628.394
М-54

ВНИРО

Вр. хр.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО УСТАНОВЛЕНИЮ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ВОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ

Москва 1986

628.394
М-54
3012

Министерство рыбного хозяйства СССР

Всесоюзный научно-исследовательский институт
морского рыбного хозяйства и океанографии
ВНИРО

УТВЕРЖДАЮ:
Зам. Министра рыбного хозяйства СССР
Б.Д. Монаков
"__" марта 1986 г.

СОГЛАСОВАНО:
Председатель Комиссии по водной токсикологии АН СССР д.б.н. профессор
С.А. Патин

СОГЛАСОВАНО:
Начальник Главрыбвода Минрыбхоза СССР, д.т.н.
И.В. Никоноров

СОГЛАСОВАНО:
Зам. начальника Управления науки, техники и АСУ Минрыбхоза СССР, к.г.н.
М.К. Спичак

СОГЛАСОВАНО:
Председатель Ихтиологической Комиссии Минрыбхоза СССР, д.б.н. профессор
П.А. Моисеев

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по установлению предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ для воды рыбохозяйственных водоемов

ВНИРО
№ Вх.
Библиотека

Москва 1986

УДК 628.394.17:661.185

Методические рекомендации составлены:
раздел 1 – д.б.н.Патиным С.А., к.б.н.Лесниковым Л.А., раздел 2 – – к.б.н.Филенко О.Ф., к.б.н.Киршиной Л.П., раздел 3 – Балабановой Т.С., к.б.н.Ярушек Н.Е., раздел 4 – к.б.н.Дмитриевой А.Г., к.б.н.Мосиенко Т.К., раздел 5 – д.б.н.Строгановым Н.С.,к.б.н.Король В.М., раздел 6 – к.б.н.Голубковой Э.Г.,раздел 7 –к.б.н.Лесниковым Л.Н., к.б.н.Исаковой Е.Ф., Колосовой Л.В., раздел 8 – – Тишиной С.В., раздел 9 –Колосовой Л.В.,к.б.н.Данильченко О.П., Н.С.Бузиновой,раздел 10 –к.б.н.Крыловым О.Н.,к.б.н.Поповой Г.В., к.б.н.Путинцевым А.И., к.б.н.Щербаковым Ю.А., раздел 11 – к.б.н. Данильченко О.П., к.б.н.Горевой В.А., к.б.н.Самылиным А.Ф., раздел 12 – к.м.н.Прокопенко В.А., д.б.н.Патиным С.А., к.м.н. Гвозденко С.И., к.б.н.Маловицкой Л.М.

© Всесоюзный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), 1985 г.

I. ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ РАЗРАБОТКИ ПДК ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ВОДЫ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ

Принятая в нашей стране система контроля и регламентации качества водной среды рыбохозяйственных водоемов основана, как известно, на установлении предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ в воде путем выполнения по определенной схеме экспериментов с гидробионтами – представителями разных уровней и звеньев водной экосистемы. Принципиальные методические основы этой системы, заложенные Н.С.Строгановым и развитые в работах А.Г.Гусева, Л.А.Лесникова и других советских исследователей, прошли апробацию и были реализованы в процессе установления более 500 рыбохозяйственных ПДК, занесенных в официальный перечень и включенных в "Правила охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами". Таким образом, можно констатировать наличие теоретического фундамента и значительных прикладных достижений водной токсикологии в области охраны водоемов от антропогенных воздействий.

Вместе с тем, накопленный к настоящему времени обширный опыт токсикологических исследований, и прежде всего в процессе разработки ПДК, дает основания для критического осмысливания и методического совершенствования современной практики регламентации допустимых уровней загрязнения рыбохозяйственных водоемов. Своевременность такого подхода определяется также и тем, что в последние годы заметно расширился арсенал методических приемов и средств водной токсикологии, увеличилось число публикаций и количество научных коллективов, работающих в этой области. Надо учесть также нарастающий поток и разнообразие загрязняющих водоемы веществ, что требует повышения эффективности и экспрессности системы токсикологического контроля и рыбохозяйственной регламентации новых токсикантов.

ПДК – это экспериментально установленное и официально утвержденное максимально допустимое постоянное содержание в воде вредного вещества и его метаболитов, при котором в водоеме не возникают последствия, снижающие его рыбохозяйственную ценность или затрудняющие его рыбохозяйственное использование. С гидробиологических позиций такое требование означает сохранение в пределах естественной изменчивости основных параметров, определяющих структурную и функциональную целост-

ность экосистемы водоема рыбохозяйственного назначения. Только в этом случае можно гарантировать нормальное существование, воспроизводство и численность хозяйственно важных видов как неотъемлемых компонентов водной экосистемы.

Экспериментальное обоснование ПДК представляет собой систему комплексных (токсикологических, гидрохимических и др.) испытаний данного вещества с использованием гидробионтов, охватывающих основные трофические уровни и звенья круговорота веществ в водоеме. Эта система должна быть ориентирована на поиски и количественную оценку максимальной недействующей концентрации данной примеси, при которой возможно нормальное существование и воспроизводство гидробионтов, характерных для экосистемы рыбохозяйственного водоема и определяющих возможность его использования в рыбохозяйственных целях (промысловое изъятие, воспроизводство и выращивание хозяйственно важных видов и др.). В качестве ПДК принимается допустимая (недействующая) концентрация для наиболее слабого (чувствительного) звена среди всего набора использованных тест-объектов.

Изложенные требования общего характера предполагают постановку опытов с представителями всех групп водного населения, включая продуцентов, консументов, редуцентов, а также разные жизненные формы водной биоты (планктон, нектон, бентос). Накопленный к настоящему времени обширный токсикологический материал позволяет выделить минимальный набор тест-объектов, что существенно снижает трудоемкость работ по установлению ПДК и в то же время обеспечивает достаточную надежность конечных результатов.

Сравнительный анализ токсикологических данных по веществам, для которых установлены ПДК, показывает, что в большинстве случаев (около 90%) наиболее слабыми звеньями, по которым шло нормирование и которые определяли конечные результаты установления ПДК, были планктонные ракообразные (главным образом, дафнии), развивающаяся икра, личинки и молодь рыб и одноклеточные водоросли. Аналогичный вывод получен по материалам многочисленных работ с морскими организмами (Патин, 1979).

Таким образом, исходя из практики рыбохозяйственного нормирования загрязнения водоемов, схема установления ПДК вредных веществ в водной среде должна включать следующий минимальный набор исследований:[x)]

[x)] Использование всех перечисленных ниже показателей действия не является обязательным. Их набор может быть сокращен или расширен, по усмотрению авторов, при соответствующем обосновании.

I. Определение растворимости, устойчивости и сроков детоксикации вещества и его метаболитов в воде.

2. Оценка влияния вещества на химический состав и процессы самоочищения водной среды (pH, растворенный кислород, азот нитратов и нитритов, аммонийный азот, $БПК_5$, численность сапрофитной микрофлоры, органолептические свойства).

3. Установление влияния вещества на процессы первичного продуцирования с использованием в качестве тест-объектов культур массовых видов одноклеточных водорослей (хлорелла, сценедесмус и др.), а в качестве регистрируемых показателей - изменение скорости деления и численности клеток, нарушение интенсивности фотосинтеза, пигментного состава и других параметров, характеризующих первичное биопродуцирование. Продолжительность опытов - не менее IO сут.

4. Опыты на массовых формах зоопланктонных организмов (дафнии, циклопы, копеподы и др.) с регистрацией показателей выживаемости и плодовитости на двух-трех поколениях или популяциях, а также физиолого-биохимических и морфологических аномалий в присутствии токсиканта. Продолжительность опытов - до 30-40 сут.

5. Опыты на рыбах, включая следующие стадии развития и показатели действия вещества:

- развивающаяся икра и личинки рыб (выживаемость, рост, пульсация сердца, морфологические аномалии и др.);

- сеголетки или взрослые рыбы (выживаемость, темп роста, физиолого-биохимические, поведенческие и морфологические нарушения, органолептические качества и др.).

Продолжительность опытов на рыбах - до 3 мес (в зависимости от стабильности вещества). Кроме указанных показателей действия вещества на рыб, могут быть использованы и другие характеристики нарушения жизнедеятельности (например, цитогенетические иммунобиологические и др.).

Каждая серия опытов должна сопровождаться контрольным вариантом без введения токсиканта с регистрацией соответствующих показателей. Эффект действия оценивается по относительному отклонению того или иного показателя в опыте по сравнению с контролем. Более подробно приемы и методы постановки опытов с различными организмами изложены в соответствующих частных методиках.

Каждая из перечисленных выше групп организмов должна быть представлена по меньшей мере одним видом, достаточно характерным и распространенным в водоемах рыбохозяйственного назначения. В отдельных случаях, по усмотрению авторов, этот набор может быть

расширен, например за счет включения в схему испытаний представителей бентосного населения, особенно когда исследуются плохо растворимые вещества, локализующиеся у дна. Что касается выбора показателей действия, то предпочтение необходимо отдавать тем из них, биологическая значимость которых с точки зрения условий существования и воспроизводства вида вполне очевидна(выживаемость, плодовитость, темп размножения и роста, физиолого-биохимические и другие показатели). В целом при формировании набора тест-объектов и регистрируемых показателей следует учитывать как физико-химические особенности исследуемого вещества (растворимость, форма нахождения и распределения в воде), так и его предполагаемые токсические свойства (интенсивность и механизм действия,пути поступления в организм и др.), о которых можно судить заранее либо по литературным данным, либо по аналогии с уже исследованными веществами, либо по результатам предварительных острых опытов.

В экспериментах должна быть обеспечена достаточная статистическая надежность получаемых результатов. В качестве пороговой (допустимой) концентрации вредного вещества в воде условно принимается та концентрация, при которой данный регистрируемый показатель статистики достоверно отклоняется (обычно в пределах 5-15%)от значения этого же показателя в контрольном варианте опыта без введения исследуемого вещества.

Отчет о выполненной работе должен содержать следующие основные разделы:

I. Характеристика исследуемого вещества, в том числе:

химическая характеристика (химическое наименование, синонимы, товарные наименования, химическая формула и принадлежность к химическому классу веществ);

физические и физико-химические параметры (агрегатное состояние, молекулярная и удельная масса, температура плавления и кипения, растворимость в воде при температуре 20°С, температура воспламенения, чистота исследованных образцов, состав и содержание примесей);

условия хранения, органолептические показатели чистого вещества и в растворах (цвет, запах, мутность, пено- и пленкообразование);

производственно-технологическая характеристика (назначение вещества, область, формы и способы применения, существующий и планируемый объем производства);

поступление в окружающую среду (содержание вещества в сточных водах, объемы и районы поступления стоков, существующие или планируемые методы очистки стоков, характеристика водоемов, куда поступает вещество, возможность поступления в атмосферу и почвы, вероятность и характер изменения структуры и свойств веществ в водоеме);

возможность аналитического определения и краткая характеристика рекомендуемого метода.

Перечисленные сведения должны быть представлены организацией-заказчиком при оформлении заказа на разработку ПДК.

2. Обзор литературных данных с анализом имеющихся материалов по данному веществу или по веществам, близким к нему по свойствам.

3. Объекты и методы исследования с обоснованием выбора тест-объектов и регистрируемых показателей и описанием методик постановки опытов с каждым из тест-организмов (приготовление исходных растворов вещества, введение культур организмов, длительность опытов и т.д.).

4. Экспериментальная часть с изложением фактических данных по действию вещества на каждый из тестовых организмов.

5. Обсуждение результатов, представленных в сводной таблице, где указаны: группы исследованных организмов, их видовые названия, регистрируемые показатели, длительность опытов и допустимые (пороговые) концентрации в мг/л или мл/л для всех вариантов опытов. Обоснование предлагаемой ПДК данного вещества.

6. Выводы с указанием рекомендуемой ПДК и лимитирующего показателя вредности. При наличии региональной или локальной специфики разработанного норматива и особенностей среды при постановке опытов (морская вода, вода с пониженной минерализацией или с аномальным солевым составом и др.) должны быть конкретизированы условия применимости данной ПДК.

Сводный отчет представляется в Главрыбвод Минрыбхоза СССР для последующего рецензирования, рассмотрения и утверждения на Научно-техническом совете.

Наряду с изложенной схемой возможны другие варианты рыбохозяйственной регламентации загрязнения, ориентированные на экспрессную оценку токсичности многочисленных препаратов (особенно пестицидных) с целью выбора среди них наиболее безвредных и обоснования ориентировочных безопасных уровней воздействия (ОБУВ). Подобные экспресс-методы, в том числе основанные на острых опытах

с одним-двумя видами гидробионтов, расчетных и экстраполяционных приемах, а также на поисках "лидирующей" концентрации, подлежат соответствующему обоснованию, изложению в виде методических указаний и рассмотрению в установленном порядке.

2. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ И ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В РАСТВОРАХ

Химико-аналитическое исследование. Эти работы выполняются в случае отсутствия необходимой информации о стабильности и поведении токсиканта в воде. Опыты ставятся в стеклянной посуде вместимостью не менее 20 л с открытой поверхностью при температуре воды 18 ± 2^{0}C, pH $7{,}5 \pm 1$ и естественном освещении в трех концентрациях, отличающихся в 10 раз, меньшая из которых определяется порогом чувствительности аналитического метода. Один из аквариумов является контрольным, и токсикант в него не вносится. Пробы для анализа отбирают на 1-е, 2-е, 3-ьи, 4-е, 5-е, 7-е, 10-е, 20-е и 30-е сутки. Время, в течение которого вещество разрушается до нетоксичных производных или улетучивается из раствора, характеризует его стабильность. На основании аналитических определений вычисляют время убывания концентрации вещества в растворе на 95%.

Расчет производится методом регрессии с учетом того, что убывание концентрации вещества в растворах имеет обычно экспоненциальный характер и описывается уравнением $\lg C = \lg C_0 - t/\tau$, где C - концентрация вещества в момент определения в мг/л; C_0-исходная концентрация; t - время в сутках; τ - константа скорости убывания вещества в растворе в сутках. Коэффициенты этого уравнения на основании полученных данных вычисляются обычными методами регрессии. Если принять $y = \lg C$, $A = \lg C_0$, $x = t$ и $B = -1/\tau$, то уравнение приобретает следующий вид: $y = A + Bx$. A и B вычисляются методом наименьших квадратов по уравнениям:

$$A = \frac{(\Sigma y - B\Sigma x)}{n} \quad ; \quad B = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2},$$

где n - число определений во времени.

По этому уравнению оценивают время уменьшения концентрации загрязнителя на 95%. Этот же показатель может быть определен и графически. С этой целью строится график убывания концентрации

веществе, на осях откладывают время-логарифм концентрации в данное время. Из точки прямой, соответствующей логарифму 5% вещества от исходного уровня, опускают перпендикуляр. Точка пересечения его с осью времени и определит срок разрушения 95% вещества.

Токсикологическое исследование. Необходимость этого исследования обусловлена тем, что химико-аналитические определения не позволяют оценить остаточную суммарную токсичность вещества и продуктов его превращения. В качестве тест-объекта могут быть использованы дафнии.

В соответствии с общими требованиями для опытов на острую токсичность (см. раздел 6) определяется $ЛК_{50}$ (концентрация, при которой погибают 50% особей) за 24 ч. Влияние каждой из концентраций исследуется не менее, чем в трех параллельных опытах. Для каждой концентрации определяется количество погибших за 24 ч дафний и квадратичное отклонение (σ). Отклонения, не превышающие 2σ, следует считать фоновыми.

При оценке динамики изменения токсичности вещества ставят три варианта опытов в зависимости от способа приготовления исходных растворов (рис. I).

I. Разведения, приготовленные из исходного вещества до концентрации $ЛК_{50}$ за 24 ч через 2, 4, I0, 20 и 30 сут после начала опыта. Этот опыт служит контролем культуры дафний.

2. Разведения, приготовленные из маточного раствора на 2-е, 4-е, I0-е, 20-е и 30-е сутки. Маточный раствор (т.е. исходное разведение в высокой концентрации) в это время находится в закрытой стеклянной колбе при обычных условиях хранения. На основе этого опыта делается заключение об изменении токсичности маточного раствора. Данные по гибели дафний через 24 ч сопоставляются с результатами, полученными для соответствующего срока в первом варианте опыта. Срок, когда среднеарифметические значения смертности в % за 24 ч отличаются от гибели 50% более, чем на 2σ, следует считать сроком, когда необходимо заменять маточный раствор. Однако в любом случае периодичность замены растворов не должна превышать I раза в 3 сут.

Определение токсичности помимо исходного дня на I0-е, 20-е и 30-е сутки проводится с целью оценки маточного раствора и его пригодности для дальнейших опытов.

3. Разведение до концентрации $ЛК_{50}$, приготовленное из этого же маточного раствора в стеклянном сосуде с открытой поверхно-

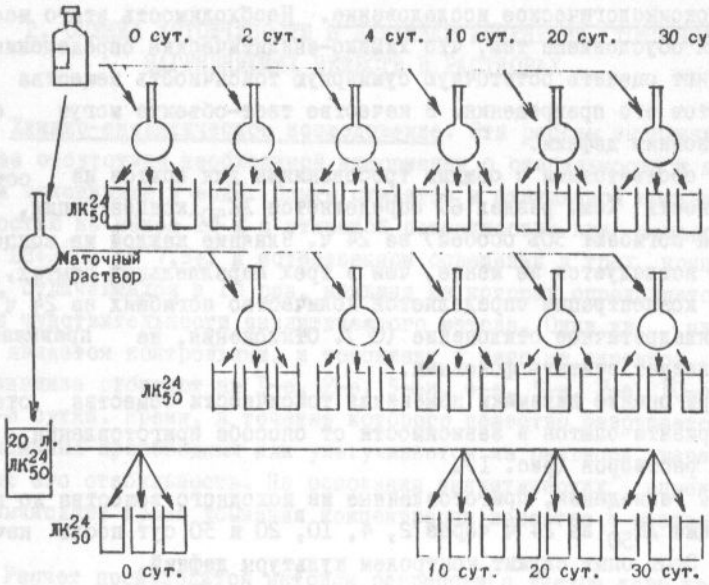

Рис. I. Схема постановки опытов для оценки динамики изменения токсичности растворов вещества во времени

стью. Раствор объемом не менее IO л находится при pH 7-8, жесткости IO^{o}, температуре $I8 \pm 2^{o}C$, естественном освещении и аэрации. Из этого сосуда отбирают растворы для оценки токсичности в день разведения, на IO-е, 20-е и 30-е сутки. На основании этих данных определяется возможная динамика токсичности в водоеме.

С учетом относительного изменения токсичности по срокам определяется общая закономерность этого изменения по тем же правилам, что и химическая устойчивость вещества. Рассчитав сроки убывания токсичности на 95%, можно оценить коэффициент запаса для допустимой концентрации с учетом следующих соотношений:

Срок уменьшения токсичности на 95%, сут	Коэффициент запаса К
до 10	1
11-60	2,5
61-90	7,5
91-180	13,5
181-365	27,0

Эти коэффициенты могут быть учтены при выведении допустимых концентраций для долгоживущих видов, для которых не удается в лабораторных условиях определить влияние вещества на протяжении естественной продолжительности жизни. Для этого определенную в качестве допустимой концентрацию необходимо разделить на коэффициент запаса.

При наличии данных по химической стабильности вещества в растворе может быть проведено сравнение их с результатами биологических наблюдений и сделан вывод о токсичности продуктов распада вещества.

Определение токсичности каждой из проб необходимо проводить не менее, чем в трех стаканах по 10 дафний на 0,5 л раствора.

Хотя полное исследование динамики изменения токсичности занимает 30 сут, проведение всех основных опытов по определению ПДК может быть начато не позже, чем через 3-4 сут после начала опытов по оценке устойчивости, так как к этому времени уже известна периодичность замены растворов.

3. ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ НА ПРОЦЕССЫ САМООЧИЩЕНИЯ

Нарушение жизнедеятельности бактериального населения под действием загрязняющих веществ может привести к изменению качества водной среды и, в конечном итоге, к деградации экосистемы водоема. В связи с этим при установлении ПДК загрязнителей следует определять их влияние на разные группы бактерий-минерализаторов. Для экспериментального исследования предлагается следующая цепочка объектов: сапрофиты, растущие на МПА:10 (т.е. на мясопептонном агаре, разведенном в 10 раз), нитрификаторы 1-й фазы, нитрификаторы 2-й фазы. Наибольшей физиологической активностью обладают сапрофиты, которые первыми начинают процесс минерализации, разлагая азотсодержащую органику до аммонийного азота. Их сменяют нитрификаторы 1-й фазы, окисляющие аммонийный азот до нитритов, и затем нитрификаторы 2-й фазы, окисляющие нитриты до нитратов.

Для регистрации состояния бактерий в экспериментах предлагается следующий набор основных показателей:

численность сапрофитов; если вносимое вещество относится к веществам, легко усваиваемым бактериями, численность их значительно возрастает относительно контроля; если загрязнитель токсичен, количество микроорганизмов снижается;

дыхание бактерий, характеризующее их физиологическую активность, определяемое по $БПК_5$; в связи с тем, что токсическое действие некоторых неприродных соединений выражается в увеличении численности бактерий на фоне снижения их физиологической активности, необходимо регистрировать оба показателя одновременно;

растворенный кислород - показатель аэробного состояния среды;

аммонийный азот - продукт метаболизма сапрофитов-аммонификаторов;

азот нитритов - продукт метаболизма нитрификаторов I -й фазы;

азот нитратов - продукт метаболизма нитрификаторов 2-й фазы;

pH - показатель активной реакции среды.

Опытные лабораторные сосуды должны находиться в помещении, где отсутствуют химикаты, при температуре $20\pm2^{\circ}C$ и естественном, но не прямом освещении во избежание развития фитопланктона. Необходимый для опытов набор оборудования включает: стеклянные кристаллизаторы на 5 л, кислородные склянки вместимостью примерно 200 мл, чашки Петри, пипетки на 0,I, I, 2, 5, I0 мл, пробирки, мерные колбы на 50, I00, 200, 250, 500 и I000 мл, бюретки, фотоэлектроколориметр или спектрофотометр, потенциометр, автоклав, термостат с водяной рубашкой для поддержания температуры $20\pm2^{\circ}C$, термостат-стерилизатор.

Острый опыт проводится с пятью-шестью концентрациями исследуемого вещества, отличающимися друг от друга на порядок величин. Опыты проводятся в стеклянных кристаллизаторах, наполовину заполненных природной водой из чистого водоема, профильтрованной через мельничный газ № 76 и содержащей естественную микрофлору. Для моделирования процесса самоочищения в опытной воде растворяют пептон из расчета 3 мг/л. $БПК_5$ такого раствора не превышает 5 мгО/л. После растворения пептона в сосуды вносится токсикант в соответственных количествах, содержимое перемешивается. В контрольный сосуд токсикант не вносится.

