуирующей асимметрии хорошо прослеживается у *P. robustoides*, противоположная картина наблюдается у *St. dzjubani*. Если бы фактор численности оказывал существенное влияние на стабильность разви-

тия бокоплавов, то следовало бы ожидать какой-либо взаимосвязи между ними. Однако четкой зависимости между этими популяционными показателями не наблюдается, т.е. фактор численности невозможно отнести к определяющим и влияние его на развитие бокоплавов незначительное.

Нами был зарегистрирован низкий уровень флуктуирующей асимметрии в популяциях бокоплавов обитающих в водоеме-охладителе по сравнению с волжскими популяциями, что указывает, как минимум, на отсутствие значительного отрицательного влияния на экосистему водоема.

В силу специфики водоема-охладителя в него постоянно поступают избыточные количества тепла. В результате его гидрологические и гидрохимические характеристики сильно отличаются от фоновых значений в прилегающих водоемах. Следствием постоянного испарения с поверхности считается избыточное содержание минеральных солей в нем. Температура держится в среднем на 10°C выше, чем в водоемах с естественным температурным режимом. Столь значительная разница в условиях обитания существенно сказывается на развитии организмов. Избыточная соленость накладывает отпечаток на существование бокоплавов в водоеме-охладителе БАЭС. Большинство обитающих в нем видов бокоплавов - эвригалинные виды, относительно недавно совершившие экспансию в пресные водоемы. Они нашли для своего развития в водоеме-охладителе более благоприятные условия. Их развитие в водоеме статистически значимо стабильнее, чем в пресной речной воде р.Волги. Однако не все достоверные различия в уровне флуктуирующей асимметрии между выборками объясняет эта гипотеза. Так, в пределах водоема-охладителя содержание солей на разных станциях не имеет существенных отличий, но стабильность развития в выборках с разных станций значимо различается.

Все статистически достоверные случаи различия уровня флуктуирующей асимметрии отмечены между выборками со станций с различной температурой. При этом уровень стабильности развития амфипод значимо выше на участках водоемов с более высокой температурой. Этот феномен можно объяснить генезисом фауны амфипод Волжского бассейна. Большинство исследованных нами видов относятся к понто-каспийской фауне и имеют температурный оптимум выше, чем у древнепресноводных видов. Следует отметить,

что в жаркие летние месяцы ракообразные отсутствовали в непосредственной близости от водосброса БАЭС, где температура воды достигала 37-40 °С. Этот феномен связан с их высокой оксифильностью. Летом бокоплавы находили оптимальные условия для своего развития на значительном удалении от БАЭС при температуре воды не более 32 °С.

Для многих видов животных обнаружены циклические сезонные изменения уровня флуктуирующей асимметрии в популяциях, обычно связанные с различием стабильности развития особей разных генераций. Подобное явление обнаружено нами у большинства исследованных видов. Уровень флуктуирующей асимметрии в летних выборках выше, чем в весенних (табл. 13).

Таблица 13 - Различие уровня флуктуирующей асимметрии в выборках особей весенней (над чертой) и летней (под чертой) генераций

Вид	№ станции	Количество особей в выборке	Частота асимметрии, %	Частота проявления признака, %
<i>Ch. ischnus</i>	5	8	37.5	31.3
		31	16.1	8.1
<i>Ch. warpachowskyi</i>	4	231	23.8	17.7
		121	18.2	11.6
<i>D. villosus</i>	5	138	10.1	2.4
		44	2.3	1.1
<i>P. robustoides</i>	1	17	57	М
		60	6.7	4.2
	4	54	18.5	13.9
		20	5.0	2.5
<i>P. sarsi</i>	3	69	87	67
		24	8.3	4.2
<i>St. dzjubani</i>	3	441	М	67
		374	13.6	9.4
<i>M. wohli</i>	4	112	13.4	87
		31	9.7	4.8

Радиационная обстановка в г. Балаково и районе БАЭС соответствует уровню естественных фоновых значений для европейской части страны и уровню, который был до строительства станции и составляет от 8 до 15 мкР/ч [10].

Связь стабильности развития амфипод с температурным режимом водоемов и другими факторами среды может оказаться перспективной для эко-

логических и биомониторинговых исследований. В дальнейшем представляется перспективным выяснение последовательности экспансии видов понтон-каспийской фауны на север в межледниковые периоды. На основании таких данных можно прогнозировать трансформацию таксоценозов амфипод как естественных водоемов в условиях многолетних климатических изменений, так и техногенных при изменении режима их эксплуатации.

Анализ характера морфологической изменчивости глаз амфипод показал, что данный тип изменчивости является флуктуирующей асимметрией. Установлено, что между температурой воды и стабильностью развития бокоплавов существует прямая зависимость. В пределах нормы реакции бокоплавов повышение температуры уменьшает уровень флуктуирующей асимметрии в популяции, т.е. стабильность онтогенеза возрастает

Необходимо отметить следующие результаты исследования.

Характера морфологической изменчивости глаз амфипод показал, что данный тип изменчивости является флуктуирующей асимметрией.

Установлено, что между температурой воды и стабильностью развития бокоплавов существует прямая зависимость. В пределах нормы реакции бокоплавов повышение температуры уменьшает уровень флуктуирующей асимметрии в популяции, т.е. стабильность онтогенеза возрастает.

Содержание солей в водоеме-охладителе Балаковской АЭС почти в три раза выше, чем в реке Волге. Высокая концентрация солей в воде может оказывать негативное влияние на одноклеточные организмы. По-видимому, этим можно объяснить обнаруженную в нашем исследовании большую жизнеспособность дафний и бокоплавов по сравнению с бактериями и хлореллой.

Литература

1. Балаковская АЭС. Оценка воздействия на окружающую среду. 1991. 495
2. Гидробиология водоемов-охладителей тепловых и атомных электростанций Украины / Протасов А.А., Сергеева О.А., Кошелева С.И. и др. / Киев.: Наук, думка, 1991. 192с.

3. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». МПР РФ.— М.: 2004. 16 с.

4. Григорьев Ю. С. Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла. Красноярск: КГУ. —2004. — 19 с.

5. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. — М.: Акварос, 2001 — 48с.

6. Грезе И.И. Бокоплавцы. Фауна Украины. Т. 26. Высшие ракообразные, вып. 5. Киев: Наукова Думка, 1985. 171 с

7. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР. Л., 1977. 510 с.

8. Захаров В.М. Асимметрия животных (популяционно-феногенетический подход). М.: Наука, 1987. 216 с.

9. Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И. и др. Здоровье среды: методика оценки. М.: Центр экологической политики России, 2000. 68 с.

10. www.balaes.ru

6.2. Оценка генотоксичности природных сред в санитарно-защитной зоне и зоне защитных мероприятий завода по уничтожению химического оружия в и. Горный Саратовской области с помощью микроядрышкового теста.

В системе экологического контроля зоны влияния объектов уничтожения химического оружия важная роль отводится генетическим методам биомониторинга.

Генетические методы анализа качества окружающей среды являются незаменимыми в процессе мониторинга, так как позволяют оперативно оценить изменения в биоте, вызванные факторами антропогенного происхождения. В

нашей работе использован микроядрышковый метод и тест-объект репчатый лук *Allium* *sepa* [1,2,3].

Метод учитывает процент клеток с микроядрами на 1400 проанализированных интерфаз (рис. 35);

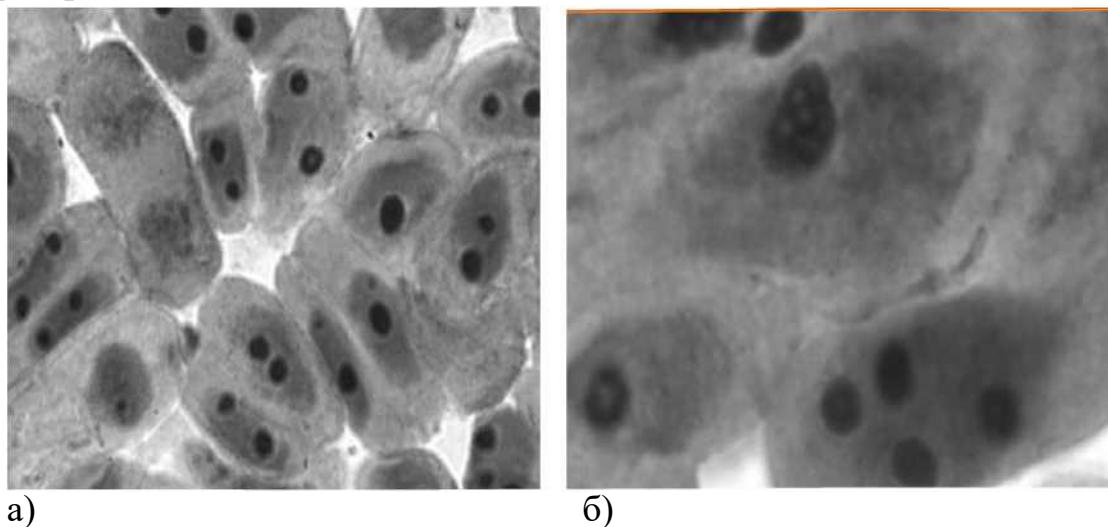


Рис 35. а) Клетки апикальной меристемы *Allium* *sepa* с одним, двумя микроядрышками (норма), б) Четыре микроядрышка ($K_2CГ_2O_7$ аномалия).