В остром опыте контролируется один показатель - численность сапрофитов, растущих на МПА:I0. Посевы проводятся в трехкратной

повторности глубинным методом (Романенко, Кузнецов, 1974). Чашки Петри с посевами инкубируются в термостате при температуре 20 ± ±2°С в течение 2 сут, после чего осуществляется просчет количества выросших колоний. Отбор проб производится ежедневно в течение 4-5 сут. На основании полученных результатов планируется длительный эксперимент.

Длительный эксперимент. Постановка длительного опыта осуществляется в тех же условиях, что и острого эксперимента. Действие вещества исследуется в пяти концентрациях. За максимальную концентрацию принимается наименьшая, при которой в остром опыте происходило снижение численности сапрофитов относительно контроля более чем на 25%. Последующие концентрации составляют 0,1 часть от каждой предыдущей. Опыт проводится в трех повторностях. На протяжении эксперимента учитываются следующие показатели:

1) pH (0, 10-е, 20-е, 30-е сутки);

2) растворенный кислород (0, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 15-е сутки);

3) численность сапрофитов, растущих на МПА:10 (0,1-е, 3-и, 5-е, 7-е сутки);

4) $БПК_5$ (0, 1-е, 3-и, 5-е, 7-е сутки);

5) азот аммонийный (0, 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 15-е сутки);

6) азот нитритов (5-е, 7-е, 8-е, 9-е, 10-е, 12-е, 15-е сутки);

7) азот нитратов (7-е, 9-е, 10-е, 12-е, 15-е, 20-е, 25-е, 30-е сутки).

Химические анализы проводятся по общепринятым методикам (Лурье, 1971). Длительность эксперимента обусловливается полной минерализацией азотсодержащей органики в контроле до стабильной формы азота в виде нитратов. При графическом изображении результатов момент окончания опыта определяется выходом нитратов в контроле на плато. Этот период составляет не более 25-30 сут.

Полученный цифровой материал по каждому показателю обрабатывается статистически. Рассчитывается достоверность отличия опытных величин от контрольных. По средним значениям строятся графики по каждому показателю: по оси абсцисс откладывается время в сутках, по оси ординат - показатели.

К токсичным концентрациям вещества следует относить такие, при которых зарегистрированы следующие изменения: повышение или

понижение pH более чем на I,5 ед.; уменьшение содержания кислорода до 2 мгО/л; снижение численности сапрофитов, количества нитритов или нитратов в опыте более чем на 25%.

Концентрации веществ, при которых наблюдается бактерицидный эффект, следует считать летальными. При действии сублетальных концентраций происходит частичная гибель бактерий, снижение их физиологической активности. Под действием стимулирующих концентраций загрязнителей происходит увеличение численности сапрофитной микрофлоры и ее физиологической активности. В том случае, если стимулирующий эффект не вызывает дефицита кислорода и не тормозит процесс нитрификации, его можно считать допустимым. Безвредной для процессов самоочищения следует считать такую концентрацию, при которой все исследуемые показатели отклоняются от соответствующих значений в контроле менее чем на 25%.

Экспресс-метод. По результатам ранее проведенных экспериментов установлено, что при действии соединений разной химической природы на последовательные стадии процесса самоочищения наиболее уязвимым звеном является стадия нитрификации I-й фазы. На этом основан экспресс-метод установления безвредной концентрации исследуемых веществ, который осуществляется в процессе десятидневного эксперимента по моделированию процесса нитрификации. Условия лабораторного содержания и оборудование те же, что и в основной методике.

В природную воду, взятую из чистого водоема и профильтрованную через мельничный газ № 76, вносится в качестве субстрата водный раствор хлористого аммония в таком количестве, чтобы содержание его составляло I мг/л. В опытные сосуды добавляется токсическое вещество в пяти концентрациях, возрастающих последовательно на один порядок. Опыт проводится в трехкратной повторности.

Регистрируются следующие показатели: pH (0, 5-е, I0-е сутки), растворенный кислород (5-е, 7-е, I0-е сутки); азот аммонийный (0, 5-е, 7-е, 8-е, I0-е сутки); азот нитритов (0, 5-е, 7-е, I0-е сутки); азот нитратов (0, 5-е, 7-е, 8-е, I0-е сутки). Полученные результаты оформляются графически.

О характере действия разных концентраций изучаемого вещества следует судить по динамике минеральных форм азота. За безвредную концентрацию принимается та, при которой величина накопленного азота нитритов или нитратов не отличается от контрольной более чем на 25%.

4. ОПЫТЫ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРОСЛЯХ

Характеристика тест-объектов и регистрируемых показателей. Диатомовые водоросли весьма чувствительны к загрязнениям, но их культивирование в лабораторных условиях представляет значительные трудности. Поэтому рекомендовать их в качестве тест-объекта можно только при наличии благоприятных условий для выращивания - пониженные температуры, изоляция от других выращиваемых водорослей во избежание попадания спор (особенно протококковых водорослей), грибов и бактерий, так как культуры диатомовых водорослей в нестерильных условиях легко засоряются и плохо растут.

Наибольший интерес представляет культивирование массовых видов зеленых и синезеленых водорослей, в значительных количествах представленных в пресноводных водоемах различных зон Советского Союза. Из зеленых водорослей рекомендуется использовать виды родов хлорелла (Chlorella vulgaris Beyer, Chl.pyrenoidosa Chik) или сценедесмус (Seenedesmus quadricauda(Turp,) Bréb, Sc.acuminatus(Lagerh.)Chod.) а для сильно евтрофированных и загрязненных вод - культуру синезеленой водоросли микроцистис (Mycrocystis seruginosa Kutz.emend.Elehk.).

Основными показателями, по которым устанавливается токсичность веществ для водорослей, являются: I) визуальные наблюдения за состоянием культуры водорослей (побурение, посветление, лизис и т.п.); 2) изменение численности клеток водорослей (выживаемость) - счет клеток в определенном объеме (камере);3) изменение интенсивности фотосинтеза кислородным или радиоуглеродным методом; 4) определение живых и мертвых клеток водорослей методом люминесцентной микроскопии; 5) определение pH.

Установление ПДК по одному показателю (например, выживаемости) для водорослей явно недостаточно, так как многие токсиканты обладают специфичностью действия. Поэтому для более полной оценки токсического действия веществ можно использовать следующие показатели: I) соотношение живых и мертвых клеток водорослей, определяемое с помощью цитохимических методов; 2) биомассу водорослей (полученную расчетным способом); 3) содержание фотосинтезирующих пигментов - хлорофиллов и каротиноидов; 4) скорость и темп развития водорослей (расчет генераций);5)длительное послесвечение (ДПС) клеток водорослей и другие физиологические и биохимические показатели.

Условия лабораторного содержания. Водоросли для опытов рекомендуется брать из альгологически чистых коллекций культур. Способы выделения из естественных водоемов видов водорослей, вводимых в культуру, подробно описаны в литературе (Гусева, 1956; Штина, 1965 и др.). Для выделения культуры водорослей родов хлорелла и сценедемус, живущих в загрязненных водоемах, рекомендуется использовать питательный раствор №1 Е.Е.Успенского следующего состава (г/л): KNO_3 (0,025); $MgSO_4$ (0,025), $Ca(NO_3)_2$ (0,1); KH_2PO_4 (0,025), K_2CO_3 (0,0345).

Представители рода микроцистис лучше всего развиваются на среде Фитцджеральда № II в модификации Цендера и Горэма следующего состава: $NaNO_3$ (0,496 г/л); K_2HPO_4 (0,039 г/л); $MgSO_4$ $7H_2O$ (0,075 г/л); $CaCl_2$ (0,036 г/л); Na_2CO_3 (0,020 г/л); Na_2SiO_3 (0,058 г/л); железо лимоннокислое (0,006 г/л); лимонная кислота (0,006 г/л); трилон "Б" (0,001 г/л); микроэлементы (0,08 мл/л). Раствор микроэлементов (г/л): H_3BO_3 - 3,1; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 2,23; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,287; $(NH_4)Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ - 0,08; $Co(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,146; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,033; KBr - 0,119; KI - 0,083; $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,154; $NiSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ - 0,198; $VSO_4 \cdot 4H_2O$ - 0,020; $Al_2(SO_4)K_2SO_4 \cdot 24H_2O$ - 0,474. Микроэлементы и железо лимоннокислое добавляют после стерилизации. Водоросли в культуре легко адаптируются к температурным условиям и обычно хорошо растут при температуре 18-22°С. Зеленые водоросли в культуре растут в люминостате при температуре 18-20°С, а синезеленые - при 18-23°С при естественном освещении и досвечивании в течение 12 ч в сутки лампами дневного света при общей освещенности 3-5 тыс.лк. Повышение температуры до 25-28°С и выше усиливает токсическое действие, а понижение ее до 12-15°С задерживает и снижает эффект действия токсиканта.

Если нет термостатированных шкафов, испытания проводятся при комнатной температуре. В таких случаях рекомендуется ставить еще один дополнительный контроль с использованием вещества, действие которого на водоросли хорошо известно. По его действию вводятся поправки на задержку или ускорение влияния нового вещества, т.е. известные по своему действию на водоросли вещества являются как бы эталоном, с которым сравнивается действие неизвестного вещества.

Водоросли выращиваются в колбах Эрленмейера на 0,5-0,8 л, закрытых ватно-марлевыми пробками, которые сверху прикрываются колпачком из стерильной пергаментной бумаги или полиэтиленовой

пленки (последнюю стерилизуют, выдерживая 30–60 мин в спирте). Колбы устанавливают на стеллажи, освещают по возможности снизу, что способствует более равномерному освещению. Выращивать водоросли при прямом солнечном освещении не рекомендуется, так как может произойти перегревание питательной среды и выцветание пигментов. Объем суспензии составляет 250–300 мл. Для проведения сравнительных серий опытов водоросли следует выращивать на одной питательной среде: хлореллу и сценедемус на среде Успенского № I, а микроцистис – на среде Фитцджеральда № II в модификации Цендера и Горяма. Во избежание оседания клеток водорослей на дно колбы или их прикрепления к стенкам сосуда, а также для более усиленного растворения CO_2 содержимое колб постоянно перемешивают (минимально – дважды в сутки), избегая намокания пробок.

Постановка опытов. Длительность острых опытов – 5–10 сут, хронических – 30–35 сут. Опыты ставятся, как правило, без смены растворов. Со сменой растворов постановка опытов может быть рекомендована только при установлении ПДК для сточных вод, для которых готовятся различные разведения исследуемой воды.

Для проведения токсикологических опытов необходимо следующее оборудование: колбы Эрленмейера на 0,5–0,8 л (20–30 колб из расчета по три колбы для одной концентрации); мерные колбы и стаканы (0,5; 0,25; 0,1 и 0,05 л) – по 5 шт; кислородные склянки на 50–100 мл – 20–30 шт; бюретки на 25–50 мл – 2 шт; колбы Бунзена на 0,5 – I шт.; набор пипеток и цилиндров; колбы объемом 3–5 л для приготовления сред (3–4 шт.); предметные и покровные стекла; водоструйный насос; фильтр Зейтца-I шт, мембранные фильтры (от № 6 до № 2); микроскоп МБС-1а или МБИ-3; люминесцентный микроскоп МЛД-I (или МЛД-2, МП-I; МЛ-2); pH-метр; счетная камера Горяева или Фукс-Розенталя; счетчик для форменных элементов крови. Для более детальной оценки действия токсикантов на водоросли желательно иметь следующее оборудование: круглодонную колбу – I шт., фарфоровую ступку – I шт, фильтр Шота № 3 или № 4, градуированные пробирки на 10–25 мл – 20–30 шт., спектрофотометр СФ-16 (СФ-10А), фосфороскоп, полярограф, лабораторная центрифуга. Для определения живых и мертвых клеток водорослей с помощью цитохимических методов требуются следующие красители: метиленовый синий и нейтральный красный, ТТХ-хлорид, азур-эозин, для выделения пигментов – следующие реактивы: ацетон, этанол, $BaSO_4$ или $MgCO_3$, HCl, буферы.

ВНИРО
№ Вр-кл.
Библиотека

При исследовании токсичности веществ обычно принимаются во внимание литературные сведения об их токсичности. Если они отсутствуют, то готовят исходный раствор высокой концентрации (например, 10 мг/мл), а из него - серию концентраций в геометрической прогрессии с коэффициентом 10 (2 или 5 в зависимости от токсичности вещества). Максимальная концентрация вещества исходного раствора лимитируется его растворимостью в воде. Если вещество не растворяется в воде, то готовят исходный насыщенный раствор или же вещество растворяют в спирте (а иногда другом растворителе). В последнем случае, чем выше концентрация исходного раствора, тем меньше растворителя вносят в суспензию водорослей. Как правило, небольшие концентрации растворителя, например этанола (5-10 мл на 10 мл суспензии), безвредны для водорослей. Для действующих на водоросли концентраций растворителя ставят второй контроль, в который добавляют только соответствующие количества растворителя, чтобы вычленить его действие на водоросли.

При установлении токсичности сточной воды первоначально берется неразбавленная сточная вода или же заведомо действующая концентрация, известная по литературным данным. Затем получают концентрации сточной воды при определенном разведении, для чего после тщательного перемешивания половину раствора отливают и разбавляют водой до исходного объема, содержимое перемешивают, отливают половину раствора и снова разбавляют водой до исходного объема. Эта процедура повторяется до получения минимальной исследуемой концентрации. Питательная среда и суспензия водорослей, взятая для опыта, учитываются как вода-разбавитель. Обычно берется 8-9 концентраций в геометрической прогрессии со знаменателем 0,5, хотя по аналогии можно составить ряд концентраций и с другим коэффициентом прогрессии. В последнюю колбу сточная вода не добавляется, но все остальные элементы состава сред должны быть такими же, как и в опытных колбах. Это так называемый контроль.

Общий объем жидкости в колбах должен составлять 250-300мл, из которых 1/3 объема приходится на питательную среду, 1/5 -водоросли (суспензия), остальное - вода с добавлением исследуемых веществ. Обязательным условием для постановки опыта является добавление питательной среды из такого расчета, чтобы через 4-5 сут численность водорослей возросла по крайней мере в 2 раза.

При постановке экспериментов большое значение имеет физио-

логическое состояние культуры, ее возраст. Для эксперимента отбирается нормально развитая жизнеспособная культура водорослей; угнетенная и отмирающая культура не годится, как и старая разновозрастная культура. Используется культура с одновозрастными клетками, проходящими разные фазы роста и развития. Исходное количество клеток должно быть примерно одинаковым (концентрация - около I млн.клеток в I мл). Целесообразно вносить токсиканты в культуру водорослей в начальной фазе логарифмического роста после некоторого периода адаптации (не менее I-3 сут после посева в колбы), когда они более чувствительны к действию токсиканта.

Основным критерием токсичности при действии химических веществ и сточных вод на водоросли следует считать изменение численности водорослевых клеток, последовательности прохождения ими всех стадий развития и их способности к размножению. Общее число клеток оценивают в камере Горяева (или Фукс-Розенталя). При работе с камерой Горяева удобно просчитывать число клеток в 25 больших квадратах, а затем проводить пересчет на I $см^3$ по следующей формуле: $X=m10^4$, где X - общее количество клеток в I$см^3$, m - количество клеток (сумма) в 25 больших квадратах. Одновременно проводится подсчет делящихся клеток (2,4,8-клеточные агрегаты), что позволяет оценить темп деления клеток водорослей при действии токсикантов или сточной воды. Количество клеток выражают в млн. на I мл или в млрд. на I л.

Учет численности клеток можно также проводить в камере Фукс-Розенталя объемом 3,2 мл. При высокой численности клеток просчитывают по диагоналям I6 квадратов, при малой - считают по всему полю камеры. Количество клеток также выражают в млн.в Iмл (или млрд. в I л).

Для определения живых и мертвых клеток водорослей наиболее удобен метод люминесцентной микроскопии (Горюнова, I956). Ранжируя клетки по интенсивности свечения, можно установить время воздействия токсиканта на водоросли, степень и скорость их отмирания. При просмотре препаратов водорослей видно, что живые клетки флуоресцируют ярко-красными лучами. Клетки водорослей в различных стадиях отмирания имеют целую гамму переходных оттенков и цветов. В основном изменение спектра свечения водорослей проходит по следующим фазам: ярко-красное; тускло-бордовое или розово-красное; оранжево-розовое; голубовато-зеленое; оливково-зеленое. На практике в основном различают три цвета-ярко-крас-

ный, тускло-бордовый или оранжево-розовый и голубовато-зеленый. В стадии интенсивного роста клеток водорослей в культуре наблюдается минимальное количество мертвых клеток.

Микроскопируется обычный водный препарат, изготовленный на предметном стекле. Просмотр препарата можно проводить как в отраженном (падающем, верхнем) свете на микроскопах МЛД - I или МЛД-2, так и в проходящем свете на микроскопах МЛ-I или МЛ-2. Наиболее совершенна люминесцентная микроскопия в отраженном свете с использованием темнопольного конденсатора. Для просмотра водорослей наиболее оптимален следующий набор светофильтров: ФС-I-05; СЗС-7-2: СС-8. Возможны три комбинации просмотра препаратов: I) на предметное стекло наносится капля суспензии водорослей, накрывается покровным стеклом и микроскопируется;2)нанесенная капля просматривается с помощью водного иммерсионного объектива (для мелких форм водорослей); 3) капля наносится на мембранный фильтр (№ 5-2) во избежание текучести препарата, накрывается покровным стеклом и просматривается. Для просмотра рекомендуется готовить препарат с концентрацией клеток, не превышающей 30-50 экз. в поле зрения. Более плотные пробы для удобства подсчета необходимо перед микроскопированием разводить. В ультрафиолетовых или сине-фиолетовых лучах жизнеспособные особи светятся ярким пурпурно-красным цветом, отмирающие - различными оттенками тускло-красного и оранжево-красного тона, мертвые - - желтовато-салатовым цветом. При подсчете клеток водорослей учитываются все три группы: живые, мертвые и отмирающие клетки. Счет проводится не менее, чем в I0 полях зрения, а для получения более достоверных результатов можно считать до I00 полей зрения. Соотношение живых и мертвых клеток выражают в процентах от общего числа всех клеток, затем производят подсчет живых,отмирающих и мертвых клеток водорослей в культуре на основании данных по общей численности и выражают в млн.клеток на мл или в процентах от общего количества клеток. Полученные результаты заносятся в таблицу вместе с данными по общей численности клеток или изображаются графически.

Для оценки изменений интенсивности фотосинтеза кислородным методом экспонируют опытные и контрольные колбы с культурой при постоянной температуре и световом режиме в течение 24 ч, после чего культуру водорослей, не взбалтывая, отбирают сифоном в склянки на 50-I00 мл с притертыми пробками и ведут определение по методу Винклера (Строганов, Бузинова, I980). Метод основан

на связывании в щелочной среде растворенного в воде кислорода гидроокисью марганца с последующим окислением эквивалентного связанному кислороду количества калия (в кислой среде)и титрованием свободного йода гипосульфитом.

Расчет количества выделившегося кислорода проводят по разнице его содержания за единицу времени между опытными (экспонированными) и контрольными (исходными) склянками: $a=(x-x_I)\cdot K\cdot 0{,}16 / V$ (мг), где x - количество мл 0,02 н.гипосульфита, пошедшего на титрование пробы одного варианта; x_I - количество 0,02 н.гипосульфита (мл), пошедшего на титрование контроля (если последний не ставился, его в формуле опускают при определении содержания кислорода в воде); K - поправка к титру гипосульфита; 0,16 - количество кислорода, эквивалентное I мл 0,02 н.гипосульфита; V - объем, взятый для титрования ; a - количество кислорода (мг), выделенное I мл суспензии при расчете на объем.

Количество кислорода может быть пересчитано на сухое вещество в определенном объеме суспензии или на число клеток (I млн). По уровню снижения выделения кислорода (по отношению к контролю) можно судить о характере действия того или иного вещества на водоросли. Определение поглощения кислорода проводится тем же способом, только после определенного периода освещения осуществляют такую же темновую экспозицию. Для определения содержания кислорода при хроническом опыте, проводимого одновременно со счетом клеток, следует увеличить объем суспензии в колбах или ставить больше вариантов. Когда объем суспензии небольшой и мало повторностей при исследовании сточных вод, определение кислорода проводят в начале и в конце эксперимента. При небольших объемах суспензии водорослей в хроническом эксперименте удобно использовать полярографический метод определения кислорода (Гейровский, Кута, 1965). Но любой кислородный датчик калибруется, чаще всего калибровочные кривые строятся при одновременном параллельном определении содержания кислорода в среде по методу Винклера.При большом содержании органических веществ нужно использовать метод Ридель-Стварта или перманганатную модификацию метода Винклера.

Относительные изменения интенсивности фотосинтеза культур водорослей в присутствии токсикантов можно регистрировать также с помощью радиоуглеродного метода (Патин, Ткаченко, 1974).

Интересную информацию о состоянии культуры дает изменение pH среды: чем выше жизнеспособность водорослей, тем значительнее изменяется на свету реакция среды (подщелачивание) в результате фотосинтетической ассимиляции карбонатов. Измерение pH среды осуществляется обязательно в начале и конце опыта, при хроническом эксперименте – в дни снятия биологических показателей, в опытах со сточной водой – при каждой смене растворов.

Полученные в опытах с культурами водорослей результаты сводят в таблицы, в которых отражают концентрации веществ и показатели оценки действия последних. Для более четкого анализа рассчитывают отношение количества клеток (кислорода, пигментов и т.д.) в соответствующие сутки опыта при различных концентрациях к количеству клеток (кислорода, пигментов и т.д.) в контроле. Числовые показатели можно выражать графически на полулогарифмической бумаге: на оси абсцисс откладывают числовые показатели, а на оси ординат – lg концентраций. На основании графиков определяются пороговая концентрация токсиканта, время проявления токсического эффекта и его зависимость от концентрации изучаемого вещества. Пограничной величиной между безвредным и вредным действием нужно считать снижение (или увеличение) выживаемости водорослей (содержание кислорода, пигментов и т.д.) не более чем на 25%.

Если при действии токсикантов не наблюдается резких отличий от контроля по численности клеток (особенно по наличию живых клеток), не изменяется значительно темп развития и размножения, не нарушаются процессы фотосинтеза, то можно говорить о концентрации вещества, не токсичной для водорослей. Если же будет нарушен один из жизненно важных процессов, то в дальнейшем возможно изменение рыбохозяйственных функций водоема.

Экспресс-метод. В качестве экспресс-метода для определения токсичности веществ и сточных вод используют кратковременные опыты (5–15 сут в зависимости от токсиканта) с лабораторными культурами зеленых водорослей хлореллы или сценедесмуса. Действие веществ, являющихся ингибиторами фотосинтеза, уже проявляется в первые 3 сут после внесения вещества даже в незначительных концентрациях.

Действие веществ следует оценивать по следующим показателям: визуальной характеристике состояния культуры (побурение, посветление и т.п.); выживаемости (изменение общей численности клеток водорослей); количеству живых и мертвых клеток водорос-

лей, определяемому методом люминесцентной микроскопии (действие вещества может быть оценено в течение первых суток после внесения). Состояние культуры может быть также определено методом оценки длительного послесвечения клеток водорослей, который позволяет регистрировать отклик в культуре через 5-15 мин после внесения вещества.

Установление токсичности веществ специфического действия на водоросли требует проведения не 5-суточного, а более длительного эксперимента, поскольку действие веществ может проявиться только после накопления клетками определенного количества вещества (например, для веществ, обладающих нервно - паралитическим действием, длительность опыта должна быть не менее 15 сут).

Длительное послесвечение (ДПС) клеток водорослей. Метод измерения ДПС в настоящее время находит широкое применение для оценки функционального состояния водорослей при действии токсических веществ. Спектр возбуждения ДПС соответствует спектру возбуждения фотосинтеза, а спектр испускания совпадает со спектром флуоресценции хлорофилла. Составляющая свечения из общей люминесценции может быть выделена лишь после некоторого темнового интервала, в течение которого флуоресценция хлорофилла полностью затухнет. Послесвечение состоит из нескольких компонент, неодинаковых по природе и связанных с различными реакциями фотосинтеза.

Для определения ДПС используют фосфороскопы с вращающимися секторными дисками или цилиндрами со щелевыми отверстиями. Измеряют не только стационарную интенсивность, но и кривые затухания послесвечения с интервалом 10^{-4}-10^{-1}с после продолжительного освещения. Для регистрации ДСП 0,2-0,5 мл суспензии водорослей с плотностью не менее 1 млн.клеток в 1 мл помещают в кварцевую кювету. Если клетки мелкие, то для получения большей плотности культуру уплотняют центрифугированием. Реакция на токсикант может быть получена через 15-30 мин после его внесения, и выражается или в увеличении, или в уменьшении интенсивности послесвечения, а также в характере развития тушения на индукционных кривых.

В первую очередь регистрируют интенсивность ДПС у контрольного образца: после включения света сначала наблюдают высокий уровень послесвечения, который постепенно снижается (за 0,5-2 мин) до некоторого постоянного уровня (индукционная фаза). Через 15-30 мин после введения токсиканта в нужной концентрации

также регистрируют интенсивность послесвечения и характер тушения на индукционных кривых.

Полученные результаты интенсивности послесвечения выражают графически в зависимости от освещенности: на оси абсцисс откладывают освещенность (в процентах), на оси ординат – интенсивность послесвечения (в относительных единицах). Если отклонения изменений показателей (численности, количества живых и мертвых клеток водорослей и интенсивности ДПС) от контроля в течение 3–5 сут не превышают 10–15%, то можно концентрацию вещества, при которой нет существенных отклонений показателей от контроля в течение этих сроков, считать недействующей. Особенно четкие ответы дают методы люминесцентной микроскопии и длительного послесвечения при действии ингибиторов фотосинтеза (тяжелых металлов, некоторых пестицидов и ряда других веществ).

Определение биомассы. Одновременно с учетом численности клеток в начале, середине и конце опыта проводят промеры больших, средних и наиболее мелких клеток водорослей с помощью винтового объект-микрометра или непосредственно в камере. В последнем случае необходимо измерить длину сторон мелких счетных квадратов с помощью сетчатого окулярного микрометра, откалиброванного по стандартному объект-микрометру, имеющемуся в комплекте микроскопа. Зная размеры клеток, можно вычислить объем, условно считая форму организма близкой к форме простейшего геометрического тела (хлореллу и микроцистис – к шару, а сценедесмус – к цилиндру); при вычислении пользуются соответствующими геометрическими формулами. На основании полученных данных рассчитывают биомассу, выраженную в объемных или весовых единицах. Биомассу можно определить также прямым весовым методом на мембранных фильтрах. Для этого отфильтровывают небольшой объем (5–10 мл) суспензии водорослей на высушенный до постоянной массы мембранный фильтр, затем ее массу доводят до постоянной высушиванием в сушильном шкафу при температуре 105°С.

Расчет генераций. Зная общую численность клеток или биомассу, можно рассчитать интервал времени между двумя генерациями и константу скорости роста, характеризующие интенсивность деления клеток при действии токсикантов (замедление или ускорение темпа деления), по следующей формуле: $G = \lg 2\, t/(\lg N_t - \lg N)$, где G – время между генерациями в сутках или часах; t – интервал времени в сутках или часах; N – начальное количество клеток; N_t – количество клеток через интервал времени t. Можно ис-

пользовать также формулу $K = 1/t - (\lg V_t - \lg V_0)$, где К - константа скорости роста; t - время культивирования; V_t - биомасса в конце опыта; V_0 - биомасса в начале опыта.

Цитохимический метод идентификации клеток. Процентное соотношение живых, мертвых и отмирающих клеток также можно определять либо просмотром материала при скользящем боковом освещении, либо окраской различными красителями. Чаще всего используют красители метиленовый синий и нейтральный красный для сценедесмуса и хлореллы или трифенилтетразолийхлорид (ТТХ) и азур-эозин для синезеленых водорослей. Под микроскопом подсчитывают число клеток с различной окраской либо непосредственно в поле зрения микроскопа, либо в специальных камерах. Подсчет проводят в нескольких препаратах (не менее трех). Количество живых и мертвых клеток выражают в процентах по отношению к общей численности клеток или в объеме среды (при использовании счетной камеры).

Определение содержания фотосинтезирующих пигментов. Одним из показателей развития водорослей в культуре при действии токсикантов является содержание фотосинтезирующих пигментов -хлорофилла (a,в,c) и каротиноидов (каротина+квантофилла), определяемых спектрофотометрическим методом (Пырина, Елизарова,1971).

Для определения пигментов отфильтровывают 5-10 мл суспензии водорослей через мембранный фильтр № 5 (или № 2 - для мелких клеток), который перед фильтрацией покрывают слоем измельченного в порошок углекислого магния (или сернокислого бария)и стекла толщиной около 1 мм. Углекислый магний берут из расчета 10 мг на 1 $см^2$ поверхности фильтра, толченное стекло - примерно в таком же количестве. Оба компонента вносят в небольшой объем воды и взбалтывают. Эту суспензию переносят на фильтр, через который пробу фильтруют. Сразу же после фильтрации пробы порошок с осевшими водорослями отделяют от фильтра,слегка смачивают водой и растирают в ступке в течение 3 мин. Растертую массу переносят на стеклянный фильтр № 3 или № 4, воду отсасывают и к осадку тремя небольшими порциями(общим объемом не более 10-15 мл) добавляют 90%-ный ацетон (80%-ный ацетон для экстракции пигментов из микроцистиса). Полученный экстракт спектрофотометрируют.Клетки сценедесмуса плохо растираются, и экстракция ацетоном недостаточна.Тогда 5-10мл суспензии водорослей фильтруют через мембранный фильтр №5.Затем фильтр с кле-

тками водорослей помещают в градуированную пробирку и заливают 4-5мл 96°-ного этилового спирта, плотно закрывают пробкой и ставят в холодильник на I-3сут для экстракции пигментов. Полученный экстракт спектрофтометрируют для зеленых водорослей при длинах волн 663, 645 и 630 нм, что соответствует максимуму поглощения света хлорофиллами "а", "в" и "с", а также 430 нм и 750 нм, что соответствует максимуму поглощения каротиноидов. Последний максимум поглощения снимают для введения поправки на неспецифическое поглощение света экстрактом. На эту величину уменьшают экстинкции соответствующих пигментов. Спектрофотометрирование для микроцистиса проводят при длине волн 662 нм, что соответствует максимуму поглощения света хлорофиллом "а", и 440 нм, что соответствует максимуму поглощения каротиноидов. Количество хлорофиллов рассчитывают по формулам для двухлучевой спектрофотометрии пигментов. В плане унификаций расчетных формул лучше применять формулы, рекомендованные рабочей группой № I7 при ЮНЕСКО: хлорофилл "а" - C_a (мг/л) = $II,64(E_{663})-2,I6(E_{645})+0,I0(E_{630})$; хлорофилл "в" - $C_в$ (мг/л) = $-3,94(E_{663})+20,97(E_{645})-3,66(E_{530})$; хлорофилл "с" - C_c (мг/л) = $-5,53(E_{663})-I4,8I(E_{645})+54,22(E_{630})$. Использованные коэффициенты экстракции равны для хлорофилла "а" 89,3I л/(г.см) при 663 нм, для хлорофилла "в" - 52,I4 л/(г.см) при 645 нм и для хлорофилла "с"- I9,44 л/(г.см) при 630 нм. Расчет пигментов для микроцистиса проводят по Wettstein (I957): C_a(мг/л) = $9,784 \cdot E_{662}$(хлорофилл "а"); каротиноиды (каротин + ксантофилл) $C_к = 4,695\ E_{440} - 0,268\ C_a$.

Расчет содержания пигментов проводят по формулам и выражению либо в мг/л, либо в % к сухому веществу, либо пересчитывают на I млн.клеток.

5. ОПЫТЫ НА ЭЛОДЕЕ

Характеристика тест-объекта. Элодея (Elodea canadensis Rich) - представитель группы погруженных растений, вид, широко представленный в стоячих водоемах умеренной зоны Советского Союза. Элодея легко культивируется, быстро растет и вегетируется достаточно чувствительным объектом к действию токсикантов.

Условия лабораторного содержания. Для опыта растения необходимо брать из чистого водоема в начале июня, когда много молодых, наиболее жизнеспособных побегов. Отбирают молодые, зеленые, неповрежденные растения, отрывают верхнюю часть побега длиной 8-I0 см и помещают их в сосуд с водой , взятой из данного

водоема. Для опыта необходимо около 100 побегов, поэтому сосуд для транспортировки должен быть широким и глубоким во избежание повреждения растений.

Привезенные растения размещают в лаборатории в большие, широкие, но не глубокие емкости (10-15 л.) с речной водой, где они свободно плавают и проходят период акклиматизации при комнатной температуре в течение 7-10 сут. После этого периода у элодеи, как правило, образуются боковые отростки и корни, что, видимо, ослабляет рост основного побега, отбираемого в опыт. Воду меняют каждые 2-3 сут для удаления продуктов метаболизма.

Постановка опытов. Для подготовки и проведения опытов необходимо иметь лезвие, глазной пинцет, ученическую линейку, кристаллизаторы (объемом 1 л), набор пипеток, стеклянную палочку, термометр, люксметр, воронку диаметром 150 мм, газ № 68, фильтровальную бумагу.

Воду для опытов берут из чистого водоема или незагрязненных участков реки, расположенных выше города. Доставленную в лабораторию воду процеживают через воронку с планктонным ситом (газ № 68) во избежание попадания простейших, коловраток и других организмов и заливают в аквариум с постоянной продувкой воздуха. Воду для опыта можно использовать только через 4-5 сут после осаждения органического вещества.

Опыты желательно проводить в летний период, продолжительность их должна быть не менее 30 сут в трехкратной повторности (12-15 кристаллизаторов на 4-5 концентраций) при температуре 17-22°С. Смену опытных растворов проводят в зависимости от стабильности вещества (через 2-5 сут), одновременно меняют и воду в контроле. Температуру измеряют два раза в день, утром и вечером, затем вычисляют среднюю температуру дня.

В качестве острого опыта проводят 5-10-суточный опыт по выживаемости растений (при обычных условиях) для установления концентраций, при которых токсическое действие проявляется наиболее сильно. Для хронического опыта в качестве исходной концентрации токсиканта берут наименьшую концентрацию, при которой проявляется токсический эффект в 5-10-суточном опыте. В день постановки опыта из исходного раствора токсиканта делают 4-5 разведений в убывающем порядке. Раствор перемешивают стеклянной палочкой и разливают по 1 л в кристаллизаторы.

Когда испытуемые растворы готовы, подготавливают растения. У элодеи с неповрежденной точкой роста на линейке отрезают

лезвием верхнюю часть побега длиной 4 см и помещают в кристаллизаторы с речной водой. Подготавливают столько растений, сколько необходимо для опыта, из расчета по 5 экз. в каждый кристаллизатор. Подготовленную элодею помещают во все опытные (растворы исследуемого вещества в речной воде) и контрольные (речная вода) кристаллизаторы с I л жидкости.

Кристаллизаторы размещают у окон на дневном рассеянном свету с южной стороны при освещенности не менее I500 лк. Рядом ставят стакан с термометром для измерения температуры растворов.

При оценке токсичности вещества учитывают следующие биологические показатели: общее состояние растений (изменение окраски, повреждение и отмирание точек роста, потеря тургора), число растений (выживаемость), прирост основного побега в длину, число боковых отростков, длину боковых отростков, число корней, длину корней, суммарный прирост растений (прирост основного побега и боковых отростков). Учет и снятие показателей проводят на исходный день и затем через каждые пять дней в течение месяца.

Наблюдения за общим состоянием растений проводятся в течение всего опыта. Визуально отмечают, какие растения и при какой концентрации изменили цвет и приобрели бурый или коричневый оттенок, у каких произошло повреждение и отмирание точек роста. Например, при остром токсическом воздействии обычно наблюдают следующую картину: распад растений на отдельные мутовки и потерю тургора, что свидетельствует о гибели растений. При длительном токсическом воздействии растения могут частично изменить окраску: иногда цвет меняют только листья, а стебель и точка роста остаются зелеными, или зеленый цвет сохраняет только точка роста и т.д. Все изменения в состоянии растений записывают в рабочий журнал с указанием срока наблюдаемых изменений. Погибшие растения удаляют и оставляют жизнеспособные, за которыми ведут дальнейшее наблюдение. Число растений регистрируют на протяжении всего эксперимента.

Прирост основного побега элодеи учитывается на протяжении всего опыта. Растения осторожно пинцетом поочередно вынимают из раствора и кладут на линейку с фильтровальной бумагой для измерения его длины. Измерение проводят последовательно у каждого растения. Прирост растений вычисляют путем вычитания из длины растения исходных 4 см длины.

У элодеи в лабораторных условиях боковые отростки и корни появляются, как правило, на 10-20-е сутки опыта. С этого времени ведут их учет.

Боковые отростки у элодеи образуются сбоку от основного побега. Учитывают время их появления и количество. Длину боковых отростков измеряют так же, как и длину основного побега элодеи, с помощью линейки. Записывают индивидуальную длину каждого отростка. Корни у элодеи образуются на разных участках побега. Учитывают их количество и время появления. Длину каждого корня в отдельности измеряют с помощью линейки. Суммарный прирост элодеи вычисляют путем суммирования суточных приростов основного побега и боковых отростков.

Обработка данных. По окончании опыта экспериментальный материал сводится в рабочие таблицы (отдельно для каждого показателя), куда вносится весь цифровой материал, полученный в дни снятия показаний опыта. Прирост основного побега, число и длину боковых отростков и корней, суммарный прирост пересчитывают в расчете на одно растение и строят однотипные таблицы (табл.1).

Таблица 1

Прирост растений

Концентрация токсиканта, мг/л	Длительность опыта, сутки	Общее число растений, шт	Индивидуальный прирост растений, см	Общий прирост, см	Прирост в расчете на 1 растение, см
1	2	3	4	5	6

В таблицу суммарного прироста вносят две цифры: прирост основного побега и длину боковых отростков.

На основе рабочих таблиц строят графики отдельно по каждому показателю, используя абсолютные или относительные значения: на оси абсцисс откладывают время (сутки), на оси ординат - исследуемый биологический показатель. Эти данные отражают общую картину воздействия токсических веществ. По выживаемости растений устанавливают остролетальные (гибель в течение 5-10 сут) и хронические летальные концентрации (гибель на 15-е сутки и далее). Как показали эксперименты, наиболее чувствительными показателями у элодеи являются число и длина боковых отростков и корней. Неблагоприятным считается воздействие, при котором отмечаются значительные (более 25%) изменения биологических по-

казателей: выживаемости, прироста основного побега, числа и длины боковых отростков и корней, суммарного прироста растений. Максимальной недействующей (безвредной) концентрацией считается такая, которая не вызывает существенных (более 25%) отклонений от контроля биологических показателей в течение всего опыта. Эта концентрация принимается за допустимую.

В качестве экспресс-метода предлагается биологический метод, включающий оценку выживаемости растений в течение 5--10 сут по изменению их состояния (визуальные наблюдения) и снижению прироста основного побега (от 25% до его полного подавления). Этим методом можно установить только острелетальные и хронические концентрации.

6. ОПЫТЫ НА ПАРАМЕЦИЯХ

Характеристика тест-объекта и регистрируемых показателей. Для экологического прогнозирования возможных функциональных изменений водных сообществ при установлении рыбохозяйственных ПДК весьма актуально изучение экологии свободноживущих простейших, составляющих существенную часть микропланктона и микробентоса водных экосистем. Простейшие представляют важнейшее звено в пищевых цепях кормовых беспозвоночных и промысловых рыб, велико их значение также в процессах самоочищения и искусственной очистки сточных вод.

Выбор Paramecium caudatum в качестве тест-объекта был обусловлен следующими критериями. Благодаря сочетанию в парамеции признаков клетки и организма на ней можно изучить как клеточные, так и организменные формы реакции на токсическое воздействие. Возможность культивирования в широком диапазоне температур позволяет использовать их для экспериментальных работ в любое время года. Короткий жизненный цикл, быстрота размножения позволяют проследить реакцию на интоксикацию в относительно короткий срок в длинном ряду поколений. Используя принцип клонирования, можно получить большое количество генетически однородного материала.

Paramecium caudatum, Ehrenberg 1838 - свободноживущая широкораспространенная ресничная инфузория, предпочитающая альфамезосапробные условия. Температурный оптимум лежит в пределах 24-28°С, предпочитает pH, близкую к нейтральной (6,5-7,5).

Основными регистрируемыми показателями являются выживаемость и функция размножения, дополнительным – скорость фагоцитоза. Функция питания является быстрым и чувствительным тестом на ранних этапах распознавания загрязнителя в нелетальных растворах (особенно в первые минуты и часы контакта с реагентом), поэтому необходимо учитывать обратимость этого процесса в последующих поколениях.

Условия лабораторного содержания. Парамеций вылавливают из природных водоемов или берут чистые культуры из коллекций. Банкой на I л у самого берега зачерпывают воду с илом. В тот же день под бинокуляром просматривают пробы.

Обнаруженных парамеций последовательно переносят в микроаквариумы сначала со смесью среды пробы и культуры в соотношении 2:I, затем увеличивают содержание культуральной жидкости в микроаквариумах через каждый час и, наконец, помещают в чистый минеральный раствор. Для определения парамеций можно использовать "Определитель водных беспозвоночных..." (Мажейкайте, I977).

Парамеций культивируют на минеральной среде Лозина-Лозинского: в I л бидистиллированной воды растворяют 0,I г NaCl; 0,0I г KCl ; 0,0I г $CaCl_2$; 0,0I г $MgCl_2$ и 0,02 – $NaHCO_3$. Разливают в колбы на 25-50мл и автоклавируют в течение 30 мин при давлении I,5 атм. Пищей для инфузорий служит смесь чистых культур дрожжей Sacharamices ellipsodes и бактерий Bacillus subtilis , культивируемых по обычной методике на сусло-агаре и мясо-пептонном агаре (Полянский, I957).

Для приготовления питательной взвеси берут по одной петле дрожжей и бактерий на 25 мл среды. Через 2-3 сут стерильной пипеткой производят подкормку парамеций из расчета 5-7 капель взвеси на 5 мл культуры. Показателем хорошего состояния культуры является образование парамециями "кольца" ниже мениска пробирки.

Для экспериментов используют клональные культуры парамеций. Клон выводят следующим образом: одну особь освобождают от посторонней микрофлоры путем последовательной пересадки через несколько микроаквариумов со средой и оставляют для размножения. Когда количество разделившихся инфузорий становится достаточным (30-40), их пересаживают в пробирку со средой Лозина-Лозинского.

Полученную таким образом культуру с парамециями адаптируют к заданной температуре в течение 3-4 нед.: при температуре 24-25°С – в термостате, при I2-I3° и 4-5° – в холодильниках. Колебания температуры не должны превышать ±I°С.

Для поддержания стандартных условий культивирования пользуются культурой в стационарной фазе роста. Для этого пересадку инфузорий и смену среды необходимо производить при температуре 24°С один раз в неделю, при 12° и 4°С – один раз в две недели. При пересадке культуры 2-3 мл с большим количеством парамеций из верхней части пробирки переливают в новую пробирку, куда сразу добавляют свежую питательную взвесь (до 5 мл).

Оборудование: пробирки на 12 мл для ведения культур парамеций; пробирки на 15-20 мл для культивирования дрожжей и бактерий; микроаквариумы, изготовленные из стеклянных трубок (диаметр 2-3 см, высота 1-1,5 см); микроаквариумы из органического стекла на 15 или 30 лунок для индивидуального культивирования; колбы круглые или конические на 25-50 мл; пипетки с грушей (в средней части шарообразные) для введения культуры; микропипетки с резиновым наконечником из тонкой резины (от обычных пипеток) и оттянутым капилляром для всех манипуляций с парамециями (пипетки стерилизуются в кипящей дистиллированной воде в течение всей работы с инфузориями); пипетки на 0,1-2-5 мм; мензурки на 5, 10 и 25мл; бюксы на 5-50 мл для приготовления рабочих сред; часовые стекла диаметром от 3 до 5-7 см; чашки Коха; предметные стекла с углублениями; все наблюдения над парамециями проводятся под бинокуляром МБС-1 при различном увеличении объектива и окуляра 12,5х; микроскоп МБИ.

Чисто вымытую стеклянную посуду стерилизуют в сушильном шкафу.

Постановка опытов и учет показателей. В острых опытах для быстрого и ориентировочного определения (в течение 5-10 мин) летальных концентраций 1-2 капли густой культуры парамеций помещают в раствор заданной концентрации (капельный метод). Для установления пределов острой токсичности вещества или сточной воды ставят серию концентраций с коэффициентом прогрессии 0,1 или 0,5. Если берут множитель 0,1, смешивают 0,9 мл культуры и 0,1 мл раствора, концентрация которого в 10 раз выше заданной, на часовом стекле или в стеклянном микроаквариуме (можно брать другие соотношения в зависимости от густоты культуры). Если берут коэффициент 0,5, смешивают равные объемы культуральной среды и испытуемого раствора, увеличивая требуемую концентрацию вдвое.