Микроядрышковый тест основан на подсчёте клеток с микроядрами, которые представляют собой автономно существующие ацентрические фрагменты хромосом, возникающие в результате влияния генотоксических веществ на геном. Методика основана на определении увеличения количества микроядрышек в проростках семян и луковичах растений при действии генотоксических веществ, присутствующих в исследуемой пробе.

Для определения токсичности проводится биотестирование исходной исследуемой воды или водной вытяжки из почв и донных отложений.

Определение токсичности каждой пробы проводится в трех повторностях (в качестве контроля используется культивационная вода).

В стаканчики объемом 100мл, заполненные исследуемой водой, помещают луковичы одинакового размера, всего используют по три стаканчика с луковичами для контроля и для каждой пробы. Стаканчики (пробу и контроль) ставят в термостат с температурой $(+24^{\circ}C \pm 0,5)^{\circ}C$ до появления корешков длиной 0,5 - 1см (3 - 6 суток). С каждой луковичы срезают все ко-

корешки и смешивают в одной емкости, после фиксации в ацетоалкоголе (3 части 96% этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты) их помещают в холодильник при температуре +4 °С на 24 часа, затем окрашивают гематоксилином и из этой выборки берут 7 корешков, из каждого готовят препарат среза апикальной меристемы - одно предметное стекло в итоге получается 7 препаратов из семи корешков. В каждом препарате просматривают по 200 клеток (всего 1400).

Изготовление микропрепаратов из срезанных корешков осуществляют в следующей последовательности:

- для мацерации тканей кончики корешков помещают в 18 % соляную кислоту (на 18 частей концентрированной HCl добавляется 82 части дистиллированной воды) и подогревают несколько раз до температуры 60 °С;
- материал ополаскивают 45 % уксусной кислотой (45 частей ледяной уксусной кислоты и 55 частей дистиллированной воды);
- заливают корни красителем гематоксилином на 25 минут при комнатной температуре.
- корешки отмывают от избыточного красителя дистиллированной водой последовательно в трех сосудах;
- отрезают кончик корешка и помещают его на предметное стекло в каплю жидкости Гойера. Слегка раздавливают корешок препаровальной иглой и накрывают покровным стеклом. Препарат подогревают (но не сильно!) над пламенем горелки и раздавливают спичкой поверх покровного стекла, добиваясь равномерного распределения клеток на микропрепарате.

Просмотр семи препаратов осуществляют на микроскопе при общем увеличении 40x2,5x12. При анализе ведут подсчет общего количества просмотренных клеток (не менее 200 с каждого микропрепарата), учитывают количество клеток с 1, 2, 3... п ядрышками в ядре и считают среднее число ядрышек на клетку (сумма всех обнаруженных на микропрепарате ядрышек к общему числу проанализированных клеток).

Наличие генотоксического действия исследуемых проб воды, почвенных вытяжек и донных отложений определяется на основе установления статистически достоверного увеличения количества микроядрышек в клетках корешков по сравнению с контролем [4].

Всего исследовано 15 проб из них 5 проб воды, 5 проб почвенных вытяжек и 5 проб донных отложений в СЗЗ и ЗЗМ (рис.36).

Результаты биотестирования проб представлены в таблице 14.

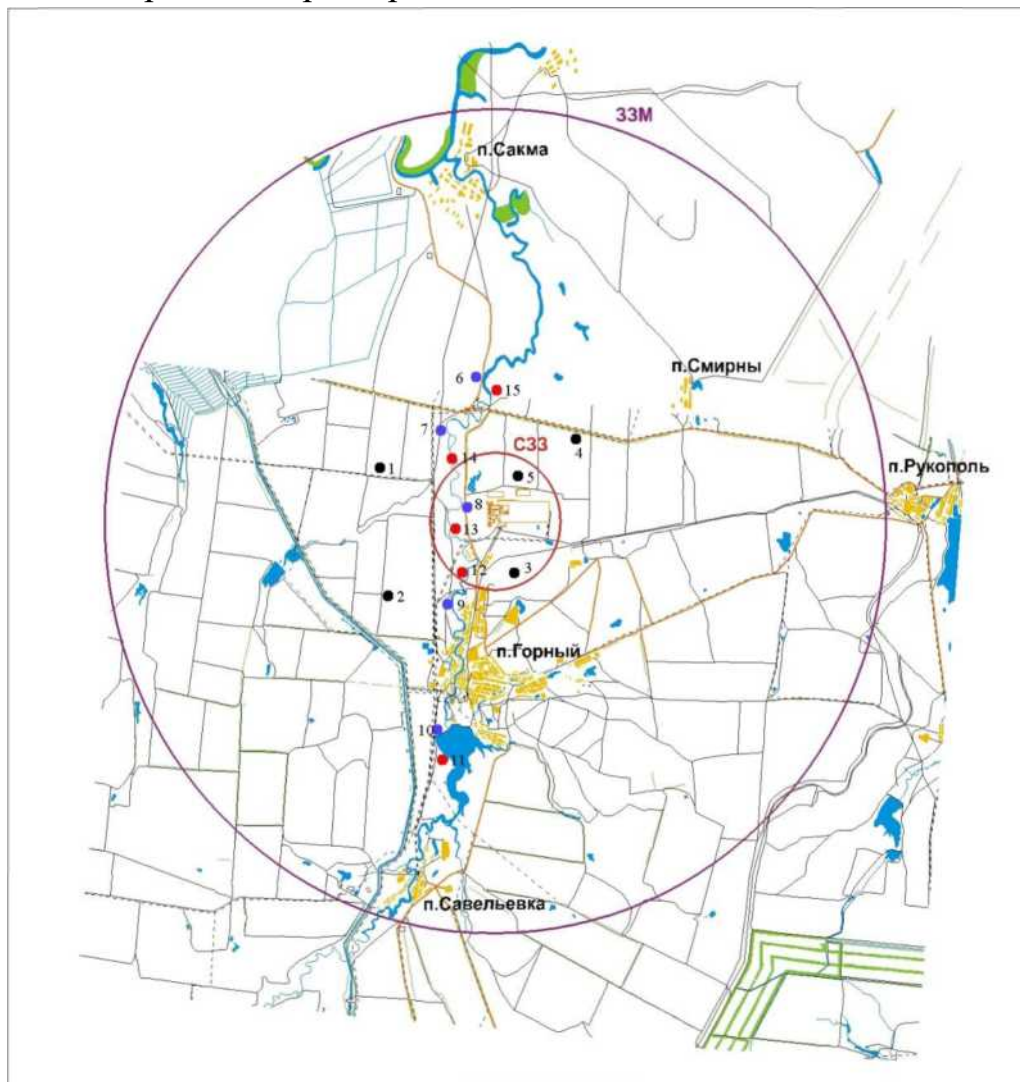


Рис.36. Карта пробоотбора 1-5 почвы, 6-10 воды, 11-15 донные отложения в СЗЗ и ЗЗМ объекта УХО и. Горный Саратовской области.