Длительность острых опытов 5-6 ч. Каждая концентрация испытывается в 5 повторностях с общим количеством инфузорий не менее 100-150. Через равные промежутки времени, выбранные исследовате-

лем, под бинокуляром подсчитывают число погибших инфузорий. Затем высчитывают среднее время выживания и ошибку. Если за это время часть инфузорий выживает, эту концентрацию включают в серию хронических. В процессе острого отравления наблюдают за изменением движения, формы тела, пульсацией сократительной вакуоли. Показателем гибели инфузорий служит деформация тела, разрыв пелликулы, лизис клетки.

Хронические эксперименты проводят в среде для выращивания парамеций. Растворы токсикантов готовят в бюксах. Смену среды и пересадку инфузорий проводят ежедневно. Продолжительность хронических опытов 5 сут, в в случае необходимости - 10-15 сут в зависимости от температуры.

В качестве показателей токсического действия используют оценку выживаемости и функцию размножения. Изучают методом индивидуальных линий. Инфузорий из культуры рассаживают под бинокуляром по одной в лунки многолуночного микроаквариума, культуральную жидкость отсасывают фильтровальной бумагой, затем наливают по 0,1 мл испытуемой среды (более подробно см. в работе Э.Г.Голубкова, 1977). Для каждой концентрации и контроля берут 15-30 парамеций (15-30 повторностей или линий). Микроаквариумы помещают в увлажненные фильтровальной бумагой чашки Коха и содержат при соответствующей температуре.

Через каждые сутки определяют число выживших линий и подсчитывают число парамеций в каждой лунке. Один экземпляр переносят в свежую среду стерильной пипеткой под контролем бинокулярной лупы и получают линию потомства исходной особи. Остальных инфузорий испытывают на фагоцитоз.

Выживаемость фиксируют по числу выживших линий к исходному числу (в %). Функцию размножения определяют путем подсчета числа инфузорий за сутки с последующим усреднением данных. В тех случаях, когда инфузории погибают, их исключают из статистической обработки. Кроме того, учитывают скорость фагоцитоза по среднему числу пищеварительных вакуолей, образовавшихся у одной парамеции. Для этого 0,5-1 мл контрольного или опытного раствора с парамециями помещают на часовое стекло, куда добавляют одну каплю суспензии туши, приготовленной на среде Лозина-Лозинского. В тушевой взвеси инфузории находятся в течение 15 мин при соответствующей температуре, затем их фиксируют 4%-ным формалином. Число тушевых вакуолей подсчитывают под микроскопом у 15-30 инфузорий для каждой концентрации и контроля через определенные промежутки времени (15 мин., 1 ч, 3 ч, 6 ч, 24 ч и т.д.)

Полученные данные обрабатывают вариационно-статистическим методом. Вычисляют среднее значение признака и его ошибку. Достоверность различий средних значений признака у подопытных групп и контрольных определяют с помощью t - критерия Стьюдента.

Острыми летальными концентрациями можно назвать такие, в которых гибнут все особи в течение 5-6 ч. Летальные концентрации - это концентрации, вызывающие гибель всех или части организмов в течение 5 сут. Сублетальные концентрации - это концентрации, которые не вызывают гибели организмов, но снижают уровень клеточного деления и скорость фагоцитоза по сравнению с контролем. Допустимыми (безвредными) концентрациями можно назвать такие, в которых основные показатели находятся в пределах нормы. Описанный метод может быть рекомендован в качестве экспресс-метода для ориентировочного определения предельно-допустимых концентраций различных веществ.

7. ОПЫТЫ НА ДАФНИЯХ

Характеристика тест-объекта. Из представителей зоопланктона в токсикологических исследованиях чаще всего используют ветвистоусых рачков, а из этой группы - виды рода Daphnia . Они имеют ряд преимуществ, в том числе: легкость культивирования в лабораторных условиях, размножение в течение круглого года, высокая чувствительность ко многим токсикантам, широкая распространенность во многих водоемах и реках, короткий биологический цикл.

Из видов рода Daphnia в практике водной токсикологии наиболее часто используется D.magna. Этот вид можно считать таким же общепринятым тест-организмом в водной токсикологии, как дрозофила в генетике. Сведения по систематике, анатомии, физиологии и экологии дафний приведены в работах Бенинга (1941), Мануйлова (1964) и др.

Условия лабораторного содержания. Разводить и содержать дафний удобно в шкафу-термолюминостате. Оптимальный температурный режим $20\pm2^{\circ}C$ и продолжительность светового дня 12 ч. Дафний культивируют на воде, взятой из незагрязненных участков природных водоемов, или отстоенной, дехлорированной водопроводной воде. Для корма можно использовать протококковые зеленые

водоросли, пекарские или кормовые дрожжи, а также настой конского навоза. Водоросли вносят в концентрации 600-700 тыс.кл на I мл среды. Оптимальный режим для выращивания водорослей создается при культивировании на среде Тамийя, круглосуточном освещении лампами дневного света и продувании атмосферного воздуха. Численность клеток водорослей в культуре определяют либо в камере Горяева, либо по прозрачности по Снеллену.

Маточные культуры дафний содержат в цельностеклянных аквариумах с плотностью посадки 20-30 дафний на I л среды. Воду аквариумов обновляют наполовину один раз в 7-I0 сут. Для экспериментов выращивают синхронизированную культуру речков одним из способов:

I. В аквариум со свежей средой отсаживают 4-5 самок с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей приблизительно в одной стадии развития. После вымета молоди самок удаляют.

2. Молодь дафний отсифонивается из аквариума с помощью резиновой трубки, на конец которой, опускаемый в аквариум, прикрепляется небольшая резиновая груша с отрезанным дном. В отверстие вставляется маленькое "сито для чая" (модель с большим размером отверстий). При повторении процедуры на следующий день сифон отбирает только новорожденных дафний.

3. При известном навыке молодь одного возраста можно отлавливать прямо из маточной культуры. Удобно отбирать молодь с начавшими развиваться гонадами (темными). Этот прием удобен при необходимости срочной постановки опыта и при отсутствии синхронизированной культуры.

Необходимый для постановки опытов перечень оборудования и посуды включает микроскоп МБИ-I, бинокуляр МБО, pH-метр, камеру Горяева, микрокомпрессор, аквариумы для хранения речной воды (от 2 до 50 л), стаканы химические (на 0,I; 0,2; 0,5 л), колбы мерные (на 0,I-2 л), цилиндры мерные (на 0,5-2 л), колбы конические (на 0,2-0,5 л), кристаллизаторы (на 0,5-I,0 л), пипетки мерные (на 0,I-I0 мл), кюветы для выращивания водорослей, шелковый мельничный газ (планктонный), сачок для отлова дафний.

Постановка острых опытов. Общая длительность кратковременных опытов на дафниях составляет I0 сут. Первый (ориентировочный) острый опыт целесообразно проводить со стандартным набором концентраций, составляемых в геометрической прогрессии с коэффициентом I0 (обычно это I00; I0; I; 0,I; 0,0I и 0,00I мг/л изучаемого вещества и контроль). Длительность этого опыта может

быть 96-120 ч. Опыт выявляет только порядок остролетальных концентраций, его результаты можно оценивать "на глаз", без специальной статистической обработки. Этот предварительный эксперимент оказывается не нужным, если имеются литературные данные острых опытов, например значения $ЛК_{50}$ за 48,96 или 120 ч. На основании этих данных ставится основной острый опыт, для которого удобно использовать ряд концентраций в геометрической прогрессии с коэффициентом 2.

Если изучаемое вещество плохо растворимо в воде, разрешается использование растворителей или эмульгаторов (спиртов, ацетона и др.) с целью получения раствора или устойчивой эмульсии изучаемого вещества в воде. Однако при этом необходимо сначала получить данные об относительной токсичности самого растворителя или эмульгатора. В случае использования этанола мы рекомендуем его концентрацию не более 10,0 мг/л для острых опытов и 1,0 мг/л - для хронических. При анализе экспериментальных данных следует учитывать возможность проявления эффектов синергизма или антагонизма при определенных сочетаниях изучаемого вещества и растворителя.

При использовании растворителя или эмульгатора следует ставить второй контроль, добавляя только растворитель или эмульгатор. Во всех вариантах опытной серии должны быть добавлены одинаковые количества растворителя или эмульгатора.

При составлении ряда концентраций с коэффициентом прогрессии 2 удобно использовать следующий прием: запасной стакан размечают на полный объем и на половину объема и в нем готовят раствор с концентрацией вещества в 2 раза больше наиболее высокой концентрации в эксперименте. После тщательного перемешивания половину раствора отливают в другой стакан, а в запасной доливают воду до полного объема. После тщательного перемешивания половину раствора снова отливают в следующий стакан и так продолжают до получения минимальной концентрации. Затем во все опытные стаканы и контроль вносят корм для дафний и доливают воду до полного объема. Этот прием при условии отсутствия искажений за счет всплытия или оседания изучаемого вещества обеспечивает большую точность получения концентрации, чем отмеривание десятых и сотых долей миллилитра раствора вещества при помощи градуированной пипетки.

Опыты ставят не менее, чем в трех повторностях (при этом совпадение всех концентраций не обязательно; набор концентраций следующего опыта может быть подкорректирован в зависимости от результатов предыдущего опыта). Число повторностей обусловлено по-

лучаемой статистической ошибкой результата. Для острых опытов на дафниях можно использовать любую посуду типа химических стаканов с объемом в каждой концентрации по 200 мл. В опытные стаканы и контроль помещают по одинаковому числу (10 экз.) 3 - 5-суточных дафний. В эксперименте в качестве корма целесообразно давать протококковые водоросли (хлорелла или сценедесмус). При обычной плотности культуры водорослей (прозрачность по Снеллену 3 - -3,5 см) для Daphnia magna можно вносить по 1,0 мл при смене растворов, для D.longispina - по 0,5 мл. Температура в опыте учитывается ежедневно.

Частота замены растворов определяется свойством вещества (но не реже двух раз в неделю); для веществ с быстро уменьшающейся токсичностью рекомендуется ежедневная замена растворов.

При помещении рачков в экспериментальные концентрации следует строго соблюдать принцип рандомизации. В случае последовательного отлавливания рачков для концентраций № 1, № 2 и так далее, в первые концентрации попадают более крупные дафнии, что сказывается на результатах опытов, но эти искажения не могут быть отсеяны при статистической обработке результатов. В связи с этим лучше сначала во все концентрации поместить по одной дафнии, затем внести вторую и так далее. При каждой последующей подсадке дафний их вносят в обратном порядке, чем в предыдущей.

В кратковременных опытах основным показателем токсичности среды является выживаемость рачков. За выживаемостью дафний наблюдают непрерывно в течение первого часа воздействия вещества, через каждые 15 мин в продолжении второго часа, затем ежечасно до конца первого дня наблюдений, а в последующие сутки - по 2- -3 раза в день.

В качестве показателя гибели рачков используется неподвижность (иммобилизация): дафнии лежат на дне стакана, либо висят у поверхности воды, плавательные движения антенн отсутствуют и не возобновляются при воздействии струей воды или при покачивании стакана.Но у дафний еще может сохраняться сокращение сердца,дрожание глаза, слабое, конвульсивное подергивание антенн,торакальных ног, постабдомена. Обычно довольно долго сохраняется перистальтика кишечника даже у разлагающихся рачков.

Иммобилизованных рачков целесообразно просматривать под бинокуляром для выявления симптомов гибели и определения типа действия вещества. Данные о времени гибели организмов при разных концентрациях вещества заносят в таблицу протокола опыта.

В качестве дополнительных показателей в остром опыте необходимо учитывать: изменение окраски тела, кишечника, жирового тела, состояние гонад; степень наполнения кишечника пищей, а также поведенческие реакции (см.соответствующие таблицы).Особенно важно отмечать случаи тетанического сокращения мышц туловища, выдавливание из выводковой камеры яиц и зародышей и судорожное опорожнение кишечника. Показатели оценивают по балльной системе, предложенной Л.А.Лесниковым. Изменения этих показателей нередко предшествуют гибели дафний, что позволяет использовать их для ранней диагностики.

Если гибель дафний в контроле превышает 5% (I экз на две повторности по IO рачков), в результаты опыта вносится "поправка Аббота". При гибели, превышающей 25%, опыт бракуется и повторяется.

На основании результатов острых опытов обычными приемами определяют: $ЛК_{50}$ (концентрацию, в которой погибает за заданный срок 50% особей), $ЛК_{I6}$ и $ЛК_{84}$, $ЛК_{95}$ и $ЛК_{05}$. Для расчетов можно применять любые приемы (Беленький, I963 и др.). На основании $ЛК_{50}$ за ряд сроков опыта строится график зависимости $ЛК_{50}$ от продолжительности опыта. Определяется перегиб кривой как граница острой гибели и концентрация, соответствующая ассимптоте, к которой стремится соответствующая ветвь кривой. Эта концентрация обозначается как "порог медианных летальных концентраций".

Вторым приемом является определение для каждой концентрации медианного времени выживания ($ЛТ_{50}$), а также $ЛТ_{I6}$, $ЛТ_{84}$ (эти величины, как и в первом случае, нужны для упрощенного определения статистической точности $ЛТ_{50}$, $ЛТ_{95}$ и $ЛТ_{05}$.

Достоверность ЛК и ЛТ может быть определена путем следующих расчетов: среднее квадратичное отклонение из уравнения $\sigma = (ЛК_{84} - ЛК_{I6})/2$; средняя статистическая ошибка $S = \sigma/n$, где n – число повторностей.

Строят график зависимости $ЛТ_{50}$ от концентрации вещества. По перегибу кривой устанавливается граница между остролетальными и хроническими летальными концентрациями, а также "асимптота Строганова" – концентрация, к которой стремится в бесконечности соответствующая ветвь кривой.

На основании $ЛТ_{50}$ может быть подразделена степень токсичности концентраций веществ (табл. 2).

Остальные приемы анализа результатов острых опытов на дафниях те же, что и для других тест-организмов.

Таблица 2

Подразделение степени токсичности концентраций загрязняющих веществ на основании $ЛТ_{50}$

Количественная оценка, баллы	Продолжительность жизни 50% дафний, сут	Токсичность концентрации
I	До 20	Слабая
2	До IO	Средняя
3	До 5	Сильная
4	Менее 2	Очень сильная

Постановка хронических опытов на серии генераций. Проведение исследований по этой схеме предпочтительно, когда есть основания полагать, что отрицательное действие вещества может накапливаться в серии генераций. Для хронических опытов этого типа подбирают 4–5 концентраций от $ЛК_{50}$ за I20 ч. Опыты ставят в трехкратной повторности, для каждой концентрации готовят 500 мл исследуемой жидкости. В каждую концентрацию помещают по IO дафний в возрасте 3-5 сут. Общие условия проведения хронических опытов (смена раствора и др.) аналогичны описанным выше для острых опытов. Удобно применение "сита для просмотра дафний".

Количество народившейся молоди определяют следующим образом. Из стаканов пипеткой осторожно берут взрослых самок и переносят в отдельный стакан. Раствор с молодью выливают на обтянутую планктонным газом (№ 55) воронку, поставленную в большой стакан или банку, затем на воронке подсчитывают молодых дафний. В опорожненный стакан наливают свежий раствор или прежний в зависимости от длительности его стояния, в него переносят взрослых самок, ранее отсаженных в отдельный стакан. Молодь, находящуюся на сетке воронки, переносят в чашку Петри с небольшим количеством воды путем легкого прикосновения сетки с водой. Под бинокуляром проверяют наличие уродливых рачков.

Из первого или второго помета молоди, появившейся у особей исходной генерации в опытных и контрольных растворах, по IO экз. отсаживают в новые стаканы с 500 мл среды такой же концентрации и проводят те же наблюдения, что и за родительскими особями. Продолжительность опытов с каждым поколением – 30 сут при температуре 20°С. За это время токсикант оказывает действие на все периоды жизни дафний, которые обычно встречаются в природных условиях за

время экологической длительности жизни дафний (обычно при температуре 20°С от 25 до 28 сут).

Общая длительность опыта с исходной генерацией и тремя последовательными генерациями молоди составляет около 45 сут при температуре 20°С.

Схема опыта из серии генераций дафний

Поколение (генерация)	Размножение (помет)	Сумма молоди
Исходное	$D^0_{исх} \rightarrow D^1_{исх} \rightarrow D^2_{исх} \rightarrow D^3_{исх}$	$\Sigma D_{исх}$
Первое	$D^0_1 \rightarrow D^1_1 \rightarrow D^2_1 \rightarrow D^3_1$	ΣD_1
Второе	$D^0_2 \rightarrow D^1_2 \rightarrow D^2_2 \rightarrow D^3_2$	ΣD_2
Третье	$D^0_3 \rightarrow D^1_3 \rightarrow D^2_3 \rightarrow D^3_3$	ΣD_3

Примечание. D – дафнии, верхний индекс обозначает пометы каждого поколения (генерации), а нижний – индексы генерации.

В хроническом опыте основными показателями токсического действия являются выживаемость, общая плодовитость и качество потомства. Качество потомства в сравнении с контролем и исходными (родительскими) особями оценивается по выживаемости, скорости созревания, темпу размножения, потенциальной и реальной плодовитости, размерам. Особо отмечаются случаи неправильного развития (уродства).

Показатели жизнедеятельности дафний в хронических опытах ежедневно регистрируются и записываются в журнале. При определенном навыке исследований можно различать возраст молоди, а ее подсчет проводить в дни замены растворов, 2 раза в неделю. Погибших рачков, а иногда и сброшенные раковины (экзувии) собирают со дна стаканов (пипеткой) и подсчитывают, погибших рачков просматривают для определения симптомов гибели и удаляют.

Полученные результаты обрабатывают обычными методами вариационной статистики.

При анализе действия ряда соединений различной химической природы были установлены пределы допустимых отклонений отдельных показателей у дафний, составившие 30–25% по выживаемости и плодовитости и 7–10% по размерам и числу линек при $P \leq 0{,}05$. От-

клонения в указанных пределах не приводили в дальнейшем к ухудшению качества и сокращению количества потомства. Таким образом, эти величины можно принять за предельные при оценке токсичности загрязнителей.

Постановка хронических опытов на популяциях. Проведение опытов по этой схеме предпочтительно тогда, когда возможно отрицательное действие вещества на бисексуальный тип размножений, связанный с образованием самцов и латентных яиц. Кроме того, данный прием обеспечивает прямую оценку влияния вещества на продуктивные свойства дафний.

Опыты по этой схеме проводятся в химических стаканах или аквариумах с объемом среды I л. Остальные приемы сходны с описанными в предыдущей методике. Выметанную молодь после подсчета не удаляют (как в случае постановки опыта на серии генераций), а возвращают в экспериментальный стакан.

В стаканы вносится одинаковое количество одновозрастных рачков (по 8, 9 или I0). При подсчете рачков удобно использовать описанное ранее сито. Подсчет удобно производить по трем возрастным группам дафний: молодь до начала созревания гонад (м-I), молодь с гонадами, начавшими созревать (м-2), и взрослые. Поскольку переход от м-I и м-2 регистрируется не четко, удобно использовать вторичный половой признак - у м-I первый абдоминальный отросток не развит или маленький, перпендикулярный спине абдомена, у м-2 он начинает загибаться вперед. Полный анализ с использованием шкал можно проводить не на всех рачках, а отобрать по I5 экз. м-I, м-2 и взрослых, а остальных подсчитывать только для учета соотношения их численности. Затем дафний взвешивают. Для этого следует сделать сито из планктонного газа и капроновой жилки (0,4-0,6мм), используя в качестве шаблона дно химической пробирки соответствующей кривизны и спаивая все части с помощью нагретого железного предмета, например пинцета с тонкими кончиками и т.п. Для взвешивания рачков из стакана для просмотра пипеткой переносят на сито. В сито для просмотра, помещенное в чашку Петри (где и удобно проводить просмотр), наливают немного воды из стакана, в котором они находились. Сито для взвешивания обсушивают на фильтровальной бумаге. Взвешивание производится на торзионных или аналогичных им других весах, после чего дафний немедленно переносят в новую экспериментальную среду. Взвешивают всех дафний из данной концентрации с точностью $\pm$I,5 мг, поэтому вес более I0 рачков достаточно репрезентативен.

Опыт длится до начала снижения биомассы после достижения ее максимальной величины в контроле и при низких концентрациях токсиканта (подострый опыт) или до второго или третьего пика биомасс (хронический опыт). Данная схема удобна для получения данных по влиянию вещества на продуктивные свойства дафний и процессы смены дафниями типа размножения. В отдельных случаях выявлено, что при бисексуальном размножении дафний латентные яйца оказываются дефектными или вообще не развиваются. Дафния откладывает пустой эфиппиум.

При каждом просмотре регистрируются (2 раза в неделю в момент замены растворов): численность молоди м-I и м-2 (отдельно самок и самцов), взрослых самцов, самок с партеногенетическими яйцами, "яловых" самок (явно половозрелых, но с пустовыводной камерой, если гонады не набиты партеногенетическими яйцами), самок с эфиппиумами. Кроме того, учитываются случаи уродливого развития яиц в выводковой камере, сброшенные недоразвитые яйца и зародыши, сброшенные эффиппиумы (если в них нет латентных яиц) и суммарный вес живых дафний.

Один-два раза в течение эксперимента, лучше всего на I0-I5-е сутки (фаза логарифмического роста) и при достижении биомассы насыщения (на 25-28-е сутки) целесообразно в качестве дополнительных показателей провести "полный биологический анализ" дафний с регистрацией по приведенной ранее схеме записей по I5 особей м-I, м-2 и взрослых.

Как правило, наиболее чувствительным показателем является биомасса дафний в момент достижения максимальных значений в контроле и при минимальных концентрациях вещества. Если обнаруживаются нарушения в развитии партеногенетических или латентных яиц, ПДК должна устанавливаться по этому показателю.

Ниже приведены некоторые формы записи и интерпретации результатов опытов с дафниями (табл.3-I2).

Таблица 3

Шкала для оценки степени наполнения кишечника дафний

Содержимое кишечника	Балл
Отсутствует	к1
Заполняет меньше половины кишечника, часто не прилегает к его стенкам	к2
Заполняет от I/2 до 3/4 кишечника, рыхло	к3

Продолжение табл. 3

Содержимое кишечника	Балл
Заполняет больше 3/4 кишечника, но местами отстает от стенок или прозрачно в средней части кишки	к4
Заполняет весь кишечник; если просвечивает, то только в его передней части	к5
Заполняет весь кишечник, но прозрачным еле видным содержимым	к2а
Заполняет весь кишечник, окрашено, но сильно просвечивает	к3а

Примечание. Баллы к2а и к3а свидетельствуют о нарушении пищеварения, к1 и к2 – о голодании дафний, к3 – о плохом питании.

Таблица 4

Сокращенная запись окраски содержимого кишечника

Окраска содержимого	Обозначение	Окраска содержимого	Обозначение
Оливковая	О	Коричневая	К
Зеленая	З	Серая	С
Охристая ("песчаная")	Ох	Черная	Ч

Примечание. Заполненность кишечника и окраску его содержимого удобно учитывать отдельно для передней (до перегиба при переходе из головного отдела в абдомен) и задней части.

Об упитанности дафний и накоплении гемоглобина при снижении в воде содержания растворенного кислорода можно судить по цвету тела и количеству капель жира (см.табл.5 и 6). Иногда у дафний появляется зеленовато-голубоватая окраска, особенно яиц и зародышей в выводковой сумке, расположенной между створками раковины на спинной стороне и абдоменом рачка. Обычно этот цвет приписывается каротиноидам, накапливаемым в заметных количествах.

Таблица 5

Шкала градаций окраски тела дафний

Характеристика окраски тела дафний	Оценочный балл
Бесцветное, "стеклянное"	I

Характеристика окраски тела дафний	Оценочный балл
Желтоватое (полостная жидкость не видна, но ощущается плазма клеток)	2
Плазма клеток и кровь (полостная жидкость) имеют диффузно-розовое окрашивание:	
– бледное	3
– умеренное	4
– яркое	5
Мутно-желтое	2м
Мутно-розовое	3м–5м

Примечание. Балл I м не приводится, так как он плохо выявляется визуально. Мутность (в первую очередь дыхательных отростков ног и туловища) обычно свидетельствует о коагуляции плазмы клеток.

Таблица 6

Шкала для учета и записи количества и окраски капель жира

Количество капель жира	Балл	Яркость капель жира	Балл
Отсутствуют	0	Не отличаются от цвета тела	0
Мало, мелкие	I	Несколько ярче тела	I
Много, крупные	2	Значительно ярче	2

Таблица 7

Шкала развития партеногенетических и латентных яиц в гонадах дафний

Состояние гонады и проходящие в ней процессы	Оценочный балл
Развитие партеногенетических яиц	
В зоне роста визуально не обнаруживается очередная партия яиц. Иногда здесь слабо видны прозрачные клетки эпителия зоны роста, но они расположены беспорядочно	I
В зоне роста расположены тетрады прозрачных яйцеклеток, содержащие капли жира (малый трофоплазматический рост)	2

Состояние гонады и проходящие в ней процессы	Оценочный балл
Яйцеклетки становятся дымчатыми, промежутки между ними просвечивают (большой рост, накопление желтка)	3
Яйцеклетки темные, малопрозрачные в проходящем свете, промежутки между ними не видны (накопление желтка закончено, яйца готовы к поступлению в выводную камеру)	4
Развитие латентных яиц	
На границе зоны роста и зачатковой зоны гонады (над пятой парой брюшных ножек лежит группа клеток с более резкими границами, последняя тетрада преобразуется в латентную яйцеклетку с первичными питающими клетками)	I л
В группе клеток с более темными оболочками снизу прилегает темная треугольная полоска латентной яйцеклетки (начало накопления желтка)	2 л
Первичные питающие клетки дымчатые, под ними темная треугольная полоска латентной яйцеклетки (идет накопление желтка)	3 л
Латентное яйцо сформировано, часто с небольшой перетяжкой посередине. Питающих клеток не видно	4 л
Патология	
Края яйцеклетки мутные, частицы желтка в клетках эпителия зоны роста. Идет резорбция яиц. Обычно заметно на стадиях 3 и 3 м	р

Таблица 8

Шкала развития партеногенетических яиц в выводковой камере и эфиппиума. Норма и патология

Показатель состояния и происходящие процессы	Оценочный балл
Выводная камера пустая: а) у впервые созревающих самок	0
б) у повторно созревающих	04
Развитие партеногенетических яиц (норма)	
Яйца темные непрозрачные, в начале стадии вытянутые, в конце ее округлые. Окончание образования направительных телец, слияние ядра одного из них с ядром яйцеклетки, образование первой яйцевой оболочки	I
Яйца становятся крупнее с более светлым перифе-	

Показатель состояния и происходящие процессы	Оценочный балл
рическим слоем и гранулящией в середине яйца. Дробление, гаструляция	2
Стадия несформированного эмбриона. Начало становления зачатков (выступов) плавательных антенн, конец ее, сформирование парного глаза	3
Стадия сформированного эмбриона. Начало стадии – – слияние парного глаза и появление в нем черного пигмента, конец ее – полное сформирование молодой дафнии, которая начинает двигаться, сердце ее пульсирует. Каудальная игла иногда подогнута в момент вымета, иногда выпрямлена	4
Нарушение партеногенетического развития	
Яйца мутные, непрозрачные, часто набухшие. Их гибель и дегенерация	д
Яйца теряют форму, разлагаются и в виде пенистой массы вытекают через заднюю щель выводковой камеры самки	S
Яйца развиваются, но не происходит яйцевой линьки (во время развития эмбрионов в норме наблюдается одна яйцевая и две эмбриональные линьки), поэтому зародыш развивается уродливо "в яйце". При сформированном глазе и уже пульсирующем сердце не видно никаких выступающих органов	MS

Таблица 9

Выживаемость дафний в растворах

Дата	Час	Количество часов опыта	Контроль повторности I-я, 2-я, 3-ья №№ стаканов			При X (концентрация) повторности I-я, 2-я, 3-ья и т.д. №№ стаканов		
			I	2	3	3	4	5

Таблица IO

Изменение биологических показателей у дафний
под влиянием вещества

Дата	Длительность, дни	Контроль: исходное поколение, I-е, 2-е, и т.д. — повторность, № стаканов						При X (концентрация, мг/л): исходное поколение, I-е, 2-е и т.д. — повторность, № стаканов					
		количество дафний	шкурки	молодь	абортивные яйца	мертвые	эфиппии	количество дафний	шкурки	молодь	абортивные яйца	мертвые	эфиппии
	I												
	30												
ИТОГО:													

Таблица II

Изменение биологических показателей у дафний
под влиянием веществ

Показатели	Исходные особи		I-е поколение	
	контроль	концентрация, мг/л	контроль	концентрация, мг/л
Выживаемость				
Наступление половой зрелости (дни)				
Первый помет (дни)				
Реальная плодовитость				
Абортивные яйца				
Мертворожденные				
Уродливая молодь				
Эфиппии				
Число шкурок				
Длина, мм				
Ширина, мм				

Таблица I2

Схема журнала записей для популяционных экспериментов

Дата		°С в опыте		Номер стакана (или аквариума)				Примечание
кален.	сутки	утро	вечер	I-й		2-й		
				концентрация изучаемого вещества				
				мI –				Обычный анализ
				м2 –				
				♀♀ся –				
				♀♀ялов –				
				♀♀с эф.–				
				Вес –				

мI	м2	взрослые	мI	м2	взрослые	
32♀1+1к4$\frac{0}{к}$	65$\frac{3}{1}$+1к4$\frac{0}{к}$	143$\frac{2}{2\frac{1}{3}}$1+1к5$\frac{0}{к}$				Полный биологический анализ
Вес –			Вес –			Здесь отмечается общее число особей каждой группы, не попавших на полный анализ

8. ОПЫТЫ НА ХИРОНОМИДАХ

Характеристика тест-объекта. Из пресноводных бентосных организмов инфауны (зарывающихся в грунт) для проведения токсикологических опытов используется Chironomus dorsalis Meig. Этот вид относится к широко распространенному семейству хирономид. Личинки темно-красного цвета обитают в иле стоячих водоемов, где строят в грунте трубчатые домики. Окукливание наступает чаще всего на 12--13-е сутки. Перед окукливанием личинки перестают питаться, теряют активность. Стадия куколки длится 2-3 сут. В конце этой стадии куколки из олигофотных становятся полифотными, покидают грунт и всплывают к поверхности воды, где происходит вылупление комаров из кукольной шкурки через ее разрыв на дорзальной стороне груди. Общая продолжительность жизни комаров 3-5 сут. В течение этого времени ни самцы, ни самки не питаются. После выклева из яиц личинки покидают кладку и плавают в воде, через несколько дней они оседают на грунт, переходя к донному образу жизни. Их дальнейшие рост и развитие определяются в основном условиями питания, дыхания, качеством грунта, температурным режимом, плотностью популяции и некоторыми другими факторами.

Условия лабораторного содержания. Хирономиды легко поддаются культивированию в искусственных условиях (Константинов, 1958) и имеют личинок с высокими рыбоводными качествами.

При содержании мотыля в искусственных условиях создание и поддержание маточного роя комаров нужной численности осуществляется по той же методике, что и выращивание личинок. Разница состоит лишь в том, что личинок не отбирают на опыт, а дают им возможность закончить метаморфоз.

Устройство для выведения хирономид (хирономидник) представляет собой деревянный каркас, обтянутый марлей. Комната, где расположен хирономидник, должна быть достаточно светлой, высота хирономидника должна быть не менее 2,5-3 м. Поскольку комары не питаются, содержание маточного роя сводится к контролю над водным режимом в кюветах, кормлением растущих личинок и чистотой воздуха (недопустимо наличие дыма, запаха нефтепродуктов, красок и т.п.). Яйца, откладываемые комарами, собирают: 20-30% их идет на воспроизводство маточного роя, остальная часть используется в качестве посадочного материала для токсикологических опытов. Яйцекладки можно вносить сразу на поверхность ила, однако лучшие результаты получают, используя их предварительное выдерживание в

чистой воде до массового выклева личинок. Для постановки опытов выклюнувшуюся молодь выращивают в выростных кюветах до размеров 3–4 мм. В качестве корма используют сухие белковые дрожжи.

Для культивирования удобнее использовать фотографические кюветы высотой 2,5–3 см со сторонами размером I3xI6 см и приблизительным их соотношением 3:4. Кюветы размещают в несколько ярусов на деревянном или металлическом стеллаже в хирономидарнике. Просвет между стенками кювет, расположенных на стеллаже по вертикали одна над другой, составляет I0–I5 см, число ярусов – 7–I5 в зависимости от высоты хирономидарника.

Наиболее целесообразно выращивание личинок на "тонком" речном иле, накапливающемся на участках с затишным течением. Желательно, чтобы слой ила был толщиной I2–I5 мм. Хороший результат дает уменьшение водного слоя вплоть до полного исчезновения, лучше выращивать личинок во влажном грунте, периодически обрызгиваемом водой во избежание подсыхания. При поддержании комнатной температуры культивирование мотыля может идти круглогодично.

Личинки выращивают в кюветах, заполненных наполовину смесью ила с водой до получения сметанообразной массы. Качество прудового или речного ила может быть улучшено его прогреванием до температуры 50–60°С, обусловливающим уничтожение живых организмов, которые могут оказаться хищными по отношению к разводимым личинкам (личинки жуков, стрекоз, хирономид и др.). После отстаивания (4–5 ч) грунтовой массы, налитой в кюветы, вносят кладки, предварительно выдержанные в чистой воде до выхода первых личинок из слизи. На I м^2 поверхности вносится примерно I00–I50 кладок. Яйцекладки нужно распределять равномерно во избежание их заглубления в грунт. При температуре I8 – 20°С сухие белковые дрожжи в виде порошка двукратно распыляют по поверхности грунта из расчета 30–40 г/м^2. При температуре выше I8–20°С единовременное внесение большого количества корма может привести к интенсивному развитию гнилостных процессов с выделением метана и сероводорода. В связи с этим лучше вносить корм каждые 3–4 сут, причем вносимую порцию необходимо увеличивать соответственно росту личинок. Последнюю порцию корма вносят за 2–3 сут до отбора личинок.

Для получения яиц в маточном помещении устанавливают стеклянные кюветы или кристаллизаторы высотой 5–I0 см и площадью 400–I600 см^2 и наливают в них чистую воду слоем толщиной 2–3 см. Ежедневно (лучше в середине дня, чтобы не мешать роению) выбира-

ют яйцекладки пинцетом выше уреза воды, где они прикрепляются. Затем кристаллизаторы ополаскивают для удаления обрывков кладок и заполняют чистой водой. Один-два раза в месяц кюветы и кристаллизаторы рекомендуется протирать спиртом.

Постановка опытов. Эксперименты на хирономидах можно проводить в трех вариантах: в чашках Петри или Кохэ с регулярной заменой среды, в циркуляционных или проточных установках (Бугаева, Пузикова, 1974).

В опытах с осуществлением проточности установка представляет собой два расположенных один над другим сосуда, между которыми находятся чашки Петри с подопытными организмами (10 экз.в чашке). Соответствующие концентрации токсического вещества, введенные в верхний сосуд, по каплям проходят через чашки, стекая в нижний сосуд. Таким образом обеспечиваются проточность и аэрация.

Выбор концентраций определяется токсичностью того или иного вещества. Опытные растворы готовят на дехлорированной воде и меняют раз в двое суток. Нестойкие токсические вещества необходимо менять каждый день. Объем 2 л в проточной установке обеспечивает подачу опытной жидкости в течение 10-12 ч, после чего ее снова переливают в верхние сосуды. Температуру измеряют три раза в день.

Растертые в порошок и просеянные через сито №27 белковые дрожжи замачивают водой до получения густой массы, затем вносят в опытную чашку стеклянной палочкой. Масса, опущенная на конце стеклянной палочки, располагается под водой в опытной чашке в форме кружков диаметром 6-8 мм. Десяти маленьким личинкам в начале опыта хватает 3-4 кружков. По мере роста личинок количество корма, вносимого в опытные чашки, увеличивают.

С начала окукливания кормление сводится к минимуму, а к моменту вылета имаго совсем прекращается. Дрожжи используются хирономидами и как строительный материал для домиков. Разведенные дрожжи на протяжении всего опыта хранят в холодном месте.

Острые опыты проводят без добавления грунта в течение 10-15 сут. Длительность хронических опытов от III стадии личинки (длиной 3-4 мм) до вылета имаго около 30 сут .

Вначале отбирают одну из кладок хирономид (в ней до 200 яиц) в кристаллизатор с водой. После вылупления личинок их подращивают на иле до определенного размера (3-4 мм) и затем сифоном со стеклянной трубочкой осторожно отбирают по 10 экз.на опытную чашку; в течение 2 сут они обживают опытные площади (чашки), строят

домики из дрожжей, вносимых заранее. Слабых особей заменяют новыми из той же одновозрастной популяции. К концу вторых суток личинки подрастают до 3-й стадии (4-5 мм). Перед опытом воду из опытной чашки отсасывают сифоном вместе с остатками корма и заменяют раствором определенной концентрации. Повторность опытов не менее трех. Опытную жидкость следует менять по возможности быстро, чтобы куколки и личинки не обсыхали. После очистки опытную чашку наполняют на 2/3 жидкостью и только затем вносят корм.

Регистрируемые показатели. При проведении токсикологических опытов регистрируются следующие показатели: основные - выживаемость личинок, сроки их окукливания, сроки и процент вылетевших комаров, процент уродливых особей; дополнительные - внешний вид, окраска личинок, их поведенческие реакции, вес, вид и активность имаго.

Среди погибших имаго встречаются насекомые, которые не смогли высвободиться из экзувия или при выходе из него повредили конечности или крылья. Часто встречаются имаго с уродствами, обусловленными действием токсических веществ, в частности кровоизлиянием в области брюшка, крыльев или общим кровоизлиянием. Такие экземпляры с трудом высвобождаются из экзувия. При выходе они еще больше раздуваются, происходит выпячивание отдельных участков тела между хитиновыми пластинками, в области брюшка с последующим их разрывом. У некоторых особей под действием токсических веществ кишечник выпадает наружу. Вес личинок регистрируется на 7-е и 10-е сутки опыта.

Наблюдения за организмами ведутся ежедневно. Дрожжевые домики вскоре становятся непроницаемыми, и наблюдения ведутся в основном за пораженными особями, которые обычно остаются в домиках. Особое внимание обращают на характер домиков, поведение животных, окраску тела, стадию, готовность к линьке и окукливанию, наполнение кишечника. Погибших особей измеряют и рассматривают под бинокуляром. Размеры живых зрелых куколок и имаго в опыте и контроле можно оценивать визуально. Здоровые особи, как правило, не покидают домиков даже на небольшой срок. Сравнивают линейные размеры погибших особей с их первоначальной длиной и имеющимися в литературе нормативами роста для хирономид (Константинов, 1958).

Для оценки острого летального действия можно использовать два способа: определение медианных летальных концентраций (убивающих за заданный срок 50% особей, взятых в опыт) и определение

медианного летального времени для ряда концентраций и по форме кривой - границы между остролетальными и хронически летальными концентрациями.

При определении медианного времени выживания $ЛТ_{50}$ регистрируется время иммобилизации каждой особи в исследуемых растворах. Время наблюдений - от нескольких часов до суток и более (до конца острого опыта). Затем проводится графическое определение медианного времени выживания, когда на одну из осей наносится время, на другую - показатель выживаемости. На одном графике можно определить $ЛТ_{50}$ для нескольких концентраций. Затем строится график зависимости значений $ЛТ_{50}$ от концентрации изучаемого вещества. Для концентраций, у которых $ЛТ_{50}$ не устанавливается в течение острого опыта, выживаемость дается в процентах.

Исходя из результатов острых опытов и установив границы перехода от остролетальных к хронически летальным концентрациям, проводят хронические опыты. В течение длительных опытов учитывают и основные, и дополнительные показатели, указанные выше. Выживаемость всех стадий выражают в процентах с поправкой по Абботу. Личинок взвешивают на торзионных весах на 7-е и 10-е сутки опыта. Удельный прирост биомассы определяют по формуле

$$P = \left[\left(P_{кон.} - P_{нач.}\right) / P_{нач.}\right] \cdot 100,$$

где $P_{нач.}$ и $P_{кон.}$ - вес в начале и конце опыта соответственно.

После взвешивания личинок в опыте не используют из- за травмирования, а эксперименты продолжаются с особями двух других линий той же популяции.

Регистрируют сроки вылета насекомых (в сутках) и проводят математическую обработку этого показателя: вычисляют среднюю арифметическую суток вылета в контроле и опыте с учетом ошибки средней арифметической ($M \pm m$). Оценивают достоверные различия в опытных и контрольных данных. Вычисленный критерий достоверности разности сравнивают с табличным критерием Стьюдента.

По окончании опыта все полученные данные сводятся в таблицу. В табл.13 представлены закономерности развития и гибели животных в присутствии токсических веществ.

На основании результатов опытов выводят остролетальные,

Таблица 13

Действие токсических веществ на хирономид
(среднее из трех параллельностей)

Концентрация, мг/л	Количество личинок в опыте, экз.	Мертвые особи, экз.			Выживаемость с поправкой по Абботу, %	Сутки вылета M± m	Критерий достоверности, t
		личинки	куколки	имаго			
-							
-							
Контроль							

хронические летальные, сублетальные, стимулирующие и недействующие концентрации вещества для хирономид.

9. ОПЫТЫ НА ПРУДОВИКЕ ОБЫКНОВЕННОМ

Характеристика тест-объекта. Брюхоногие моллюски играют большую роль в круговороте органического вещества пресных водоемов и продуктивности сообщества фитофильных беспозвоночных. Питаясь растительными остатками, они активно участвуют в утилизации и деструкции органического вещества.

Прудовик обыкновенный (Limnaea stagnatis) является представителем эпибентоса. Он широко распространен в прибрежной зоне стоячих или медленно текучих водоемов (Жадин, 1950).

Условия лабораторного содержания. Прудовиков отлавливают в летние месяцы на мелководьях эвтрофных водоемов, в зарослях высшей водной растительности. После вылова в опыт отбирают половозрелых особей, интенсивно передвигающихся и потребляющих корм, одного размера, веса и цвета раковины. Кормят прудовиков листьями одуванчиков, рдестом блестящим и капустой качанной в изобилии, что положительно сказывается на их росте и продуктивности. Прудовиков помещают в кристаллизаторы на 2-3 л по 3-5 экз.Период акклимации - две недели.

Для лабораторного содержания прудовиков и проведения токсикологических испытаний необходимо следующее оборудование: кристаллизаторы на 2-3 л, стаканы химические на 100-500 мл, склянки с притертыми пробками на 0,5-1 л.

(для приготовления и хранения маточных растворов) пипетки химические на 1-10 мл, цилиндры мерные на 50-1000 мл, колбы мерные на 0,2-1 л, чашки Петри, респирометры (0,5 л банки) и крышки из стекла, сифоны с зажимами Мора, пикнометры, реактивы для определения кислорода методом Винклера, микроскоп, бинокуляр, весы технические и аналитические с разновесами, термостат на 150°С, боксы, муфельная печь на 450°С, тигли, термограф, спирт этиловый 96°-ный, ножницы, пинцет, часовое стекло, лейкопластырь для этикеток, вазелин, фильтровальная бумага, линейка, измеритель, марля, сетка на кристаллизаторы.

Постановка острых опытов. Эти опыты длительностью 3-5 сут позволяют оценить токсичность вещества (сточной воды) по выживаемости и поведению прудовиков. Контролем служит выживаемость и поведение особей в чистой воде. В остром опыте прудовиков в течение 2 сут не кормят как в контроле, так и в опыте. Опыты проводят в 2-3 повторностях.

Растворы исследуемых токсикантов готовят на воде из пруда, где отловлены животные, или на водопроводной (предварительно дехлорированной и отстойной). Для проведения острого опыта необходимо приготовить ряд (5-7) концентраций или разведений загрязняющего вещества методом разбавления наибольшей опытной концентрации с кратностью 2,5 или 10, например 100; 50; 25 мг/л и т.д.; 10; 20; 4 мг/л и т.д. и 100; 10; 1 мг/л и т.д. В первом случае можно более точно, чем во втором и третьем, определить область концентраций, подлежащих исследованию в хроническом опыте. Исходные маточные растворы готовят в концентрациях, соответствующих максимальной растворимости вещества.

В каждый опытный кристаллизатор наливают 1,5-2,5 л исследуемой жидкости и помещают по 3-5 моллюсков. В первые 8 ч ежечасно, а затем два-три раза в день снимают показания, учитывая при этом количество живых особей*), их поведение (степень и характер передвижения, выдвижение ноги и ее реакцию на раздражение, выделение слизи, определяемое по помутнению опытного раствора).

Воду (в контроле и опыте) меняют 2-3 раза в неделю с учетом стабильности вещества (сточной воды).

---

*) Тех животных, которые не реагируют на механическое раздражение и тело которых легко высвобождается из раковины, считают погибшими

Изменения жизнедеятельности прудовиков в опыте сравнивают с контролем, используя средние показатели (из трех повторностей) как наиболее статистически надежные. Фиксируют время и концентрацию вещества (разбавление сточной воды), при которых гибнет 50–100% особей. При этом, если за 24–96 ч гибнет 50% прудовиков, среда обладает сильной токсичностью. Если за период наблюдений (5 сут) гибели прудовиков не происходит, значит острой токсичностью эта вода не обладает.