Таблица 14 - Оценка генотоксичности с использованием микроядрышкового теста

Дата, № п/п, место отбора пробы	Среднее количество ядрышек на клетку		Откло- нение от контро- ля, %	Досто- верность различий с кон- тролем	Оценка токсич- ности пробы: оказывает (да) не оказывает (нет)
	контроль	Проба			
№1, 12.05.2009 почва из СЗЗ и ЗЗМ объекта УХО п. Горный	1,52±0,07	1,58±0,008	4,14	p < 0,01	Нет
из СЗЗ и ЗЗМ объекта УХО п. Горный	1,52±0,007	1,585±0,02	4,27		Нет
из СЗЗ и ЗЗМ объекта УХО п. Горный	1,52±0,007	1,532±0,03	0,65		Нет
№4, 12.05.2009 почва из СЗЗ и ЗЗМ объекта УХО п. Горный	1,52±0,007	1,61±0,1	5,9		Нет
№5, 12.05.2009 почва из СЗЗ и ЗЗМ объекта УХО п. Горный	1,52±0,007	1,665±0,09	9,5		Нет
р. Сакма	1,52±0,007	1,53±1,1	0,65		Нет
р. Сакма	1,52±0,007	1,543±0,8	1,3		Нет
р. Сакма	1,52±0,007	1,612±0,03	6,05		Нет
Вода р. Сакма	1,52±0,007	1,553±1,3	1,97		Нет
р. Сакма	1,52±0,007	1,652±1,2	8,68		Нет
№11, 14.05.2009 Донные отложения р. Сакма	1,52±0,007	1,54±0,5	1,31		Нет
№12, 14.05.2009 Дон- ные отложения р. Сакма	1,52±0,007	1,534±1.3	0,92		Нет
ные отложения р. Сакма	1,52±0,007	1,634±0,06	7,5		Нет
ные отложения р. Сакма	1,52±0,007	1,654±0,04	8,81		Нет
ные отложения р. Сакма	1,52±0,007	1,546±0,1	1,71		Нет
Модельный (эталон- ный 0,1г/100мл) ток- сикант K2Cr2O7	1,52±0,007	2,11±0,1	38,81		Да

Представленные результаты микроядрышкового теста позволяют оценить состояние исследованных объектов природных сред в СЗЗ и ЗЗМ объекта УХО п. Горный, как стабильное и относительно благополучное. Во всех изученных пробах отклонение от контроля не превышает 9,5%, что свидетельствует об отсутствии генотоксичности.

Литература

1. Калаев В.Н. // Эколого-физиологические и физико-биохимические основы взаимодействия биосистем с окружающей средой. Воронеж, 1998. С. 43-48.
2. Цитогенетический мониторинг загрязнения окружающей среды с использованием растительных тест-объектов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. В. Н. Калаев Воронеж, ВГУ, 2000. 25 с.
3. Практикум по цитогенетике. / С.А. Гостимский, М.И. Дьякова, Е.В. Ивановская, М.А. Монахова - М.: Изд-во МГУ, 1974 . - 171 с.
4. Гублер Е.В. // Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. / Е.В. Гублер, А.А. Генкин — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.

Глава 7. БИОТЕСТИРОВАНИЕ ОТХОДОВ ОБЪЕКТОВ ПО УНИЧТОЖЕНИЮ ХИМИЧЕСКОГО ОРУЖИЯ

7.1. Токсикологическая оценка реакционной массы, образующейся при детоксикации люизита

В марте 2006 г., в соответствии с международной Конвенцией ООН, началось запланированное уничтожение люизита на объекте по ликвидации химического оружия в г. Камбарка Удмуртской Республики. Люизит уничтожается методом щелочного гидролиза и при этом образуется реакционная масса [1]. В связи с этим, в настоящее время оценка опасности токсичных отходов, образующихся при уничтожении химического оружия, является весьма актуальной задачей.

Целью нашей работы явилось изучение токсичности реакционной массы на таких распространенных тест-объектах, как дафнии и цериодафнии, люминесцентные бактерии, инфузории и хлорелла.

Реакционная масса, полученная в процессе уничтожения люизита, была отобрана 01.11.2006 г. на объекте уничтожения химического оружия в г. Камбарка. Она представляла собой жидкость светло-серого цвета.

При биотестировании использовались тест-организмы, относящиеся к различным систематическим группам (беспозвоочные, низшие растения, бактерии и инфузории).

Изменение интенсивности биолюминесценции бактерий при воздействии различных разведений реакционной массы оценивали с помощью аттестованной методики на приборе «Биотокс - ЮМ» [2].

Определение токсичности исследуемых растворов по хемотаксической реакции инфузорий проводили по аттестованной методике с применением прибора «Биотестер - 2» [3].

Влияние растворов реакционной массы на рост водоросли хлореллы изучали с помощью методики Григорьева Ю. С. [4].

Влияние растворов на смертность дафний и цериодафний (*Daphnia magna* и *Ceriodaphnia affinis*) исследовали с помощью методик Жмур Н. С. [5, 6].

Биотестирование на цериодафниях при повышении температуры культивационной среды проводили в химических стаканах объемом 50 мл. В контрольные стаканы добавляли 25 мл культивационной среды и такой же объем растворов реакционной массы в стаканы опытной серии. В исследуемые растворы (0,025 и 0,005%) помещали по одной цериодафнии не более 24-часового возраста. Для каждой исследуемой серии использовали 10 химических стаканов. Инкубацию исследуемых проб проводили в течение 1,5 часов при температуре +36 °С. По завершении инкубации проводили подсчет тест-объектов в каждом разведении и контроле.

Влияние растворов на спонтанную двигательную активность дафний оценивали следующим образом: в стаканы с культивационной водой (контроль) и тестируемыми растворами (опыт) помещали по 6 дафний. Через шесть и 24 часа каждую дафнию помещали в центр чашки Петри (дно расчерчено на квадраты 1 см) и регистрировали число пересеченных квадратов за минуту. Степень изменения активности оценивали по среднему количеству пересеченных дафниями квадратов. Статистическую обработку полученных с помощью этой методики результатов выполняли по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни [7].

Изучение хронического токсического действия растворов реакционной массы проводили по методике Жмур Н. С. Учет смертности цериодафний и родившейся молоди осуществляли один раз в сутки ежедневно до конца хронического опыта. Хронический опыт был закончен, когда 60% самок в контроле дали три поколения молоди.

Разведение раствора реакционной массы осуществляли в соответствии с требованиями, предъявляемыми при работе со сверхмалыми дозами [8].

Установлено, что реакционная масса, разведенная в 20000 и 40000 раз не оказывает острого токсического действия на дафний. Полученные данные представлены в таблице 15. Разведения в 4000 и 10000 раз оказывают острое токсическое действие (смертность 100%). Дополнительно было проведено исследование влияния разведений люизитной реакционной массы, оказывающих острое токсическое действие (разведение в 10000 раз) и не оказывающих острого токсического действия (разведение в 20000 раз) на спонтанную двигательную активность дафний. По данным таблицы 16 можно сделать вывод, что подавление двигательной активности (через 24 часа) вызвало разведение, которое оказывало острую токсичность при эксперименте на выживаемость дафний — 10000 ($p < 0,05$). Разведение реакционной массы в 20000 раз статистически достоверного влияния на двигательную активность не оказало.

Хронический опыт на цериодафниях показал, что реакционная масса, разведенная в 20000 раз, оказывает хроническое токсическое действие (летальность 30% на 2 день опыта и 100% на 4 сутки). При разведении в 62500 раз летальность была отмечена только на 8 день (60%). С 9 дня она увеличилась еще на 10% (таблица 18). Количество молоди в этом разведении достоверно отличалось от контроля ($p < 0,05$). Не было отличия в количестве родившейся молоди от контроля при разведении в 200000 раз, но летальность значительно снизилась. Она была зафиксирована на 9 день опыта (20%) и не увеличивалась до конца эксперимента.

Данные о влиянии различных разведений раствора реакционной массы на интенсивность биолуминесценции бактерий представлены в таблице 17. Сильная токсичность обнаружена у растворов реакционной массы с разведением 200 - 10000 раз. Растворы с более низкой концен-

традией не оказывали существенного влияния на биолюминесценцию бактерий.

В таблице 19 приведены результаты оценки токсичности растворов реакционной массы по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла. Установлено, что разведение в 20000 раз не оказывает токсического действия. Средняя токсичность обнаружена у раствора реакционной массы с разведением в 2000 раз. Гипертоксичным являлся раствор с разведением в 200 раз.

Данные о влиянии растворов на хемотаксическую реакцию инфузорий приведены в таблице 21. Высокая степень токсичности обнаружена у растворов реакционной массы с разведениями в 10000, 20000 и 40000 раз.

Известно, что биологически активные вещества могут влиять на живые организмы в малых и сверхмалых дозах [9,10]. Нами обнаружена умеренная степень токсичности только у раствора реакционной массы с разведением в $4 \cdot 10^{13}$ раз при биотестировании на инфузориях. Исследование других разведений раствора реакционной массы не выявило каких-либо эффектов на бактерии и инфузории.