В результате опытов выясняют, является ли испытуемое вещество (или сточная вода) остро токсичным и при какой концентрации исследуемого вещества исчезает острая токсичность.

По результатам кратковременных опытов (96 ч) определяют

$ЛК_{50}$ – среднюю (медианную) летальную концентрацию вещества (сточной воды), вызывающую гибель 50% животных;

$ЛК_{100}$ – концентрацию вещества, при которой гибнут все животные;

$ЛК_{0}$ – пороговую концентрацию (минимальную действующую), при которой организмы не гибнут;

$ЛТ_{50}$ – среднее (медианное) время выживания 50% особей в ряду концентраций (разбавлений).

Постановка хронических опытов. Хронические испытания с прудовиками служат для подробного изучения свойств сточной жидкости и отдельных веществ. Продолжительность опытов от 45 до 60 сут.

Исходной концентрацией для длительных испытаний служит наибольшая безвредная концентрация, определенная в остром опыте. Шкалу концентраций можно строить и в геометрической, и в арифметической прогрессии. Чем меньше интервал между соседними концентрациями, тем с большей точностью можно определить относительно безвредную концентрацию вещества (разбавление сточной воды). Опыт проводят в двух-трех параллельных сериях. Число особей, повторность в каждой серии и объем жидкости такие же, как и в остром опыте.

В хроническом эксперименте прудовиков подкармливают и снимают показания ежедневно. В качестве критериев токсичности (Скадовский, 1955; Строганов, 1971) используют поведенческие реакции, характеризующие подвижность особей, чувствительность ноги при механическом воздействии, интенсивность потребления корма и выделение слизи; выживаемость. Важными показателями являются также размножение и плодовитость, о которых можно судить по времени появления первых кладок, их числу и количеству яиц в кажд-

дой кладки. Для характеристики потенциальной плодовитости используют такие показатели, как число яиц в кладках, полученных от каждого моллюска за период эксперимента, а для оценки реальной - количество выклюнувшейся молоди в абсолютных величинах и процентах к исходному числу яиц в кладках. В качестве дополнительных параметров токсичности можно использовать характеристики процесса эмбриогенеза (время начала и конца прохождения каждой стадии, стадия остановки развития и т.д.) вплоть до вылупления молоди. Водносолевой обмен прудовика оценивают по следующим показателям: сырой вес тела и раковины, вес полостной жидкости и воды в теле, сухой остаток тела, зола в теле (смотри описание ниже). По изменению количества полостной жидкости и воды в теле (по разнице сухого остатка и сырого веса тела) судят о степени обводненности, а по количеству зольных элементов в теле и весу раковины - об изменении минерального обмена в зависимости от степени загрязнения.

Изучение энергетического обмена у прудовика сводится к определению интенсивности потребления кислорода с применением наиболее распространенного химического метода - по Винклеру. Для этого в респирометры*) наливают воду, в которой содержались прудовики, помещают в него животных и закрывают сосуд, чтобы не было пузырьков воздуха. По истечении заданной экспозиции определяют содержание в воде растворенного кислорода. Зная количество его до начала и после экспозиции, вычисляют разницу, которая указывает на количество потребленного прудовиком кислорода. Исследуемая вода содержит некоторое количество бактерий, протистов, органики, потребляющих растворенный в воде кислород. Это количество кислорода, потребленного бактериями и пошедшего на окисление веществ, нужно исключить. В противном случае получаем завышенные показатели интенсивности дыхания животных.

Исследуемой водой заполняют два респирометра, в один из них помещают прудовиков (3 экз), в другой - воду без прудовиков, отмечают время начала опыта. Оба респирометра ставят в ванну - термостат для поддержания постоянной температуры воды.

Для трех прудовиков достаточной является экспозиция в течение 2 ч. В этом случае в воде после окончания эксперимента остается кислорода около 60-65% первоначального содержания. Если же

---

*) В качестве респирометров используют предварительно калиброванные бытовые банки на 0,5 л, они невелики по высоте, что не создает ярусности в содержании растворенного в воде кислорода.

кислорода в воде после экспозиции значительно меньше, то необходимо количество прудовиков в респирометрах уменьшить.

По окончании экспозиции открывают респирометр и осторожно сифоном отбирают воду в калиброванный пикнометр для фиксации и определения в нем количества растворенного кислорода. Животных взвешивают и измеряют объем.

Количество кислорода, потребленного прудовиками (в мг O_2 на I л за I ч) определяют по формуле

$$(m_0 - m)(V_1 - V_2)/Pt,$$

где m_0 – содержание кислорода, растворенного в воде респирометра (без прудовиков), мг O_2 на I мл; m_1 и V_1 – соответственно содержание кислорода, растворенного в воде респирометра с прудовиками (мг O_2 на I мл) и объем (мл) этого респирометра; V_2 и P – соответственно объем (мл) и вес (г) прудовиков; t – длительность экспозиции, ч.

В хроническом опыте регистрируют также морфо- физиологические показатели прудовиков: высоту и ширину (мм) раковины, отношение высоты к ширине раковины, общий вес прудовика (г), вес раковины и тела (г), вес полостной жидкости (г), сухого остатка тела (г), золы, органического вещества и воды тела (г). Для определения этих показателей используют минимум I0–I5 экз. взрослых прудовиков.

Высоту и ширину раковины измеряют штанген-циркулем. За ее высоту принимают расстояние от вершины раковины до наиболее выступающего края устья; за ширину – диаметр раковины в наиболее широкой ее части. Для определения общего веса прудовика его обсушивают фильтровальной бумагой и, не надавливая на ногу (для сохранения в раковине полостной жидкости), переносят на технические весы и взвешивают.

При определении веса тела и раковины ножницами разрезают раковину по швам витков, освобождают тело, обсушивают на фильтровальной бумаге и взвешивают на аналитических весах (с точностью до 0,00I г). Фиксируют 96°-ным этиловым спиртом тело животного каждой размерной группы в бюксах. Затем собирают все осколки раковины и взвешивают. Путем расчета (общий вес минус вес тела и раковины) определяют количество полостной жидкости.

Для определения сухого остатка тела вес зафиксированных 96°-ным спиртом прудовиков (в калиброванном бюксе) доводят до постоянного в термостате при температуре I03–I05°С. По количеству сухого остатка тела, рассчитанного на единицу сырого веса, судят

о степени воздействия токсиканта. По разнице сырого и сухого весов определяют количество воды в теле прудовика и судят о степени обводненности или обезвоживания тела под воздействием токсиканта.

Сухой остаток тела прудовика (весь или его часть) переносят в тигли (калиброванные при температуре 450°) и сжигают в муфельной печи при температуре 450°. Рассчитывают количество золы на единицу веса сухого остатка тела. По количеству золы (минеральных элементов)судят об изменении минерального обмена.

Органическое вещество тела животного рассчитывают по разнице сухого остатка и золы. Эта величина указывает на степень энергетических затрат организма в зависимости от концентрации токсиканта.

Для определения суточного рациона особей находят разность между начальным количеством сырого корма и его остатком. Задаваемую порцию корма взвешивают, а остатки изымают, обсушивают и вновь взвешивают. Для каждой размерной группы животных вычисляют кормовой коэффициент по формуле $K = P/\Delta P$, где P - вес съеденного корма, (г); ΔP - прирост веса животного (г). Этот показатель позволяет судить об эффективности потребленного корма в различных концентрациях токсиканта по сравнению с контролем.

Для учета динамики роста молоди в аквариумы (объемом 500--700 л) помещают по 2-3 взрослых прудовика. Ежедневно учитывают появление кладок, начало выклева и время появления первой молоди, которая культивируется в аквариуме. Через 3-4 месяца молодь изымают из аквариумов*) и промеряют под микроскопом с помощью окулярмикрометра по высоте и ширине раковины. В зависимости от высоты раковины молодь распределяют по размерным группам с классовым промежутком в I мм (табл.I4). Из каждой размерной группы, начиная с высоты раковины 5 мм, отбирают по 5-20 экз.молоди для определения перечисленных выше

---

*) Нужно иметь в виду, что мелкая молодь держится у уреза воды, быстро обсыхает и может быть не учтена при расчете ее численности. Необходимо регистрировать и погибшую молодь, учитывая пустые раковинки. Мелкую молодь препарируют под микроскопом МБС-I или бинокуляром.

Таблица 14

Результаты учета динамики роста молоди прудовиков

Показатели	Контроль и концентрации загрязняющего вещества	Размерные группы молоди, мм						
		1,1–2,0	2,1–3,0	3,1–4,0	и т.д.	30,1–31,0	31,1–32,0	и т.д.
Общее количество, экз.								
Ширина раковин на I экз., мм								
Общий вес на I экз., г								
Сырой вес тела на I экз., г								
и т.д.								
Вес тела на I г общего веса в контроле								
и т.д.								
Общий вес, % к весу в контроле								
и т.д.								

морфо-физиологических показателей. После получения этих данных рассчитывают их для молоди каждого классового промежутка на I г общего веса сырого (сухого) вещества и выражают в % к контролю. Таким образом, можно выяснить увеличение размеров и резистентность разных размерных групп прудовиков к загрязняющему веществу.

Оценка и обработка результатов. Для определения безвредной концентрации токсиканта в хронических опытах результаты приводятся в следующей форме: выживаемость (%) в течение 45–60 сут; плодовитость потенциальная и реальная в пересчете на одну особь (% к контролю); морфо-физиологические показатели, интенсивность дыхания и питания (% к контролю). Результаты хронического эксперимента заносят в таблицы, аналогичные таблицам, построенным по ре-

зультатам острого опыта. Для обработки результатов острого и хронического опытов пользуются общепринятыми методами математической статистики.

Результаты, полученные по выживаемости в остролетальных концентрациях (гибель на 5-е сутки) и хронических сублетальных, характеризуют токсичность загрязняющего вещества по степени нарушения перечисленных выше показателей у прудовиков.

Критериями хронического действия химических веществ на прудовиков являются: I) уменьшение выживаемости взрослых и эмбрионов на I5-25%; 2) смена стимуляции размножения его угнетением; 3) угнетение интенсивности потребления кислорода на I0-I5%; 4) угнетение водно-солевого обмена на I0%. Меньшие отклонения, чем в контроле, могут служить основанием для отнесения испытанной концентрации вещества к безвредной.

I0. ОПЫТЫ НА РЫБАХ

Характеристика тест-объектов. Рыбы являются конечным звеном трофической цепи водных экосистем. Многие из них имеют важное промысловое значение, поэтому определение токсического воздействия химических веществ на рыб необходимо для установления ПДК вредных веществ для рыбохозяйственных водоемов. Выделяют три группы рыб, обладающих разной чувствительностью по отношению к большому числу токсических веществ (Строганов, I97I):

а) высокочувствительные - лососевые (форель, пелядь), плотва, пескарь, голец, верховка, судак;

б) среднечувствительные - окунь, голавль (возраст I+), красноперка, лещ, гольян;

в) слабочувствительные - голавль (в возрасте 2+ и старше), карась, карп.

При установлении ПДК обязательны испытания на высоко- или среднечувствительных к токсикантам видах рыб. Исследования на слабочувствительных видах, например карпе, целесообразны при нормировании токсических веществ в воде прудов, оценке биологической значимости физиолого-биохимических изменений у рыб под влиянием токсикантов.

Целесообразно использовать виды, широко распространенные в местных водоемах, легко доступные и хорошо переносящие содержание в лабораторных условиях. При отсутствии достаточного количества промысловых рыб и условий для их содержания целесообразно прово-

дить работы на "сорных" рыбах, обладающих высокой и средней чувствительностью к токсическим веществам, например верховках и пескарях. Выбор других рыб в качестве тест-организмов должен быть обоснован литературными и экспериментальными данными.

Условия лабораторного содержания. Для исследований подбирают некрупных одновозрастных рыб в хорошем физическом состоянии из водоемов или хозяйств, благополучных в отношении инфекционных и инвазионных, а также массовых незаразных заболеваний. Рыб транспортируют в бидонах или полиэтиленовых мешках, не допуская травмирования и резкого снижения содержания кислорода в воде. При надлежащем уходе и кормлении можно создать запас рыб. Для этого их содержат в садках, установленных в чистом водоеме, или проточных ваннах, лотках или бассейнах в аквариальной. При содержании запаса рыб необходимо поддерживать правильный водообмен в емкости из расчета I–I,5 $м^3$ воды в сутки на I кг лососевых рыб и 0,5–I,0 $м^3$ – на I кг карповых рыб. Если нет условий для осуществления постоянного протока воды, рекомендуется проводить смену ее в емкостях с рыбой, исходя из содержания кислорода в воде. Для лососевых рыб содержание кислорода в воде должно быть не ниже 9,5–I0,5 мг/л, а для карповых – не ниже 8,0–8,5 мг/л. Для обогащения воды кислородом рекомендуется применять принудительную аэрацию.

Для кормления рыб можно использовать пастообразные гранулированные или живые корма из расчета от 0,8 до 5% к весу тела рыб. Все емкости, используемые для содержания рыб, необходимо ежедневно очищать от скапливающихся остатков несъеденного корма и фекальных масс.

Оборудование и материалы: стеклянные аквариумы, эмалированные или пластмассовые ванны, лотки, пластмассовые бассейны, пригодные для длительного содержания рыб и проведения опытов; резиновые шланги разного диаметра и длины, дель, газ, различные по размеру сачки из дели и газа, полиэтиленовая пленка, клеенка, марля; халаты, резиновые фартуки и сапоги, резиновые перчатки, вентиляторы, ведра эмалированные, бидоны, тазы и кюветы разных размеров; ножницы, скальпели, пинцеты, весы аптекарские (чашечные и ручные), аналитические, разновесы, секундомеры, линейки, набор инструментов и реактивов для исследования крови, фотоаппарат, микроскоп, лупы, установка для аэрации воды, электромешалка, холодильники для хранения корма, реактивов; стеклянная посуда вместимостью от 0,I до 3,0 л, мерные пипетки, бюретки, глазные пипетки, шприцы на I–20 мл, инъекционные иглы, мерные стаканы, колбы, чашка Петри, ре-

зиновые груши, стеклянные трубки и палочки, карандаши по стеклу, тушь, лейкопластырь, журналы для записей, фиксирующие и дезинфицирующие жидкости и др.

Условия постановки опытов. Перед началом экспериментов рыб помещают в аквариумы или другие экспериментальные емкости для профилактического выдерживания в течение 7-10 сут с целью адаптации к новым условиям. Опыты проводят на двух-трех видах рыб из различных семейств и выявляют рыб с высокой чувствительностью к токсиканту путем сопоставления 24-96-часовых $ЛК_{100}$ или $ЛК_{50}$ в острых опытах. Хронические опыты начинают с концентрации, равной I/2 96-часовой $ЛК_{50}$, и создают токсикологический ряд из пяти-семи убывающих концентраций вещества с множителем I/2. Длительность хронических опытов I-3 мес в зависимости от стойкости препаратов в водной среде.

Эксперименты проводят в стеклянных аквариумах или эмалированных ванночках вместимостью 20-40 л в двухкратной повторности с использованием 6-10 особей в каждой концентрации вещества. Два аквариума служат контролем.

Норма посадки сеголетков и годовиков лососевых и сиговых рыб в экспериментальные емкости для проведения хронических опытов должна быть не более I г ихтиомассы на I л воды в сутки; для карповых рыб - не более 2 г на I л воды в сутки, последняя для карповых является пороговой и увеличение ее недопустимо, поскольку приводит к серьезным нарушениям чистоты эксперимента.

Взвешивание рыб производят в воде, первый раз перед опытом, а затем через каждые 10-15 сут до окончания эксперимента. Для этого на весы ставят сосуд вместимостью 2-2,5 л, в который наливают 0,5-0,7 л воды и уравновешивают его с помощью гирь или другого сосуда с водой. Затем отловленных рыб быстро помещают в сачок и переносят в сосуд с водой для взвешивания, предварительно осушив низ сачка от избытка влаги полотенцем и марлей. Мелких рыб (личинки, мальки) взвешивают так же, но с применением легких химических стаканов на аптекарских или других более точных весах.

Для опытов используется незагрязненная вода из природных водоемов, а при ее отсутствии - дехлорированная вода, получаемая путем отстаивания в течение 3 сут (присутствие следов свободного хлора в воде недопустимо). Один раз в 10 сут ведутся гидрохимические наблюдения за температурой, содержанием кислорода в воде, pH, окисляемостью, минерализацией, жесткостью. С учетом стойко-

сти препаратов смену воды в аквариумах проводят один раз в 1-3 сут, спустя 1,5-2 ч после кормления рыб. При этом необходимо предохранять рыб от травмирования. Аэрация воды возможна лишь в тех случаях, когда состав и концентрация испытуемого вещества не изменяются. Толщина слоя воды в аквариуме для сеголетков и годовиков всех видов рыб должна быть не менее 20-25 см, для более крупных рыб ее следует увеличивать.

В аквариумах постоянно должна поддерживаться оптимальная для исследуемого вида температура воды. Практика показывает, что хронические эксперименты с рыбами лучше всего проводить при следующих температурах воды: 8-10°С для радужной форели, 10-12° С для пеляди, 16-18°С для карпа и др. С повышением температуры возрастает опасность массовой вспышки ихтиофириоза или сапролегниоза, что ухудшает результаты опытов.

При кормлении необходимо учитывать видовые и возрастные особенности питания рыб. Кормить рыб можно говяжьей и свиной селезенкой в смеси с комбикормами, а также живыми кормами (гаммарусы, дафнии, моина, хирономиды и др.).

В журнале должны фиксироваться количество подопытных рыб, прирост всей ихтиомассы и динамика прироста ее единицы.

Учет регистрируемых показателей. К обязательным показателям относятся:

1. Выживаемость рыб, определяемая путем систематического учета живых и погибших организмов на протяжении всего опыта (в острых опытах через 24, 48, 96 ч, в хронических - через каждые 10 сут опыта). Полученные данные обобщают и выражают в абсолютных и процентных величинах. Устанавливают зависимость выживания рыб от концентрации вещества и времени его воздействия на организм. Находят допустимую концентрацию вещества, т.е. концентрацию, которая не вызывает гибели рыб в хроническом опыте.

2. Прирост ихтиомассы, устанавливаемый на основе данных периодического взвешивания рыб в опыте (каждые 10-15 сут).Этот показатель относится к числу чувствительных общебиологических характеристик состояния тест-объектов и обязательно учитывается в исследовательских работах при установлении ПДК веществ для рыбохозяйственных водоемов.

3. Поведение рыб и реакция на внешние раздражители. Местоположение рыб в аквариуме с раствором токсиканта устанавливается

путем периодического осмотра их в опыте. Изменение местонахождения рыб в пространстве обусловлено расстройством дыхания и газообмена и может свидетельствовать о поражении многих систем организма. В связи с этим по изменению местоположения рыб в емкости можно судить о степени токсичности исследуемых концентраций вещества. С повышением токсичности вещества у рыб наблюдается тенденция к подъему в поверхностные слои при наличии возбуждения или общего угнетения, дискоординации движения, расстройств дыхания и других патологических признаков. Незадолго до гибели большая часть рыб опускается на дно.

При отравлениях токсикантами реакции рыб на внешние раздражители могут усиливаться, ослабевать, либо полностью исчезать. Такими раздражителями при проведении токсикологических исследований могут быть: стук по аквариуму, свет, плеск воды, подведение сачка и прикосновение палочкой к телу рыбы, искусственно создаваемый ток жидкости путем слива или слабого вращения воды при помощи лопаточки.

Несмотря на некоторые различия в развитии процесса отравления рыб ядами, как правило, одна за другой следуют следующие стадии интоксикации: начало беспокойства (учащение дыхательного ритма, беспокойное метание, отставление плавников), первые признаки расстройства чувствительности (судорожное дыхание, поднятие лучей плавников, неполное закрытие рта), изменение раздражимости (стремительное плавание или неподвижность, сильная реакция на внешние раздражения или отсутствие такой реакции), первое расстройство равновесия (опрокидывания на бок или на спину, кружение вокруг продольной оси тела, толчкообразные движения), полная потеря равновесия (внезапное изменение положения тела, дрожание или паралич мышц, судороги и др.), агония (удушье, паралич). Все эти признаки регистрируют через 24, 48, 96 ч, а в хронических опытах – каждые 10 сут. Выявляют концентрацию вещества, при которой не проявляются внешние признаки интоксикации.

4. Характер питания. Разные виды рыб имеют свои особенности поедания корма. Хищные рыбы (радужная форель, лосось и др.) активно набрасываются на корм, стараясь поймать его на лету в воздухе или у поверхности воды. Карповые рыбы (карп, сазан) корм берут спокойно, заглатывая его в толще воды или собирая на дне аквариума. При отравлениях эти реакции угнетаются или полностью подавляются; отказ от корма – признак интоксикации. В конце экспериментов устанавливается концентрация раствора, при которой не происходит нарушения рефлекса питания.

5. Характер и частота дыхания у рыб. Наблюдения ведутся через 24, 48, 96 и каждые 10 сут в хронических опытах путем оценки силы, частоты и ритма дыхательных движений жаберных крышек с помощью секундомера в течение 1-10 мин по отношению к контролю. Нормальное дыхание у рыб характеризуется спокойными, ритмичными, умеренной силы (амплитуда) и частоты колебательными движениями жаберных крышек. Норма устанавливается в каждом конкретном случае на здоровых рыбах. При отравлениях можно наблюдать различные расстройства дыхания, в том числе резкое учащение колебательных движений жаберных крышек, беспорядочное дрожание жабр с последующей остановкой дыхания, периодическое прекращение и возобновление учащенных или замедленных дыхательных движений с увеличенной или уменьшенной амплитудой колебательных движений жаберных крышек. Все эти признаки характеризуют тяжелое состояние рыб, обычно заканчивающееся летальным исходом.

6. Внешний вид (состояние кожных покровов, плавников, органов зрения). Энергичность рыб, округлые спины, упругие мышцы и полный упругий живот с наличием полостного жира на внутренних органах при нормальном состоянии печени характеризуют хорошее состояние рыб. Вялые, пассивные рыбы, с опавшей и заостренной спиной, запавшими глазами, подтянутым животом, мягкой мускулатурой, истонченной брюшной стенкой и отсутствием полостного жира на внутренних органах характеризуются как истощенные. Состояние отдельных органов и систем организма оценивают в конце опыта и у погибших рыб в течение эксперимента общими методами исследования (осмотр, определение запаха, измерение, фотографирование и зарисовки). Используют также разнообразные специальные методы исследования (микроскопия, электрокардиография, рентгенография, запись дыхания и т.д.). При отравлениях могут быть обнаружены самые разнообразные изменения в органах и тканях рыб, которые в совокупности характеризуют особенности течения того или иного токсикологического процесса.