Сравнительный анализ чувствительности к раствору реакционной массы показал, что наиболее чувствительным тест-объектом являются инфузории. По-видимому, это связано с высокой аффинностью хеморецепторов этого одноклеточного животного к люизитной реакционной массе. В ходе биотестирования наблюдалась выраженная хемотаксическая реакция, которая регистрировалась нами с помощью прибора Биотестер-2. Следовательно, при проведении биомониторинга зоны влияния заводов по уничтожению люизита целесообразно в первую очередь использовать именно этот тест-организм. Среди достоинств методики можно отметить быстроту проведения экотоксикологического анализа

(около двух часов), что имеет принципиальное значение в процессе мониторинга опасного промышленного объекта.

Биотестирование на цериодафниях при повышенной температуре исследуемых растворов (разведения в 4000, 20000, 40000, 100000 раз) проводилось в течение 1,5 часов. Полученные результаты представлены в таблице 20. Острое токсическое действие на цериодафний оказали разведения реакционной массы в 4000 раз (100% гибель особей), в 20000 раз (80% гибель). Более низкие концентрации реакционной массы не вызвали острого токсического эффекта. Таким образом, чувствительность цериодафний к реакционной массе при повышении температуры культивационной среды выше, чем дафний, которые содержатся при комнатной температуре. Экспресс-методику определения токсичности при повышении температуры культивационной среды также можно рекомендовать для биотестирования качества природных сред в зоне влияния заводов по уничтожению люизита.

В доступной литературе мы не обнаружили сведений о влиянии раствора люизитной реакционной массы на дафний, хлореллу, люминесцентные бактерии и инфузории.

Выводы

1. При исследовании влияния растворов люизитной реакционной массы на смертность дафний установлено, что разведения от 10000 и ниже оказывают острое токсическое действие. Безвредная кратность разбавления равна 100000. Достоверное влияние на двигательную активность дафний после 24 часов экспозиции оказало разведение реакционной массы в 10000 раз.

2. Хроническое токсическое действие на цериодафнии оказывают разведения реакционной массы в 62500 и в 20000 раз; безвредная кратность разбавления равна 200000.

4. Острое токсическое действие на бактерии оказывают растворы реакционной массы с разведением в 200-10000 раз.

5. Согласно данным о влиянии растворов на хемотаксическую реакцию инфузорий, высокая степень токсичности обнаружена у растворов реакционной массы с разведениями в 10000, 20000 и 40000 раз.

6. Обнаружена умеренная токсичность у раствора реакционной массы с разведением в 4-10 раз при биотестировании на инфузориях. Исследование других низких концентраций раствора реакционной массы не выявило каких-либо эффектов на бактерии и инфузории.

7. Установлено, что разведение в 20000 раз не оказывает токсического действия на рост хлореллы. Средняя токсичность обнаружена у раствора реакционной массы с разведением в 2000 раз. Гипертоксичным являлся раствор с разведением в 200 раз.

8. При повышении температуры культивационной среды чувствительность цериодафний к действию токсиканта повышается. Острое токсическое влияние на цериодафнии при повышенной температуре оказывали разведения раствора реакционной массы в 20000 и в 4000 раз. Безвредная кратность разбавления равна 125000.

9. Сравнительный анализ чувствительности различных организмов к раствору реакционной массы показал, что наиболее чувствительным тест-объектом являются инфузории (табл. 15-18).

Таблица 15 - Оценка токсичности различных разведений реакционной массы по смертности дафний (*Daphnia magna*)

Кратность разведения раствора реакционной массы	Количество выживших дафний	Смертность (% погибших дафний)	Оказывает (не оказывает) острое токсическое действие	Летальная кратность разбавления	Безвредная кратность разбавления
4000	0	100	оказывает	33333	100000
8000	0	100	оказывает		
16000	0	100	оказывает		

Таблица 16 - Влияние растворов реакционной массы на спонтанную двигательную активность дафний

Кратность разведения раствора реакционной массы	Среднее число пересеченных квадратов за 1 минуту	
	через 6 часов	через 24 часа
Контроль	14,8±6,7	25,3±5,6
10000	10±4,1	5,2±6,Г
20000	14,6±4,9	23,2±8,3

><0,05

Таблица 17 - Влияние растворов реакционной массы на интенсивность биолюминесценции бактерий

Кратность разведения раствора реакционной массы	Значение индекса токсичности, Т	Степень токсичности
200	99,70±0,08	Сильная
2000	84,15±2,38	Сильная
10000	59,12±20,25	Сильная
20000	0	не токсично
40000	0	не токсично
200000	0	не токсично
4 ⁷ T0 ⁷	0	не токсично
4-10 ¹ⁿ	0	не токсично
4-10 ¹³	18,51±7,49	не токсично
4-10 ¹⁶	0	не токсично

Таблица 18 - Результаты оценки токсичности растворов реакционной массы по смертности цериодафний, полученные после полуторачасовой выдержки при температуре 36°C.

Кратность разведения раствора реакционной массы	Гибель, %	Оценка токсичности	
		Летальная кратность разведения	Безвредная кратность разведения
4000	100	33333	125000
20000	80		
40000	30		
100000	20		

Таблица 19 - Результаты биотестирования по смертности (%) и плодотворности цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*) в 14-дневном эксперименте (в знаменателе указано среднее число новорожденных цериодафний)

Время от начала биотестирования, сут.	Кратность разведения раствора реакционной массы			Контроль
	20000	62500	200000	
1	0	0	0	0
2	30	0	0	0
3	30	0	0	0
4	100	0	0	0
5	100	0	0	0
6	100	0	0	0
7	100	0% 2,0±0,1	0	0% 2,0±1,0
8	100	60% 3,0±1,0	0% 3,2±1,7	0% 3,3±1,2
9	100	70%	20% 1,0±0,1	0% 1.0±0,1
10	100	70% 1,5±0,7	20% 2,3±1,5	0% 2,8±2,1
11	100	70	20	0
12	100	70	20	0
13	100	70% 5,0±0,2	20% 4,1±2,2	0% 4,2±2,1
14	100	70% 3,5±1,5	20% 3,0±1,4	0% 3,8±1,5

ной массы по хемотаксической реакции инфузорий

Таблица 20 - Определение острой токсичности растворов реакцион-

Кратность разведения раствора реакционной массы	Среднее значение индекса токсичности, Т (у.е.)	Степень токсичности
10000	0,88±0,01	высокая
20000	0,99±0,00	высокая
40000	0,79±0,01	высокая
4·10 ⁴ ^{ji}	0,45±0,03	умеренная
4Т0 ^{ib}	0,33±0,04	допустимая

Таблица 21 - Оценка токсичности растворов реакционной массы по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла

Кратность раз- ведения раствора реак- ционной массы	Результаты анали- за (оптическая плотность)	Процентное отклонение от контроля	Степень токсич- ности
	0,205±0,010		Г ипертоксично
	(контроль)		
200	0,005±0,002	98	
600	0,005±0,002	98	
1800	0,005±0,002	98	
5400	0,005±0,002	98	
16200	0,147±0,005	28	С реднетоксично
	0,276±0,010		
	(контроль)		
2000	0,010±0,000	96	
6000	0,048±0,003	83	
18000	0,242±0,010	12	
54000	0,245±0,004	11	не токсично
162000	0,251±0,004	9	
	0,150±0,007		
	(контроль)		
20000	0,138±0,005	8	
60000	0,149±0,005	1	
180000	0,150±0,004	0	не токсично
540000	0,152±0,008	-1	
1620000	0,151±0,007	-1	

Литература

1. Белов Ю. А., Никифоров Г. Е., Хохлов Р. В. и др. Переработка реакционной массы от детоксикации люизита в арсенит натрия гидролизный// Проблемы уничтожения и утилизации ОМП. — М., 2006. №2. — С. 16-19.

2. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолуминесценции тест-системой «Эколюм». — М.: МПР РФ, 2004. — 16 с.

3. Методика определения токсичности проб вод (природных, хозяйственно-питьевых, промышленных сточных) экспресс-методом с применением прибора «Биотестер». — СПб: Спектр-М, 2005. — 13 с.

4. Григорьев Ю. С. Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла. Красноярск: КГУ, 2004. — 19 с.

5. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. — М.: Акварос, 2001а. — 48 с.

6. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. — М.: Акварос, 2001б. — 52 с.

7. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.

8. Davenas E. et al. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE // Nature, 1988. — V.333. № 6176. — P. 816-818.

9. Бурлакова Е. Б. Эффект сверхмалых доз // Вести РАН. — 1994. Т. 64. №5. — С. 425-431.

10. Зайцев С. В., Ефанов А. М., Сазанов Л. А. Общие закономерности и возможные механизмы действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах // Рос. хим. журнал. — 1999. т. XLIII. №5. — С. 28-33.

7.2. Биотестирование арсенита натрия

Арсенит натрия образуется в процессе уничтожения боевого отравляющего вещества люизита на специальных заводах по уничтожению химического оружия [1].

Нами проведено сравнительное исследование влияния растворов различных концентраций арсенита натрия на интенсивность билюминесцен-

ции бактерий, смертность дафний и цериодафний, хемотаксическую реакцию инфузорий, двигательную активность дафний, рост хлореллы и флюоресценцию хлорофилла водоросли сценедесмус.

Изменение интенсивности биолюминесценции бактерий (*Escherichia coli* M-17) при воздействии различных концентраций арсенита натрия оценивали с помощью аттестованной методики [2]. Острое токсическое действие растворов на бактерии определялось по гашению их биолюминесценции за 30-ти минутный период экспозиции.

Определение токсичности исследуемых растворов по реакции инфузорий оценивали по аттестованной методике [3]. Инфузории (*Paramecium caudatum*) способны реагировать на присутствие в исследуемой среде веществ, представляющих опасность для их жизнедеятельности, и направленно перемещаться по градиенту концентраций (в направлении изменения концентраций) этих веществ (хемотаксическая реакция), избегая их вредного воздействия. Критерием токсического действия является значимое различие в числе клеток инфузорий, наблюдаемых в верхней зоне кюветы в пробе, не содержащей токсических веществ (контроль), по сравнению с этим показателем, наблюдаемым в исследуемой пробе (опыт).

Влияние растворов различных концентраций арсенита натрия на рост водоросли хлореллы (*Chlorella vulgaris* Beijer) изучали с помощью методики Григорьева Ю.С. [4]. Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде не содержащих токсических веществ (контроль) и тестируемых проб, в которых эти вещества присутствуют. Критерием токсичности воды являлось снижение на 20% (подавление роста) или увеличение на 30% (стимуляция роста) величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов на тестируемом растворе, по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде.

Оценку изменений уровня флюоресценции хлорофилла клеток водорослей сценедесмус (*Scenedesmus quadricauda* Breb.) под воздействием ток-

сиканта осуществляли по методике Жмур Н.С. и Орловой Т.Л. [5]. Критерием токсичности являлось подавление уровня флюоресценции на 50% и более или стимуляция на 30% и более по сравнению с контролем в течение 96-часовой экспозиции.

Влияние растворов на смертность дафний (*Daphnia magna straus*) и цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*) исследовали с помощью методик Жмур Н.С. [6,7], позволяющих достоверно определить степень токсичности среды. Острое токсическое действие исследуемого раствора на дафний и цериодафний определяли по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности являлась гибель 50% и более тест-объектов за 96 часов в исследуемом растворе при условии, что в контрольном эксперименте их гибель не превышала 10%.

Влияние растворов на спонтанную двигательную активность дафний (*Daphnia magna straus*) оценивали следующим образом: в стаканы с культивационной водой (контроль) и тестируемыми растворами (опыт) помещали по 6 особей. Через три, шесть и 24 часа каждую дафнию помещали в центр чашки Петри (дно расчерчено на квадраты 1 см) и регистрировали число пересеченных квадратов за каждую минуту опыта в течение трех минут. Степень изменения активности оценивали по среднему количеству пересеченных дафниями квадратов. Статистическую обработку полученных с помощью этой методики результатов проводили по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни [8].

Установлено, что концентрации арсенита натрия 0,1 и 0,05 г/л являются сильно токсичными и значительно ингибируют интенсивность биолюминесценции бактерий (индексы токсичности, соответственно, $T_1=93$ и $T_2=90$). Растворы с концентрациями 0,01 и 0,005 г/л не влияли на интенсивность биолюминесценции, следовательно, не оказывали острого токсического действия (табл. 22).

Достоверное влияние арсенита натрия на рост хлореллы было отмечено (таблица 23) при концентрациях раствора ОД г/л (среднетоксично) и 0,2 г/л (гипертоксично).

Химические токсиканты могут оказывать влияние на животных и растений не только в больших дозах, но и в сверхмалых. Так, например, обнаружено токсическое влияние на дафний сверхмалых концентраций инсектицидов [9]. Поэтому представляет также интерес изучение биологических эффектов сверхмалых доз. Однако изученные нами малые и сверхмалые концентрации арсенита натрия не оказывали существенного влияния на рост водоросли хлореллы и хемотаксическую реакцию инфузорий.

В экспериментах по установлению острого токсического действия арсенита натрия на цериодафниях была установлена высокая (80 и 90%) летальность тест-объектов при концентрациях раствора арсенита натрия 0,006 и 0,007 г/л соответственно (таблица 24). Нетоксичной была концентрация 0,005 г/л (смертность не превысила 10%).

Одноклеточная водоросль сценедесмус также показала невысокую чувствительность к арсениту натрия. При измерении флюоресценции хлорофилла водорослей стимуляция, превышающая контроль на 36,1% и 41,6%, отмечалась для растворов с концентрациями 0,2 и 0,06 г/л, что говорит об их токсичности (>30%). Растворы с концентрациями 0,02-0,006 г/л не оказывали существенного влияния на интенсивность флюоресценции хлорофилла (табл. 25).

При определении острого токсического действия на дафниях в концентрациях 0,1 г/л и 0,01 г/л гибель составила 100%. Концентрация 0,005 г/л обусловила гибель 40%, 0,003 г/л — гибель 26%, 0,0025 г/л — гибель 23% особей (таблица 26).

Достоверное снижение двигательной активности дафний наблюдалось под влиянием растворов арсенита натрия с концентрациями 0,2; 0,02; 0,006 г/л (таблица 27).

Данные о влиянии различных концентраций арсенита натрия на хемотаксическую реакцию инфузорий представлены в таблице 28. Высокая

степень токсичности обнаружена у раствора с концентрацией 0,2 г/л. Остальные растворы являлись умеренно токсичными.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что водоросли, инфузории и бактерии менее чувствительны к арсениту натрия, чем дафнии и цериодафнии.

интенсивность биолюминесценции бактерий (*Escherichia coli* M-17)

Таблица 22 - Влияние различных концентраций арсенита натрия на

Концентрация арсенита натрия, г/л	Значение индекса токсичности, Т	Степень токсичности
ОД	93,00±4,04	сильная токсичность
0,05	90,00±6,50	сильная токсичность
0,01	0	Не токсично
0,005	0	Не токсично

(*Chlorella vulgaris* Beijer)

Таблица 23 - Оценка токсичности различных концентраций арсенита натрия по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла

Концентрация арсенита натрия, г/л	Величина разбавления исходного раствора, %	Результат анализа (оптическая плотность)	Процентное отклонение от контроля	Степень токсичности
0,2	100	0,195±0,004	-45,5	гипертоксично
	33	0,258±0,009	-92,5	
	11	0,214±0,004	-59,7	
	3,7	0,188±0,010	-40,3	
	1,2	0,175±0,006	-30,6	
	100	0,490±0,008	-226,8	среднетоксично
ОД	33	0,296±0,008	-37	
	11	0,260±0,008	-20,4	
	3,7	0,227±0,006	-5,1	
	1,2	0,231±0,002	-6,9	
	100	0,192±0,010	-2,7	не токсично
0,01	33	0,195±0,007	-4,3	
	11	0,197±0,008	-5,3	
	3,7	0,197±0,003	-5,3	
	1,2	0,196±0,002	-4,8	
6-10 ¹⁶	100	0,258±0,017	-24	не токсично
6-10 ¹⁷	100	0,226±0,017	-9	не токсично
6-Ю ¹¹ ^	100	0,248±0,009	-20	не токсично
6-10 ¹⁸	100	0,237±0,002	-14	не токсично
6-10 ⁻¹⁸	100	0,231±0,001	-11	не токсично

Таблица 24 - Оценка токсичности различных концентраций арсенита натрия по смертности цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*)

Концентрация, (г/л)	Кол-во выживших особей, шт.	Гибель особей, %	Оказывает (не оказывает) острое токсическое действие	Л КР 50-48	БКР ₁₀₋₄₈
0,05	0	100	оказывает	0,0058	0,0050
0,01	0	100	оказывает		
0,005	9±0,72	10	не оказывает		
0,003	10±0,8	0	не оказывает		
0,0025	10±0,8	0	не оказывает		

96 ч. от начала биотестирования)

Таблица 25 - Влияние растворов арсенита натрия на интенсивность флюоресценции хлорофилла водорослей *Scenedesmus quadricauda* (через

Концентрация арсенита натрия, г/л	Среднее значение по повторностям, у. е.	Отклонение от контроля, %	Оказывает (не оказывает) острое токсическое действие
контроль	295,5±21,0	—	—
0,2	402,3±28,2	36,14	Оказывает
0,06	418,5±29,3	41,6	Оказывает
0,02	300,7±21,0	1,7	Не оказывает
0,007	296,5±20,8	1,0	Не оказывает
0,006	272,4±19,1	7,8	Не оказывает

трия по смертности дафний (*Daphnia magna straus*).