На коже часто обнаруживаются изменения слизистого покрова, покраснения (гиперемия), кровоизлияния, новообразования (опухоли), рубцы, эрозии, язвы, ерошение и выпадение чешуи, появление налетов. Аналогичные изменения возникают на плавниках, которые иногда деформируются и разрушаются вплоть до оголения лучей. Мускулатура рыб при отравлении может стать дряблой, водянистой, тургор ослабляется, при надавливании пальцем обнаруживается медленно выправляющаяся вмятина. Нередко наблюдаются парезы, параличи.

уплотнение отдельных групп мышц головы, туловища и хвостового стебля с соответствующими искривлениями тела. Глаза больных рыб застланы пеленой, тусклые, помутневшие, с бледным рисунком. Иногда обнаруживаются пучеглазие, кровенаполнение сосудов, кровоизлияния в переднюю, заднюю камеры и ткани глаз.

7. Состояние жаберного аппарата. Осмотр жаберного аппарата производится при жизни и после смерти рыб под водой и в воздушной среде. Рыб отлавливают, завертывают в полотенце или марлевую салфетку, отводят пальцем жаберную крышку в сторону и осматривают жабры визуально или с помощью лупы. Осмотр жабр под водой производится путем погружения рыбы на глубину 3-5 см, при этом многие патологические изменения гораздо лучше заметны, чем при осмотре в воздушной среде. В норме жабры полнокровные, ярко-красного цвета, чистые, жаберные лепестки ровные, лежат параллельно, соприкасаясь друг с другом, свободный край их образует ровный полукруг относительно жаберной дужки. При отравлениях и многих заболеваниях рыб жабры приобретают различные оттенки: темно-вишневый, красный, бледно-красный, бледный желтовато-розовый, темно-бурый, сероватый и др. Жаберные лепестки набухают и лежат беспорядочно.

8. Патологоанатомическое вскрытие рыб проводится при гибели и обязательно после окончания опыта. Перед вскрытием рыб измеряют, взвешивают, фотографируют, фиксируют, изготовляют препараты. После вскрытия определяют цвет, запах, консистенцию, местоположение, кровонаполнение, дегенерацию, деформацию органов и тканей, а также наличие или отсутствие жировых отложений по балльной системе.

9. Органолептические свойства и вкусовые качества бульона и мяса рыб. После вскрытия и обследования по показателям, приведенным выше, рыб обмывают чистой питьевой водой, помещают в стаканы или колбы, заливают чистой питьевой водой в соотношении 5 частей воды на I часть рыбы и без добавления соли варят в течение 5-10 мин на слабом огне. После охлаждения до комнатной температуры у сваренных контрольных и подопытных рыб вырезают кусочки спинных мышц весом 0,2-0,5 г (в зависимости от веса рыбы). Кусочки мяса помещают в рыбный бульон, разлитый по нумерованным чашкам Петри. Порядок нумерации чашек Петри с контрольными подопытными рыбами оглашается дегустаторам только по окончании дегустации. Для проведения дегустации приглашают 3-5 чел. Испытатели отмечают цвет бульона, присутствие или отсутствие запаха его, а затем цвет и присутствие или отсутствие постороннего запаха мяса

рыб. После этого определяют вкусовые качества мяса рыб. Для этого испытатель берет в рот небольшой кусочек мяса, не торопясь, разжевывает его передними зубами, определяя вкус, наличие постороннего привкуса. В норме вкус мяса рыб сладковатый. После дегустации разжеванный кусочек мяса рыбы дегустатор выбрасывает в банку, а рот ополаскивает питьевой водой. Результаты дегустации испытатель вносит, не оглашая, в таблицу (табл.I5). После этого приступает к дегустации бульона и мяса рыбы из следующей чашки Петри.

Таблица I5

Результаты органолептических испытаний

№№ пробы	Органолептические свойства бульона		Органолептические свойства и вкусовые качества мяса рыб		
	цвет	запах	цвет	запах	вкус
	(изменен или нет)	(отсутствие или наличие постороннего запаха)	(изменен или нет)	(отсутствие или наличие постороннего запаха)	(отсутствие или наличие постороннего привкуса)

Обобщая дегустационные таблицы, экспериментатор делает заключение о наибольшей концентрации вещества, которая, по данным большинства дегустаторов, не вызывает изменений органолептических свойств бульона и мяса, вкусовых качеств мяса рыб.

Токсикологическая оценка испытанного вещества. В качестве обязательных рекомендованы наиболее общие показатели и признаки отравления рыб. По ним устанавливают допустимые концентрации испытуемого вещества, т.е. концентрации, которые в хроническом опыте не вызывают никаких отклонений от контроля. Допустимые концентрации, установленные по каждому обязательному показателю, вносят в общую таблицу (табл.I6).

Таблица I6

Сводная таблица допустимых концентраций

Организмы (вид, возраст)	Показатели (длительность опыта)	Допустимые концентрации веществ, мг/л
	Выживаемость	
	Прирост ихтиомассы	
	Поведение	
	Реакции на внешние раздражители	

Продолжение табл. I6

Организмы (вид, возраст)	Показатели (длительность опыта)	Допустимые концентрации веществ, мг/л
	Поедание корма	
	Характер и частота дыхания	
	Внешний вид, состояние наружных органов	
	Состояние жаберного аппарата	
	Патологоанатомическое вскрытие	
	Состояние внутренних органов	
	Органолептические свойства и вкусовые качества бульона и мяса рыб	

В качестве максимально допустимой для взрослых рыб концентрации вещества принимается наименьшая концентрация из допустимых, установленных по каждому обязательному показателю.

К факультативным показателям относятся:

I. Сачковая проба, позволяющая оценить резервную силу организма рыб по времени трепетания на сачке. Отловленных взрослых рыб из растворов с разной концентрацией вещества помещают на плоскодонный сачок и регистрируют время прекращения трепетания, оценивают характер и силу движения. Полученные данные сравнивают с результатами, полученными на рыбах из контрольных аквариумов, а в естественных условиях - из чистых водоемов или контрольных участков. При острых, подострых и хронических токсикозах всегда отмечается резкое сокращение времени трепетания рыб. Полученные результаты сводят в таблицы, подвергают статистической обработке и по графической зависимости времени трепетания от концентрации вещества устанавливают действующие и допустимые концентрации.

2. Гематологические показатели широко используются в ихтиопатологии, ветеринарии, медицине, в токсико-гигиенических исследованиях. Они углубляют представление о динамике интоксикации организма гораздо раньше, чем появляются внешние признаки отравления рыб. Наиболее часто определяют следующие показатели: содержание гемоглобина, количество эритроцитов, РОЭ, подсчет лейкоцитарной формулы, процентный состав незрелых клеток эритропоэтического ряда, эритроцитарные картины и морфологию форменных элементов крови, размеры клеток крови.

Для взятия крови рыбу завертывают в чистую марлю или поло-

тенце. Место, откуда предполагают брать кровь, освобождают от слизи и избытка влаги ватно-марлевым тампоном. Пробы крови можно получить из жаберной вены путем введения тонко оттянутой пастеровской пипетки в жаберный сосуд нижней трети жаберной дужки, а также из сердца с помощью полой иглы или пастеровской пипетки. Место укола в сердце лежит в середине отрезка, соединяющего основание правого и левого грудных плавников. Иглу вводят в сердце под углом 45^0 относительно фронтальной плоскости тела рыб. Кровь можно также отобрать из хвостовой артерии после отрезания хвоста. Иногда используют полую иглу или пастеровскую пипетку, погружая их на медиальной линии позади анального плавника под углом 45^0 до упора в позвоночник рыбы.

Взятая кровь быстро свертывается, поэтому необходимо в возможно более короткий срок (40-50 с), пока кровь еще не свернулась, взять максимальное количество проб на определение различных гематологических показателей. В качестве антикоагулянта крови рыб применяют лимоннокислый натрий в виде порошка или 3,8%-ного раствора, которым ополаскивают пробирки, или добавляют I/4 часть раствора к объему крови.

Отбор проб крови и анализ проводят в следующей последовательности:

берут кровь от рыбы каким-либо методом;

приготовляют мазок крови;

заряжают меланжер для количественного подсчета форменных элементов крови или отбирают пробу крови в пробирку с раствором хлористого натрия для определения количества эритроцитов фотоколориметрическим методом на эритрогемометре;

заряжают гемометр Сали для определения содержания гемоглобина крови или отбирают пробы крови для определения этого показателя на эритрогемометре;

ставят реакцию оседания эритроцитов (РОЭ);

определяют содержание гемоглобина в крови по методу Сали или на эритрогемометре;

подсчитывают число эритроцитов в камере Горяева или на эритрогемометре;

фиксируют и окрашивают взятые мазки крови;

подсчитывают количество лейкоцитов и тромбоцитов непрямым методом; определяют лейкоцитарную формулу, эритроцитарные картины.

Приемы и методы гематологических анализов описаны в соответствующих руководствах.

Полученные результаты сводят в таблицы, подвергают статистической обработке и по графической зависимости изменений показателей от концентрации вещества устанавливают действующие и допустимые концентрации. Концентрация, не оказывающая влияния на показатели крови и не вызывающая патоморфологических изменений, является допустимой.

3. Гистологические и гистохимические показатели. Поражение органов и тканей рыб может наблюдаться и тогда, когда отсутствуют клинические симптомы интоксикации. В этих случаях гистологические изменения являются единственными показателями вредного влияния токсического вещества. Для исследований берут только свежий материал - от живых или находящихся в состоянии агонии рыб, либо от только что погибших особей. В хронических опытах фиксацию органов подопытных рыб следует производить в конце опыта. Для изучения воздействия токсических веществ гистологическому и гистохимическому исследованию подвергают печень, почки, жабры, желудочно-кишечный тракт, половые продукты, селезенку, поджелудочную и щитовидную железы, головной мозг, сердце, мышцы туловища, кожные покровы. Для сравнения обязательно фиксируют и исследуют органы здоровых (контрольных) рыб, находящихся в аналогичных условиях и такое же время, как и подопытные рыбы.

После вскрытия рыбы материал немедленно фиксируется во избежание обезвоживания и деформации поверхностых слоев клеток. Толщина кусочков органов для фиксации должна быть не более I см, чтобы фиксирующая жидкость легко и быстро проникала в ткань. Сроки фиксации для разных фиксаторов различны, как правило, они тем короче, чем выше температура фиксатора. При низких температурах фиксация протекает медленнее, но при этом прекращаются и аутолитические процессы. При использовании большинства фиксаторов наилучшие результаты дает длительная фиксация (3-5 сут) при температуре от I до I8°С. Объем фиксирующей жидкости должен в I5 - 20 раз превышать объем фиксируемых кусочков, длина и ширина фиксируемых объектов должна быть такой, чтобы они свободно могли помещаться в сосуд. Мелкие органы фиксируются целиком, из крупных вырезают пластинки с таким расчетом, чтобы на гистологических препаратах были как нормальные, так и изменившиеся части органа. Во избежание разрушения внутренние органы рыхлой консистенции, особенно мелких рыб, фиксируются вместе с близлежащими тканями.

В водной токсикологии хорошими фиксаторами служат пикриновая кислота, жидкость Буэна, формалин, I00°-ный спирт, смесь спирта,

формалина и уксусной кислоты. Методы и приемы гистологических и гистохимических работ изложены в соответствующих руководствах и пособиях (Кокуричева, 1974; Щербаков, Чемова, 1974).

Патоморфологические и гистохимические изменения должны быть приняты во внимание при установлении ПДК. При этом различают острые, подострые и хронические отравления, так как картина патологических изменений соответствует клинике отравления. В случае определения медианных летальных концентраций абсолютное большинство рыб погибает при высоких концентрациях токсического вещества. Чрезвычайно бурное развитие клинической картины летальной интоксикации соответствует быстро развивающимся патоморфологическим изменениям, обнаруживаемым в течение первых часов и суток действия токсиканта.

Патологические изменения, возникающие у рыб при воздействии токсических веществ, не всегда являются строго специфическими для каждого яда, чаще всего по ним можно судить лишь о вредности его для организма. По локализации и характеру изменений можно определить, к какой группе относится ядовитое вещество.

Гистохимические реакции и электронномикроскопические исследования позволяют более точно определить ПДК токсических веществ, которые не вызывают патологических изменений в организме. Гистологическая структура органов и тканей рыб в такой концентрации должна быть идентична таковой в контроле.

II. ОПЫТЫ НА ЭМБРИОНАХ РЫБ

Характеристика тест-объектов. Эмбрионы являются важными объектами установления ПДК загрязняющих веществ для воды рыбохозяйственных водоемов, так как если не будет обеспечено воспроизводство, не будет и рыбной продукции. Опыты показывают, что ранние стадии развития рыб могут проходить при относительно высоких концентрациях химических веществ, но у развившихся личинок обнаруживаются существенные изменения в морфофункциональном состоянии даже при малых концентрациях этих соединений. Кроме того, в опытах с эмбрионами рыб мы получаем ряд дополнительных сведений о специфике действия исследуемого вещества на живой организм (изменение токсичности с разведением, действие на процесс клеточного деления, на отдельные системы и органы).

Реакции эмбриона рыб на действие загрязнителей объясняются его особенностями. В эмбриональный период развития в основном за-

вершается морфогенез рыб. Если опыт проводить в исследуемом растворе с момента оплодотворения до личиночной стадии, то воздействие изучаемого соединения "подвергается контролю" позвоночного животного, проходящего ряд стадий развития. Выживание организма на каждой стадии зависит от своевременности формирования жизненно важных структур и функций, необходимых для прохождения следующей стадии. Даже небольшой дефект развития функциональных систем ведет к элиминации особи через естественный отбор. В связи с этим даже такой простой показатель, как выживаемость, на стадии эмбрионального развития рыб является суммарным при оценке состояния организма в исследуемых условиях, например при данной концентрации вещества. Если морфогенез эмбрионов и предличинок, развившихся в растворе токсиканта, не нарушился, подопытные особи отличаются от контрольных по функциональному состоянию. Это выражается в изменении весового и линейного роста, состояния сердечно- сосудистой системы и др.

Для проведения опытов можно брать разные виды рыб, имея четкое представление об их сравнительной чувствительности. Обычно используют весенненерестующих костистых рыб; хорошо проводить опыты с осетровыми рыбами, ряд исследователей предпочитает работать с лососевыми. Удобным объектом исследований является вьюн, так как с ним можно работать всю осень и зиму. Икру вьюна и осетровых рыб получают после гипофизарной инъекции, у остальных видов - от текучих производителей, отловленных на нерестилищах.

Планируя работу с тем или иным видом, необходимо предварительно ознакомиться с условиями инкубации икры в природе. При постановке опытов в лаборатории следует учитывать видовые особенности объекта, в первую очередь, температуру воды, pH, освещенность, обеспеченность кислородом.

В ходе опыта учитываются следующие показатели: темп дробления и развития; количество оплодотворенной икры; гибель эмбрионов до вылупления, гибель предличинок; время наступления основных стадий развития; количество уродливых предличинок после вылупления и уродливых личинок при переходе на смешанное питание;сердцебиение эмбрионов и предличинок при разной температуре воды; длину и вес личинок.

Хорошим показателем состояния развившихся зародышей является динамика вылупления предличинок, отражающая их разнокачественность (Мешков, Лебедева, 1973).

Условия лабораторного содержания. Опыты с икрой ведут в чаш-

ках Петри, в них можно содержать и предличинок до рассасывания желточного мешка. В опытах с лососевидными, имеющими крупную икру, используют кристаллизаторы и зоологические кюветы. Чашки с икрой и предличинками весенненерестующих костистых и осетровых рыб ставят на столы в лаборатории при температуре, оптимальной для изучаемого вида, а для лососевидных используют холодильные камеры и бытовые холодильники.

Необходимое оборудование включает: микроскоп стереоскопический МБС-I, окулярмикрометр, торзионные весы, секундомер, чешки Петри, мензурки на 50-I000 мл, пипетки с резиновыми грушами, аквариумы вместимостью от I до 30 л, бутылки на 250 и 500 мл, химические стаканы разные, предметные стекла, пенициллиновые флаконы, салфетки, птичьи перья, хориогонин или гипофизы карпа, шприц на I $см^3$, ножницы, марля, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу, лейкопластырь, формалин, поваренная соль, термометр или термограф.

Для растворов в опыте удобно использовать бутылки на 500 или 250 мл с притертыми пробками. Их калибруют, нанося по две линии - полный объем (500 или 250 мл) и I/I0 этого объема (50 или 25 мл). Это облегчает приготовление растворов во время опыта: при разведении раствора в I0 раз наливают раствор с большей концентрацией до меньшей метки, доливают чистой водой до верхней метки и тщательно перемешивают. На каждую бутылку наклеивают кусочек лейкопластыря и пишут на нем вещество и его концентрацию.

С учетом степени токсичности исследуемого вещества готовят серию рабочих растворов. Максимальная концентрация должна быть такой, чтобы в ней невозможно было развитие ранних зародышей (дробление не начинается). Такая концентрация определяется эмпирически. По отношению к этой концентрации необходимо взять разведения на 6-7 порядков меньше. Шаг разведения при максимальных концентрациях пол-порядка, а дальше - порядок.

Соответственно выбранным концентрациям вещества готовят чашки Петри по три для каждой концентрации и для контроля. Для каждого исследуемого вещества и для контроля берут отдельно маленькую резиновую грушу, обрезают ее и вставляют оплавленную стеклянную трубочку длиной I2-I5 см. На груше отмечают название вещества или "К" (контроль).

При постановке опытов с вьюном и осетровыми рыбами самок предварительно инъецируют гормоном гипофиза или хориогонином.

На одну самку вьюна используют I/3-I/2 гипофиза карпа;хорионина в зависимости от размера самки вводят от 100 до 250 ед активности гормона (МЕ). После инъекции самку вьюна помещают в сосуд Дюара, где при температуре 21°С она через 24 ч становится текучей. Для опыта надо инъецировать трех самок. Самцов вьюна не инъецируют, так как с начала зимы они содержат уже зрелую сперму.

Постановка опытов и учет показателей. В каждую чашку Петри вливают по I-2 мл исследуемого раствора или чистой воды (контроль).

Икру сцеживают в чистую сухую чашку Петри и добавляют в нее сперму от двух-трех самцов. При постановке опыта с вьюнами забивают самцов, извлекают молоки, обсушивают их фильтровальной бумагой или марлей, измельчают семенники ножницами в ту же чашку, где находится икра. Перемешивают икру со спермой с помощью птичьего пера.

В каждую чашку с раствором (или чистой водой) помещают примерно по 100-150 икринок весенненерестящихся костистых рыб и по 30-50 икринок осетровых и лососевых. Перемешивают икру с жидкостью (активируют сперму исследуемым раствором или чистой водой). Через 2-3 мин отмывают икру от спермы тем же раствором (или чистой водой), затем наливают в каждую чашку Петри ту же жидкость в количестве 70 мл. Записывают время оплодотворения икры. Клейкую икру до приклеивания равномерно распределяют по дну чашки с помощью птичьего пера.

Всю развивающуюся икру просматривают ежедневно,погибшие икринки отбирают, просчитывают и выбрасывают. Все показания заносят в журнал. Ежедневно (при высокой температуре 2 раза в день, в опытах с лососевыми 2 раза в неделю) меняют растворы и моют чашки Петри.

Для характеристики темпа развития в первые сутки устанавливают время появления первой борозды дробления (оно равно двум делениям дробления) и время образования 4, 8, 16 и 32 бластомеров. В последующие дни удобно фиксировать время образования желточной пробки и определенного числа сомитов.

Количество оплодотворенной икры определяют на стадии крупноклеточной морулы. Для этого неразвившуюся икру отбирают пипеткой, просчитывают и отбрасывают. В таблицу (табл.17) записывают количество оплодотворенной икры и общее число икры в каждой чашке. В эту же таблицу в дальнейшем вносят данные по гибели эмбрионов в ходе развития и числу уродливых особей.

Таблица 17

Развитие исследуемого вида в растворе токсиканта

Концентрация раствора, мг/л	Количество икры		Гибель на стадиях			Число предличинок		Число личинок	
	всего	оплодотворенной	гаструляция	сегментация тела	перед выклюпливанием	всего	уродливые	всего	уродливые

При наблюдении за развитием отмечают типы уродств, обращая особое внимание на наличие специфических поражений, вызываемых исследуемым соединением.

Для выявления динамики выклюпливания предличинок устанавливают время начала и окончания выклюпливания в каждой чашке, учитывают количество выклюпившихся особей через определенное время (6, 12 или 24 ч в зависимости от скорости развития).

После начала пульсации сердца из каждого варианта опыта и из контроля отбирают по 5-10 особей для изучения сердцебиения. Желательно два или три раза помещать чашки с развивающейся икрой и предличинками в условия более высокой и более низкой (на 2-3°С) температуры по сравнению с температурой, при которой идет опыт. Чашки помещают в измененные условия на несколько часов или на сутки и при этой же температуре определяют пульсацию сердца. Ритм биения сердца подсчитывают с помощью секундомера под микроскопом МБС-1.

В процессе развития предличинок ежедневно наблюдают за их состоянием: способностью подвешиваться к поверхностной пленке воды (у вьюна), реакцией на свет, на ток воды при смене растворов, на постукивание по чашке.

Опыт заканчивают в то время, когда у контрольных особей рассосался желточный мешок. На этой стадии необходимо тщательно просмотреть личинок во всех вариантах опыта и описать степень их развития по сравнению с контролем. В каждом варианте опыта подсчитывают общее количество личинок, выживших до стадии рассасывания желточного мешка, и определяют долю нормально развившихся и уродливых особей.

По окончании опыта личинок в каждой серии фиксируют формалином с поваренной солью: на 1 л раствора формалина (1 часть фор-

малина и 9 частей воды) 7 г соли (Ланге, Дмитриева, 1981).

Сразу после фиксации часть личинок (30-50 экз.) обсушивают на фильтровальной бумаге и взвешивают на торзионных весах. Можно для взвешивания личинок усыплять уретаном. Записывают общий вес и число взвешенных личинок.

Общую длину тела личинок в контроле и при всех исследованных концентрациях вещества измеряют на фиксированном материале примерно у такой же или большей выборки под микроскопом МБС-1. Удобно пользоваться объективом I^x, в этом случае сразу получают длину в миллиметрах. Промер личинок можно проводить в любое удобное для экспериментатора время, независимо от времени фиксации.

Обработка экспериментальных данных. Количество оплодотворенной икры определяют для контроля и для каждой исследованной концентрации в процентах от общего количества икры, взятой в опыт. Остальные данные удобней рассчитывать в процентах от количества оплодотворенной икры. Вычисляют средние из двух-трех повторностей. Оценивают достоверность отличия числа нормально сформированных личинок при каждой исследованной концентрации вещества от контроля с помощью пробит-анализа.