Таблица 26 - Оценка токсичности различных концентраций арсенита на-

Таблица 28 - Определение острой токсичности различных концентраций арсенита натрия по хемотаксической реакции инфузорий (<i>Paramecium caudatum</i>).			
Концентрация арсенита натрия, г/л	Концентрация арсенита натрия, г/л	Среднее значение индекса токсичности Т, у.е.	Степень токсичности
од двигатель Концентрация г/л	0,2	0,93±0,01	высокая степень токсичности
	0,02	0,70±0,00	умеренная степень токсичности
	0,006	0,47±0,08	умеренная степень токсичности
	0,002	0,54±0,01	умеренная степень токсичности
Контроль	0,0006	0,47±0,03	умеренная степень токсичности
0,2	6 · 10 ⁻¹⁸	0,43±0,07	допустимая степень токсичности
0,02			
0,006			
Примечан			

Таблица 27 - Влияние различных концентраций арсенита натрия на
Литература

1. Белов Ю. А., Никифоров Г. Е., Хохлов Р. В. и др. Переработка реакционной массы от детоксикации люизита в арсенит натрия гидролизный// Проблемы уничтожения и утилизации ОМП. — М.: 2006. №2. — С. 16-19.
2. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биolumинесценции тест-системой «Эколюм». МПР РФ.— М.: 2004. 16 с.

3. Методика определения токсичности проб вод (природных, хозяйственно-питьевых, промышленных сточных) экспресс-методом с применением прибора «Биотестер». — Санкт-Петербург: Спектр-М, 2005. — 13 с.

4. Григорьев Ю. С. Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла. Красноярск: КГУ. — 2004. — 19 с.

5. Жмур Н. С., Орлова Т. Л. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. — М.: Акварос, 2001. — 44 с.

6. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. — М.: Акварос, 2001а. — 48с.

7. Жмур Н. С. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. — М.: Акварос, 2001б. — 52с.

8. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.

9. Ратушняк А.А., Андреева М.Г., Махнин В.Г. Эффект действия малых и сверхмалых доз пиретроидов на *Daphnia magna*. // Токсикологический вестник. 2000. №2, март-апрель. — С. 17-23.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные в монографии данные свидетельствуют о перспективности применения биологических методов для проведения комплексного экологического мониторинга.

гического мониторинга зоны влияния опасных промышленных предприятий.

Наиболее полное представление о состоянии биоты можно получить только на основе использования как методов биоиндикации, так и биотестирования.

Биологические методы более выгодны в экономических аспектах по сравнению с методами химического анализа, так как они значительно их дешевле. Кроме того, они позволяют оценить синергические эффекты загрязняющих веществ и возможные влияния сверхмалых доз экотоксикантов.

Среди недостатков биоиндикации можно отметить сложность учета различных биотических и абиотических факторов, влияющих на живые организмы в природных условиях.

Многие методы биоиндикации достаточно сложные и для их проведения требуются специалисты высокой квалификации. Большинство этих методов не внесены в федеральный реестр аттестованных методик, допущенных для целей государственного экологического контроля.

Наиболее ранние изменения в экосистемах можно обнаружить при проведении исследований на молекулярном уровне, когда еще не видно каких-либо морфологических изменений, вызванных загрязняющими веществами. В связи с этим приобретают особую актуальность методы анализа генных мутаций, позволяющие прогнозировать отдаленные последствия воздействия

гено-

токсикантов. Как известно, многие опасные мутации являются рецессивными

и проявляются только у последующих поколений живых организмов.

Проблему переноса результатов, полученных в итоге биотестирования с

помощью микроорганизмов и беспозвоночных, на высшие организмы и чело-

века, нельзя считать полностью решенной в настоящее время.

Биотестирование с помощью культур клеток животных и человека, не-

смотря на многие преимущества, также не лишено ряда недостатков.

Использование в качестве тест-объектов организмов различных систе-

матических групп повышает достоверность экотоксикологических анализов.

Именно этим принципом мы руководствовались при проведении биомонито-

ринга в зонах влияния опасных промышленных предприятий.

Вместе с тем, количество используемых тест-объектов должно быть оп-

тимальным и достаточным для достоверного обнаружения загрязняющих веществ опасных промышленных предприятий.

ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ

(Основные термины и определения)

Абиотические факторы - факторы неживой природы, прежде всего климатические: солнечный свет, температура, влажность, и местные: рельеф, свойства почвы, течения, ветер, радиация и т.д.

Автотрофы (первичные продуценты; производители) - организмы, способные фиксировать световую энергию и использовать в питании простые неорганические вещества.

Агроценоз - биотическое сообщество, созданное с целью получения сельскохозяйственной продукции и регулярно поддерживаемое человеком.

Аменсализм - для одного из совместно обитающих видов влияние другого отрицательно (он испытывает угнетение)

Антропогенный объект - объект, созданный человеком для обеспечения его социальных потребностей и не обладающий свойствами природных объектов.

Антропогенные факторы - все те формы деятельности человека, которые воздействуют на естественную природную среду, изменяя условия обитания живых организмов, или непосредственно влияют на отдельные виды растений и животных.

Ареал - зона географического распространения вида

Биодиагностика - обнаружение, идентификация и определение концентраций загрязняющих веществ в биотической составляющей на основе широкого использования организмов-мониторов (индикаторов).

Биоиндикатор - группа особей (или сообществ) растений или животных одного вида, по наличию и (или) состоянию которых, а также по поведению судят об изменениях в среде, в том числе о присутствии и концентрации загрязнителей.

Биоиндикация - оценка экологических условий по организм-индикаторам или целым сообществам.

Биологические методы - методы диагностики негативных изменений в природной среде, основанные на использовании природных или лабораторных живых организмов.

Биомониторинг - система наблюдений, оценки и прогноза различных изменений в биоте, вызванных факторами антропогенного происхождения. Биологический мониторинг проводится по показателям состояния живых объектов на разных уровнях их организации - суборганизменном, организменном и надорганизменном. Для мониторинга выбирается тот уровень, который дает наиболее чувствительный и легко контролируемый индикационный показатель.

Биосфера - тесно взаимосвязанная единая система геологических и биологических тел и процессов преобразования энергии и вещества.

Биотест (тест-организм, тест-система) - живой организм, используемый для экотоксикологического анализа (биотестирования).

Биотестирование (биологическое тестирование, экотоксикологический анализ) - оценка токсических эффектов действия химических веществ и смесей по физиологическим, морфологическим реакциям, поведенческим изменениям, изменениям выживаемости, плодовитости тест-организмов в условиях, предусмотренных методиками биотестирования.

Биотические факторы - всевозможные формы влияния живых организмов друг на друга и на среду (например, опыление насекомыми растений, поедание одних организмов другими, паразитизм, конкуренция).

Биоценоз - совокупность растений, животных и микроорганизмов, населяющих участок среды обитания с более или менее однородными условиями жизни.

Биогеоценоз - исторически сложившаяся совокупность живых организмов (биоценоз) и абиотической среды вместе с занимаемым ими участком земной поверхности (биотопом). Это составная часть ландшафта и элементарная биотерриториальная единица биосферы.

Видовое богатство - характеристика сообщества, определяемая числом видов.

Виоленты - основные строители растительного сообщества (конкурентные)

Виригинальные (растения) - взрослые, но еще не плодоносящие

Влияющие факторы пробы - мешающие компоненты и другие свойства пробы, оказывающие влияние на результат и погрешность анализа.

Воздействие на окружающую среду - любое отрицательное или положительное изменение в ОС, полностью или частично являющееся результатом деятельности объекта, его продукции и/или отходов.

Воспроизводимость результатов биотестирования - характеристика качества ЭТА при помощи биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной и той же методике, на одном и том же эталонном веществе, но в различных условиях (разным операторам, в разных лабораториях или в разное время).

Генеративные (растения) - плодоносящие

Генетический мониторинг - метод биомониторинга, соответствующий субклеточному уровню организации живых организмов.

Геобионты (эдафобионты) - обитатели почвенной среды

Гетеротрофы - организмы, питающиеся готовыми органическими веществами. Гетеротрофы подразделяются на *консументов* (потребителей) и *редуцентов* - восстановителей или *деструкторов* (разлагателей).

Гигрофиты - пойменные травы

Гидробионты - постоянные обитатели воды.

Государственный мониторинг окружающей среды (государственный экологический мониторинг) - мониторинг ОС, осуществляемый органами государственной власти Российской Федерации и органами государственной власти субъектов Российской Федерации.

Донные отложения - донные наносы и твердые частицы, образовавшиеся и осевшие на дно водного объекта в результате внутриводоемных физико-химических и биохимических процессов, происходящих с веществами как естественного, так и техногенного происхождения.

Едини́чная проба почвы - проба определенного объема, взятая однократно из почвенного горизонта, слоя.

Загрязняющее вещество - вещество или смесь веществ, количество и (или) концентрация которых превышают установленные для химических веществ, в том числе радиоактивных, иных веществ и микроорганизмов нормативы и оказывают негативное воздействие на ОС. Экологическое действие загрязняющих веществ может затрагивать отдельные организмы (проявляться на организменном уровне)

Загрязнённость - наличие в ОС вредных веществ, нарушающих функционирование экологических систем или их отдельных элементов и снижающих качество среды с точки зрения проживания человека или ведения им хозяйственной деятельности. Этим термином характеризуются все тела, вещества, явления, процессы, которые в данном месте, но не в то время и не в том количестве, какое естественно для природы, появляются в ОС и могут выводить её системы из состояния равновесия.

Зоофаги - животные, питающиеся животной пищей

Имматурные (растения) - полувзрослые

Иммунный ответ - способность организма хозяина к выздоровлению после заражения, а также образующаяся в ходе борьбы с болезнью память организма, помогающая обеспечить его невосприимчивость к данной инфекции - иммунитет.

Климаксовые (заключительные) лесные сообщества - зональные сообщества, способные без вмешательства человека длительно существовать на занимаемой территории при сохранении видового состава

Компоненты природной среды - земля, недра, почвы, поверхностные и подземные воды, атмосферный воздух, растительный, животный мир и иные организмы, а также озоновый слой атмосферы и околоземное космическое пространство, обеспечивающие в совокупности благоприятные условия для существования жизни на Земле.

Ксерофиты - травяной покров в условиях недостаточного увлажнения.

Ландшафт (географический) - территория, характеризующая суммой типичных признаков и включающая определённый набор биогеоценозов.

Ландшафтные зоны (тундровая, таёжная, пустынная, степная) или зональные типы ландшафтов - совокупности природных ландшафтов, сходных по морфологическим, функциональным и экологическим особенностям.

Ландшафт антропогенного типа - возникшего в результате хозяйственной деятельности человека - городской, сельскохозяйственный, промышленный и др.

Лихеноиндикация - использование лишайников в качестве биологических индикаторов степени загрязнения воздуха.

Лимнофилы - пресноводные животные, обитатели стоячих и медленно текущих вод

Луга - сообщества многолетних мезофильных растений, произрастающих в средних условиях увлажнения.

Метод анализа - принцип, положенный в основу анализа пробы.

Методика анализа - совокупность операций и правил, выполнение которых обеспечивает получение результатов анализа с установленными характеристиками погрешности.

Мозаичность - горизонтальная неоднородность

Мониторинг окружающей среды (экологический мониторинг) - комплексная система наблюдений за состоянием окружающей среды,

оценки и прогноза изменений состояния окружающей среды под воздействием природных и антропогенных факторов.

Мезофиты - травы, довольно требовательные к влаге.

Мутуализм - симбиотические отношения, при которых присутствие каждого из двух видов становится обязательным для другого партнёра.

Негативное воздействие на окружающую среду - воздействие хозяйственной и иной деятельности, последствия которой приводят к негативным изменениям качества окружающей среды.

Нормативы в области охраны окружающей среды - установленные нормативы качества окружающей среды и нормативы допустимого воздействия на нее, при соблюдении которых обеспечивается устойчивое функционирование естественных экологических систем и сохраняется биологическое разнообразие.

Население - это целостная совокупность взаимодействующих когорт людей (поколений), осуществляющих свою жизнедеятельность и самовоспроизводство в конкретных исторических условиях и пространственных пределах, соответствующих территориальной организации общества.

Нормы точности измерений (Нормы погрешности измерений) - пределы значений погрешности измерений, задаваемые в качестве требуемых или допускаемых.

Область применения методики анализа - предусмотренная данной методикой область значений определяемых содержаний (диапазон определяемых содержаний) и допускаемые методикой вариации влияющих факторов пробы и условий анализа.

Объединенная проба почвы - проба почвы, состоящая из заданного количества единичных проб.

Объект по уничтожению химического оружия - совокупность специально выделенной и охраняемой территории и расположенного на

этой территории комплекса основных и вспомогательных сооружений, предназначенных для уничтожения химического оружия, в том числе для утилизации и/или захоронения отходов, образующихся в процессе уничтожения химического оружия.

Объект по хранению химического оружия - совокупность специально выделенной и охраняемой территории, на которой постоянно находится химическое оружие, и расположенного на этой территории комплекса основных и вспомогательных сооружений по его хранению.

Объект размещения отходов - специально оборудованное сооружение, предназначенное для размещения отходов (полигон, шламохранилище, отвал горных пород и др.).

Окружающая среда - внешняя среда, в которой функционирует объект, включая воздух, воду, землю, природные ресурсы, флору, фауну, человека и их взаимодействие.

Паспорт опасного отхода - документ, удостоверяющий принадлежность отхода к отходам соответствующего вида и класса опасности, содержащий сведения об их составе.

Паразитизм - форма взаимосвязей между видами, при которой организмы одного вида (паразита, потребителя) живут за счёт питательных веществ или тканей организма другого вида (хозяина) в течение определённого времени.

Пациенты - виды растений, приспособившиеся к перенесению неблагоприятных условий (толерантные)

Погрешность измерений (анализа) - отклонение результата измерений (анализа) от истинного значения измеряемой величины или в его отсутствие принятого опорного значения.

Показатель - может быть определён как параметр или производная параметров, который даёт информацию о явлении. Его значение выходит за рамки свойств, непосредственно связанных с величиной параметра. По-

казатели имеют синтетическое значение и разрабатываются с конкретной целью. Как и статистические данные, на которых они основаны, показатели обладают свойствами, помогающими формулировать политику, оценивать эффективность программ, помогают разрабатывать эти программы и распределять ресурсы, выполнять экологические нормативы и облегчают взаимодействие с «зелёными». Существующие широко используемые данные экологической статистики чаще всего хранятся в реестрах, в виде банка данных и частично публикуются в статбюллетенях. Из-за огромного количества данных, а также из-за формы, в которых они представлены, они не так широко используются, как могли бы. С помощью показателей делаются попытки перевести технические или необработанные данные, которыми сложно пользоваться из-за их количества и способа представления, в форму, которая удобна для использования официальными органами и для понимания широкими слоями населения.

Показатели имеют две основные функции:

- снизить количество измерений и параметров, которые обычно необходимы для точной оценки ситуации;
- облегчить процесс использования результатов измерений пользователем.

Методология. Условно можно выделить три аспекта методологии и основных критериев разработки показателей: аналитическую обоснованность, измеряемость, полезность для юзеров (политическую пригодность). «Идеальный» показатель должен давать положительные ответы на следующие вопросы, даже если не все эти критерии будут встречаться на практике:

- обеспечивает ли он репрезентативную картину явления?
- легко ли интерпретировать данные и показывать временные триады?

- пригодность для формирования политики охраны окружающей среды (ООС)?
- отражает ли он изменения ОС и результаты антропогенной деятельности человека?
- можно ли на его основе проводить сравнения?
- имеются ли эталонные или предельные значения для сравнения информации с тем, чтобы пользователи могли оценить значимость данных, оцениваемых показателем?
- аналитическая обоснованность: правильно ли интерпретирована информация?
- имеет ли показатель теоретическое обоснование с научной и технической точек зрения?
- имеется ли международное признание его истинности?
- может ли использоваться экономическими моделями, для прогнозирования и в неформационных системах?
- измеряемость - реализуемость: _в удовлетворительном ли виде имеются данные, необходимые для информации?
- доступны ли они для использования или их можно получить дешёвыми способами?
- хорошо ли они документированы и какого они качества?
- обновляются ли они через определённые промежутки времени в соответствии с надёжными методиками?

Виды показателей. Показатели могут быть определены по схеме «нагрузка на ОС - состояние ОС - ответная реакция», как это было предложено Организацией Международного Сотрудничества и Развития. По данной схеме можно дать определение всех 3-х типов экологических показателей:

- показатели нагрузки на ОС, описывающие антропогенное воздействие на ОС;

- показатели состояния ОС, отражающие качество ОС, а также качество и количество природных ресурсов. Они отражают конечную цель экологической политики. На практике процесс измерения состояния ОС оказывается либо очень трудным, либо дорогим, поэтому в качестве замены часто используется измерение нагрузки на ОС;

- показатели ответной реакции «зелёных», показывают, насколько активно общество (личности, группы) реагируют на изменения состояния ОС.

Показатель потенциала загрязнения атмосферы. (ПЗА)представляет собой оценку возможного загрязнения атмосферы, создаваемого под влиянием заданного комплекса метеорологических условий при фиксированных параметрах выбросов.

Популяция - совокупность особей одного вида, обладающих способностью свободно скрещиваться и неограниченно долго поддерживать устойчивое существование в пределах однородного участка (например, сообщества). Популяция определяется общностью происхождения, сходством строения и поведения.

Плотность популяции - число особей, или их биомасса, приходящаяся на единицу площади или объема жизненного пространства.

Динамика популяции - это процессы изменений её основных биологических показателей во времени. Главное значение в изучении динамики придаётся изменениям численности, биомассы и популяционной структуры.

Предельно допустимый сброс (ПДС) - это масса загрязняющего вещества, выбрасываемого отдельными источниками за единицу времени,

превышение которой приводит к неблагоприятным последствиям в окружающей среде или опасно для здоровья человека.

Предельно допустимая концентрация (ПДК) - понимается как количество вредного вещества в окружающей среде, которое не оказывает отрицательного воздействия на здоровье человека или его потомство при постоянном или временном контакте с ним. В настоящее время при определении ПДК учитывается не только степень влияния загрязнителей на здоровье человека, но и воздействие их на животных, растения, грибы, микроорганизмы, а также на природное сообщество в целом.

Природная среда - совокупность компонентов природной среды, природных и природно-антропогенных объектов.

Проба - часть анализируемого материала, представительно отражающая его состав.

Продуцирование - синтез нового биологического вещества, происходит за счёт роста организмов и рождения особей; и тот и другой процессы требуют определённых затрат энергии и вещества.

Радиоактивные нуклиды - это ядра нестабильных химических элементов, выпускающие заряженные частицы и коротковолновые электромагнитные излучения.

Результат анализа - среднее значение нескольких результатов единичных определений, полученных практически в одинаковых условиях для одной пробы.

Реофилы - пресноводные животные, обитатели быстротекучих вод.

Сапробность - степень насыщения воды разлагающимися органическими веществами.

Сенильные (растения) - утратившие способность к плодоношению, стареющие.

Симбиоз - взаимовыгодные связи видов, при которых организмы и популяции получают обоюдную пользу от этих отношений.

Протокооперация - вид симбиоза. При этой форме совместное существование выгодно для обоих видов, но не обязательно для них, т.е. не является непременным условием выживания популяции.

Скорость продуцирования биомассы - в экологии определяют специальным показателем - *продукцией*. В популяции продукция - это общая (суммарная) величина приращения её биомассы за единицу времени. Продукция трофического уровня - это суммарная продукция всех популяций, занимающих этот уровень.

Первичной продукцией называют скорость образования биомассы первичными продуцентами (растениями).

Чистая первичная продукция (фактический прирост массы растений) всегда меньше общей энергии, фиксированной в процессе фотосинтеза.

Вторичной продукцией называют скорость продуцирования биомассы гетеротрофами.

Стационарная площадка - площадка, на которой проводятся наблюдения по программе экологического мониторинга.

Стенобионт - организм, требующий строго определённых условий среды.

Структура сообщества - соотношение различных групп организмов, различающихся по систематическому положению, по роли, которую они играют в процессах переноса энергии и вещества, по месту, занимаемому в пространстве, в пищевой или трофической, сети, либо по иному признаку, существенному для понимания функционирования естественных экосистем.

Сукцессия (последовательность) - Необратимые однонаправленные смены сообществ (Внесезонные процессы, которые представляют собой определённую последовательность появления и исчезновения популяций разных видов в данном местообитании). Направленность сукцессионных изменений зависит от свойств составляющих их видов. Знание этих

свойств служит основанием для предсказания последовательности смен, связанных с деятельностью человека.

Толерантность - способность организмов выдерживать изменения условий жизни (например, колебания температуры, влажности, света).

Уничтожение химического оружия - процесс необратимого преобразования токсичных химикатов, боеприпасов и устройств, оборудования в целях приведения в состояние, не пригодное для использования в качестве химического оружия.

Условия повторяемости - условия, при которых результаты единичного анализа получают по одной и той же методике, на одних и тех же пробах в одинаковых условиях и практически одновременно (результаты параллельных определений).

Фауна - совокупность (список) видов животных, обитающих на данной территории.

Флора - совокупность (список) видов растений, обитающих на данной территории.

Фитоценоз - растительное сообщество, совокупность совместно произрастающих растений на однородном участке территории.

Фитофаги - животные, питающиеся растительной пищей

Фитопланктон - взвешенные в воде растения

Фитоценоз - растительное сообщество

Фитопатогены - общее название паразитов, которые поражают растительные организмы.

Химическое оружие - в совокупности или в отдельности токсичные химикаты, боеприпасы и устройства, специально предназначенные для смертельного поражения или причинения иного вреда за счет токсических свойств токсичных химикатов, высвобождаемых в результате применения таких боеприпасов и устройств, а также оборудование, специально предна-

значенное для использования непосредственно в связи с применением указанных боеприпасов и устройств.

Хищничество - такой тип взаимоотношения популяций, при котором представители одного вида поедают (уничтожают) представителей другого вида, т.е. организмы одной популяции служат пищей для организмов другой популяции.

Ценозообразователи - виды, образующие сообщества.

Эврибионт - организм, способный жить при различных условиях среды.

Эдафобионты (геобионты) - обитатели почвенной среды

Экологический контроль - система мер, направленная на предотвращение, выявление и пресечение нарушения законодательства в области охраны окружающей среды, обеспечение соблюдения субъектами хозяйственной и иной деятельности требований, в том числе нормативов и нормативных документов, в области охраны окружающей среды.

Экологическая ниша - совокупность всех факторов (условий) и ресурсов среды, в пределах которой может существовать вид в природе.

Экосистема - любое сообщество живых существ с его физической средой обитания, функционирующее как единое целое. Понятие очень широкое и применимое как к естественным (например, тундра, океан), так и к искусственным комплексам (например, аквариум).

Энергетический бюджет - соотношение между энергией, полученной организмом извне, и её расходом на построение тела, размножение, выполнение работы, связанной с движением и поддержанием всех иных процессов жизнедеятельности

Энтомофауна - совокупность видов насекомых, фауна насекомых.

Эпифиты - организмы, обитающие на поверхности растений, но не паразитирующие на них.

Эталонный (стандартный) токсикант - вещество с известными токсическими свойствами, использующееся для проверки пригодности тест-объекта к биотестированию, а также для установления повторяемости и воспроизводимости результатов.

Эдафобионты (геобионты) - обитатели почвенной среды

Экология - (греч. «дом» и «учение»)

Обыкновенно понимается в естественнонаучном смысле как наука о биосфере, о равновесии этой биосферы, *о взаимодействии человека с природой как с домом, в котором он живёт*. Возникла на пересечении проблем биологии, социологии, географии и философии естествознания. В современном понимании слово «экология» многозначно, выступая в следующих значениях:

- наука, изучающая взаимодействие растений, животных, людей между собой и окружающей средой.
- окружающая человека среда; природа как сфера его деятельности.
- комплекс научных дисциплин и практических мер по изучению воздействия деятельности человека на природу, забота об окружающей среде.

Экогенез - процесс развития взаимоотношений между живыми организмами и средой обитания на протяжении истории их существования.

Экоцид - нарушение природного равновесия.

Экологический надзор - система сбора, анализа и интерпретации данных об экологической обстановке обслуживаемой территории включая периодическую отчётность по собранной информации перед заинтересованными лицами.

Экологическое наблюдение - диагностическая часть эконадзора.

Экологический контроль - система мероприятий, основанная на экологической диагностике (экологическом наблюдении) и направленная на предупреждение возникновения и распространения негативной тенден-

ции к ухудшению состояния здоровья населения (улучшение качества среды обитания - сюда входит состояние среды обитания, санитарно-гигиенические факторы, образ жизни, эффективность организации помощи населению

Эксплеренты - растения, быстро захватывающие свободные территории, энергично развивающиеся и легко уступающие занятую площадь другим видам.

Ювенильные (например, растения) - молодые растения, проростки.

Ярусность - расчлененность растительного сообщества на горизонты, слои, ярусы, и другие структурные и (или) функциональные толщи; вертикальность структуры леса.