Если темп развития икры в опыте и контроле одинаковый, это отражают в таблице, характеризующей время прохождения одинаковых стадий развития. Если темп развития под действием токсиканта изменился, строят график для контроля и для каждой исследованной концентрации вещества, отмечая на оси абсцисс стадии развития, на оси ординат - время.

Для летальных концентраций токсиканта вычерчивают линию регрессии в полулогарифмической системе координат (на оси абсцисс откладывают логарифм концентрации, на оси ординат - $ЛТ_{100}$).

Приняв общее количество вылупившихся предличинок за 100%, определяют процент вылупления в выбранные промежутки времени. Строят график динамики вылупления предличинок (на оси абсцисс откладывают время, на оси ординат - процент вылупившихся особей).

Строят график пульсации сердца по суткам для каждой концентрации вещества и для контроля, над ним располагают кривую температуры воды в те же сутки.

Вычисляют средние длину и вес личинок в каждом варианте опыта. Экспериментальные данные обрабатывают статистически. Отличие от контроля оценивают по Стьюденту и Фишеру или методом "лямбда".

Заключение о токсичности. Основными критериями токсичности в

опытах по действию химических веществ на рыб в эмбриональный период развития являются гибель и появление уродств у основной части особей. Такие концентрации считаются остротоксичными.

Если без существенных морфологических нарушений развивается небольшая часть особей (10-30%), то они обычно обнаруживают отличия от контроля по функциональному состоянию (ослабление сердцебиения, недоиспользование желточного мешка, нарушение поведенческих реакций и др.). По сумме этих показателей такая концентрация без сомнений тоже относится к числу недопустимых.

Если выживаемость личинок в растворе близка к контролю (80--100%) и их морфологическое развитие визуально не отличается от контроля, следует оценить функциональное состояние развившихся особей. Прежде всего оценивают длину и вес подопытных особей по сравнению с контрольными. Под действием одних веществ изменяется средняя длина личинок (по критерию Стьюдента), под влиянием других - характер распределения этого признака (по критерию Фишера); одновременная оценка изменения обоих параметров может быть осуществлена методом "лямбда" Колмогорова и Смирнова. Показателем достоверности является достоверность отличия подопытной группы особей от контрольной.

Точность статистической оценки зависит от величины выборки. Можно ориентироваться на следующие данные. Так как рост предличинок рыб ограничен объемом пищи, содержащейся в желточном мешке, количество которой варьирует лишь в пределах видовой (популяционной) изменчивости, нами были определены пределы изменения средних веса и длины личинок, развившихся в контрольных вариантах опыта. Максимальные различия между отдельными повторностями в одном и том же опыте составили по длине до 5%, по весу до 20%.

Результаты, полученные при анализе длины и веса личинок, дополняют данными по динамике выклева, сердцебиению и поведенческим реакциям. Если сердцебиение изучалось при разной температуре воды, следует обратить внимание на регуляцию этого физиологически важного процесса при изменении экологического фактора (температуры) у контрольных и подопытных особей.

На основе полученных данных делают заключение о концентрации вещества, допустимой для рыб в эмбриональный период развития. В качестве допустимой принимается такая концентрация исследуемого соединения, при которой в воде развиваются личинки, не отличающиеся от контрольных по морфофункциональному состоянию.

Как было отмечено ранее, в опытах с эмбрионами рыб мы имеем

возможность получить некоторые дополнительные сведения о характере действия вещества на организм животного. Если линии регрессии исследуемого соединения идут под острым углом и в ряду 3 – 4 порядков концентраций наблюдается 100%-ная гибель, это указывает на кумулятивные свойства вещества. Если имеет место замедление темпа развития в растворах по сравнению с контролем, данное вещество является эмбриотоксичным.

12. РАСЧЕТНЫЙ МЕТОД ОБОСНОВАНИЯ ОРИЕНТИРОВОЧНОГО БЕЗОПАСНОГО УРОВНЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ (ОБУВ) ПЕСТИЦИДОВ

Широкое использование пестицидов в различных отраслях народного хозяйства, их большой ассортимент, постоянное изменение препаративных форм и быстрое моральное старение заставляют исследователей искать новые формы нормирования допустимых количеств этих препаратов в воде рыбохозяйственных водоемов. В первую очередь это относится к импортным пестицидам, значительное количество которых используется в СССР. Однако постоянная вариабельность ассортимента и нестабильность поставок делают нецелесообразным проведение дорогостоящих и длительных научных проработок по их применению.

В основу предлагаемых разработок положен принцип: с достаточной надежностью в наиболее короткий срок и наименьшими затратами разработать расчетные ОБУВ пестицидов с целью охраны рыбохозяйственных водоемов от загрязнения.

Общие положения. Настоящие методические рекомендации по разработке ОБУВ пестицидов экспрессным методом предназначены для исследователей, занимающихся нормированием для рыбохозяйственных водоемов остаточных количеств химических средств борьбы с вредителями и болезнями животных, растений, переносчиками болезней, паразитами, сорной растительностью в сельскохозяйственной, ветеринарной, лесотехнической и санитарной практике. Исследования проводятся для обеспечения органов рыбоохраны Главрыбвода Минрыбхоза СССР объективными научными данными, которые необходимы при решении вопроса о допустимости использования того или иного препарата в народном хозяйстве и установлении допустимого уровня содержания его в воде рыбохозяйственного водоема. Разработанные нормативные величины утверждаются Научно-техническим советом Главрыбвода.

Принятые обозначения: ОБУВ – концентрация пестицида в воде рыбохозяйственного водоема, не оказывающая отрицательного влия-

ния на режим среды и состояние ее обитателей; $ЛК_{50}$ – средняя летальная концентрация пестицида, вызывающая гибель 50% экспериментальных животных; τ_{50} и τ_{95} – время 50 и 95%-ного разложения пестицида в водной среде; М – молекулярная масса; $t_{кип.}$ – температура кипения пестицида; $t_{пл.}$ – температура плавления пестицида.

Для вычисления $ЛК_{50}$ используют разнообразные статистические методы, отличающиеся один от другого по трудоемкости, но дающие весьма близкие результаты. Так как по точности и возможности извлечения информации все статистические методы аналогичны, предпочтение следует отдавать менее трудоемким. Техника расчетов по различным методам достаточно подробно описана в литературе (Беленький, 1963).

Все исследования необходимо осуществлять на технических препаратах, однако их концентрации в воде рассчитывают по активно действующему веществу (АДВ). В тех случаях, когда пестицид нерастворим в воде, его растворяют в том же растворителе и в том же состоянии, как и при практическом применении. Дальнейший расчет концентраций ведут по АДВ. Дополнительно ставится серия экспериментов по токсичности растворителя (второй контроль).

Расчет ОБУВ по предлагаемым формулам осуществляется только в том случае, если τ_{95} не превышает 60 сут.

Определение стабильности пестицида. Эксперименты проводят в стеклянных аквариумах или вегетационных сосудах вместимостью не менее 20 л без смены воды в течение 20 сут при температуре воды 18 ± 2^{0}С, pH 6,5–8,5 и естественном освещении. Один аквариум является контрольным, в остальные вносятся пестициды в известных концентрациях (концентрация рассчитывается по АДВ). Опыты ставят в трехкратной повторности.

Изучают динамику разрушения пестицида путем определения его содержания в водной среде на 1-е, 3-ьи, 6-е, 8-е, 12-е, 15-е и 20-е сутки.

Как правило, процесс разрушения пестицида носит экспоненциальный характер, т.е. его можно описать уравнением

$$\lg C = \lg C_0 - t/\tau ,$$

где C – текущая концентрация пестицида, (мг/л); C_0 – начальная концентрация (мг/л); τ – постоянная времени процесса (сут); t – время (сут).

Приведенное уравнение аналогично линейному уравнению регрессии: $y = A + Bx$, где $y = \lg C$; $A = \lg C_0$; $x = t$; $B = -1/\tau$.

Коэффициенты регрессии A и B определяют методом наименьших квадратов по формулам $A = (\Sigma y - B\Sigma x) / n$; $B = (n\Sigma yx - \Sigma y\Sigma x)/[n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2]$,

где n - число наблюдений в динамике.

По приведенным формулам рассчитывают τ_{50} и τ_{95}.

Например, в результате лабораторных испытаний было установлено, что пестицид в модельном водоеме при концентрации 5 мг /л разрушается в следующей последовательности

Экспозиция (x), сут	0	I	6	8	I2	I5	20
Концентрация C, мг/л	5,00	4,I7	I,67	I,I6	0,55	0,30	0,I2

Для определения τ_{95} этого пестицида составляем таблицу (табл.I8).

Таблица I8

Данные для расчета τ_{95}

x	C	y	yx	x^2
0	5,00	0,6990	0	0
I	4,I7	0,620I	0,620I	I
6	I,67	0,2227	I,3362	36
8	I,I6	0,0645	0,3I60	64
I2	0,55	-0,2596	-3,II52	I44
I5	0,30	-0,5229	-7,8435	225
20	0,I2	-0,9208	-I8,4I50	400
62	0,I2	-0,0970	-26,9024	870

Находим коэффициенты B и A по формулам

$$B = \frac{n\Sigma yx - \Sigma y\Sigma x}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = \frac{7\,(-26,9) - (-0,097)\,62}{7 \cdot 870 - 62 \cdot 62} = -0,08I$$

$$A = \frac{\Sigma y - B\Sigma x}{n} = \frac{-0,097 - (-0,08I)\,62}{7} = 0,7$$

Цифровое выражение полученной зависимости будет

$$y = 0,7 - 0,08Ix$$

Зная, что начальная концентрация пестицидов 5 мг/л, по полу-

ченной формуле определяем, через какой промежуток времени его концентрация уменьшается на 95% - до 0,25 мг/л.

$lg\,0{,}25 = 0{,}7 - 0{,}08Ix$, $x = \tau_{95} = 16{,}07$ (сут).

Опыты на дафниях. В качестве тест-объекта для проведения токсикологических испытаний используются дафнии (Daphnia magna).

Опыт ставят на генетически однородных синхронизированных во времени особях. Кормление рачков осуществляется два раза в сутки суспензией из водорослей и дрожжей. Количество вносимого корма контролируется по степени заполнения кишечника. Для контроля должны быть взяты организмы из той же партии, что и для опыта. Важным условием является правильное определение объема воды, необходимого для опыта. Нужно исходить из расчета 50 мл раствора на одну взрослую особь.

Для оценки действия пестицида ставят кратковременные опыты длительностью 48 ч.

Как показывает практика, для проведения экспериментальных работ наиболее удобны растворы пестицида с концентрацией, кратной 10 (например, 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0). Опыты ставятся в трехкратной повторности в сосудах на 0,5 л, в которые помещают по 10 экз рачков. Через 48 ч определяют $ЛК_{50}$. При изучении токсичности байдетона на дафниях при 48-часовой экспозиции были получены следующие результаты:

Концентрация	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	5	10
% гибели	0	0	30	50	70	100	100

Для расчета $ЛК_{50}$ составляем таблицу (табл. 19).

Таблица 19

Данные для расчета $ЛК_{50}$ в опытах на дафниях

Концентрация, мг/л	% гибели	x	y	B	xB	x^2B	yB	xyB
0,01	0	–	–	–	–	–	–	–
0,05	0	1	3,04	1,0	1,0	1,4	3,04	3,04
0,1	30	2	4,48	4,5	9,0	18,0	22,40	44,80
0,5	50	3	5,0	5,0	15,0	45,0	25,00	75,00
1,0	70	4	5,52	4,5	18,0	72,0	24,84	99,36

Концентрация, мг/л	% гибели	x	y	B	xB	x^2B	yB	xyB
5,0	I00	5	6,96	I,0	5,0	25,0	6,96	34,80
I0,0	I00	–	–	–	–	–	–	–
				Σ16,0	48,0	I6I,0	82,24	257,0

Примечание. x – место данной концентрации в шкале испытуемых концентраций; y – % гибели, выраженный в пробитах (табл.20); B – весовой коэффициент пробита, определяемый по табл.2I.

В нашем эксперименте в каждом модельном водоеме находилось по I0 дафний, следовательно, пробит для 0% = 3,04 и для I00%= = 6,96 (см. табл.22).

Зависимость между концентрациями и пробитами выражается уравнением $y = A_0 + A_I x_0$. Коэффициенты A_0 и $A_I x$ находим по системе уравнений

$$\begin{cases} A_0 \Sigma B + A_I \Sigma xB = \Sigma yB \\ A_0 \Sigma xB + A_I \Sigma x^2B = xyB \end{cases}$$

$$A_0 = \left[\Sigma yB - A_I \Sigma xB \right] / \Sigma B$$

A_I определяем по уравнению.

$$\frac{\Sigma xB}{\Sigma B} (\Sigma yB - A_I \Sigma xB) + A_I \Sigma x^2B = \Sigma xyB.$$

В нашем случае:

$$\frac{48}{I6} (82,24 - A_I 48) + A_I I6I,0 = 257,0, \quad A_I = 0,604.$$

$$A_0 = \frac{82,24 - 0,60 \cdot 48}{I6} = 3,34.$$

Поскольку 50% гибели дафний соответствует пробит 5,

$$5 = 3,34 + 0,60x; \quad x = 2,76.$$

Далее переводим найденное место на шкале испытуемых концетраций в концентрацию, соответствующую $ЛК_{50}$

$$ЛК_{50} = 0,I + (0,5 - 0,I)\, 0,76 = 0,404$$

$$ЛК_{50} = 0,40 \text{ мг/л}.$$

Опыты на рыбах. При выполнении работ по оценке действия пестицидов на ихтиофауну эксперименты проводят на годовиках карпа или других представителях ихтиофауны (см.раздел I0).

Затравка рыбы весом I4–I8 г после I0–I2-дневной адаптации

Таблица 20

Пробиты в зависимости от % гибели подопытных животных (Беленький, 1963)

%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,35	3,36	3,44	3,52	3,60	3,36
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,20	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,62	4,67	4,67	4,70	4,72
40	4,75	4,77	4,88	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,98
50	5,00	5,02	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,30	5,33	5,36	5,38	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,53	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,05	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,40	6,48	6,56	6,64	6,74	6,89	7,05	7,33

Таблица 21

Весовые коэффициенты пробитов

Пробит	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
3	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,3	2,6	2,9	3,2
4	3,5	3,7	3,9	4,1	4,3	4,5	4,6	4,7	4,8	4,9
5	5,0	4,9	4,8	4,7	4,6	4,5	4,3	4,1	3,9	3,7
6	3,5	3,2	2,9	2,6	2,3	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2

Таблица 22

Пробиты для эффектов, равных 0 и 100%

Число особей в группе, экз	Пробиты для эффектов, %	
	0	100
4	3,47	6,53
5	3,36	6,64
6	3,27	6,73
7	3,20	6,80
8	3,13	6,87
9	3,09	6,91
10	3,04	6,96

осуществляется в аквариумах, где соотношение воды и ихтиомассы должно быть 1,5–3,0 г/л, содержание растворенного кислорода 8–11 мг/л, pH 6,8–7,6 и температура 16–18°С. Продолжительность экспозиции 96 ч при трехкратной повторности.

Расчет $ЛК_{50}$ для рыбы производится так же, как и для дафний. Результаты, полученные при затравке сеголеток карпа байлетоном приведены в табл. 23.

Таблица 23

Данные для расчета $ЛК_{50}$ в опытах на рыбах

Концентрация, мг/л	% гибели	x	y	B	xB	x^2B	yB	xyB
9	–	–	–	–	–	–	–	–
I0	0	I	2,95	I,0	I,0	I,0	2,95	2,95
II	6,6	2	3,52	2,0	4,0	8,0	7,04	I4,08
I2	20	3	4,I6	3,9	II,7	35,I	I6,22	48,67
I3	26,6	4	4,39	4,3	I7,2	I68,8	I88,7	75,50
I4	60	5	5,25	4,7	23,5	II7,5	24,67	I23,37
I5	80	6	5,84	3,9	23,4	I40,4	22,77	I36,65
I6	I00	7	7,05	I,0	7,0	49	7,05	49,35
				20,8	87,8	4I9,80	99,57	450,57

Определяем $ЛК_{50}$:

$$\frac{87,8}{20,8}(99,57 - A_I\ 87,8) + 4I9,80\ A_I = 490,57;$$

$$420,3 + 370,6\ A_I + 4I9,80\ A_I = 450,57;\quad A_I = 0,62;$$

$$A_0 = \frac{99,57 - 0,62 \cdot 87,8}{20,8} = 2,I7;$$

$$5 = 2,I7 + 0,62x;\quad X = 4,56;$$

$$ЛК_{50} = I3 + (I \cdot 0,56) = I3,56 (мг/л).$$

Расчет ОБУВ. Формулы для расчета ОБУВ получены на ЭВМ ЕС -I022 путем статистической обработки данных по ПДК пестицидов с использованием метода множественного регрессионного анализа. Установлены эмпирические коэффициенты корреляции между ПДК пестицидов и $ЛК_{50}$ для дафний и рыб, стабильностью в воде и некоторыми физико-химическими константами:

(I) ОБУВ (мг/л) = $8,29 \cdot I0^{-5} + 0,267 \cdot м^{-I} + I,I \cdot ЛК_{50}^{-I}$ дафний $\cdot\ I0^{-5} +$ $+ 7 \cdot ЛК_{50}^{-I}$ рыб $\cdot\ I0^{-7}$;

(2) ОБУВ (мг/л) = $9,3 \cdot I0^{-4} + 7,3 \cdot I0^{-3} \cdot \ell n ЛК_{50}$ дафний $\cdot\ м^{-I}$;

(3) ОБУВ (мг/л) = $4,26 \cdot I0^{-2} - I,76 \cdot I0^{-2} \cdot t_{пл}^{-I} + I6,356 \cdot м^{-I}$;

(4) ОБУВ (мг/л) = $I,73 \cdot I0^{-5} \cdot t_{кип.} + 0,78 \cdot м^{-I} - 3,74 \cdot I0^{-3}$;

(5) ОБУВ (мг/л) = $I,37 \cdot I0^{-5} + 2,I8 \cdot I0^{-2} \cdot \varphi_{95} - 7,6 \cdot I0^{-6} \cdot ЛК_{50}$ дафний $+ 4,5 \cdot I0^{-6} \cdot ЛК_{50}^{-I}$ рыб;

(6) ОБУВ (мг/л) = $6,6 \cdot I0^{-4} + I,0I \cdot I0^{-5} \cdot ЛК_{50}^{-I}$ дафний $+ 2,2 \cdot I0^{-6} \cdot$ $\cdot\ ЛК_{50}$ рыб.

Пример расчета ОБУВ дан в табл. 24.

Таблица 24

Пример расчета ОБУВ

Название пестицида	Расчетные формулы					Средняя величина ОБУВ, мг/л
	I	2	3	5	6	
Байлетон	0,002	0,0009	0,001	0,001	0,001	0,0012

Установленная таким образом ОБУВ вполне соответствует определенной ранее по полной схеме и утвержденной Главрыбводом ПДК для этого же препарата, равной 0,0014 мг/л.

Список использованной литературы

Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. -Л.: Изд-во медицинской литературы, 1963. -137 с.

Бенинг А.Л. Кладоцера Кавказа. -Тбилиси:Тбилисский университет, 1941. -80 с.

Бугаева Л.Н., Пузикова Н.Б. Методика определения влияния токсических веществ на хирономид. - Известия ГосНИОРХ, 1974, т.98, с.28-35.

Гейровский Я., Кута Я. Основы полярографии.-М.: Мир, 1965. -250 с.

Голубков Э.Г. Paramecium caundatum Ehrenberg как токсикологический тест-объект. -Гидробиологический журнал, 1978,т.14, № 2, с.95-99.

Горюнова С.В. Техника применения метода люминесцентной микроскопии для гидробиологических исследований. - В кн.:Жизнь пресных вод СССР. Т.IУ, Ч.I. М.-Л., 1956, с.272-278.

Гусева К.А. Методы эколого-физиологического исследования водорослей. - В кн.: Жизнь пресных вод СССР. Т.IУ. Ч.I.М. -Л., 1956, с.122-159.

Жадин В.И. Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. -М.--Л.: Изд-во АН СССР, 1950. -180 с.

Константинов А.С. Биология хирономид и их разведение. -Труды Саратовского отделения ВНИОРХ, 1958, т.5, с.5-45.

Кокуричева М.П. О применении гистологического изучения органов и тканей рыб в водной токсикологии. -Известия ГосНИОРХ, 1974, т.98, с.112-125.

Ланге Н.О., Дмитриева Е.Н. Методика эколого-морфологических исследований развития молоди рыб. - В кн.:Исследования размножения и развития рыб. -М., 1981, с.67-77.

Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. -М.: Химия, 1971. -280 с.

Мажейкайсте С.И. Класс ресничные инфузории Ciliata - В кн.: Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР. -Л., 1977, с.46-97.

Мануйлова Е.Ф. Ветвистоусые рачки (Cladocera) фауны СССР. -М.-Л.: Наука, 1964. -180 с.

Мешков М.М., Лебедева О.А. Дифференцировка адаптаций в раннем онтогенезе рыб и ее влияние на численность потомства. - В кн.: Лимнология Северо-Запада СССР. Т.2, Таллин, 1973, с.50-65.

Патин С.А. Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность Мирового океана. -М.: Пищевая промышленность, 1979. -304 с.

Патин С.А., Ткаченко В.Н. Радиоуглеродный метод в токсикологических исследованиях морского и пресноводного фитопланктона. - Труды ГосНИОРХ, 1974, т.98, с.141-143.

Полянский Ю.И. Температурные адаптации у инфузорий. -Зоологический журнал, 1957, т.36, вып.11, с.1630-1646.

Пырина И.Л.,Елизарова В.А. Спектрофотометрическое определение хлорофиллов в культурах некоторых водорослей. Труды Ин-та биологии внутренних вод, 1971, вып.21/24, с.56-65.

Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. -Л.: Наука, 1974, -194 с.

Строганов Н.С. Методика определения токсичности водной среды.-В кн.: Методика биологических исследований по водной токсикологии. -М.: Наука, 1971, с.14-60.

Строганов Н.С., Бузинова Н.С. Гидрохимия. -М.: Изд-во МГУ, 1980.

Штина Э.А. Значение и перспективы использования культурального метода в систематике водорослей. -В кн.: Проблемы современной ботаники. Т.1. М.-Л., 1965, с.25-40.

Щербаков Ю.А., Чемова Н.Г. Патоморфологический метод исследования при отравлении рыб. -Известия ГосНИОРХ, 1974, т.98, с.138-155.

Скадовский С.Н. Экологическая физиология водных организмов.-М.: Советская наука, 1955, -338 с.

Содержание

Стр.
I. Основные положения разработки ПДК загрязняющих веществ для воды рыбохозяйственных водоемов 3
2. Оценка устойчивости и динамики изменения токсичности загрязняющих веществ в растворах 8
3. Влияние загрязняющих веществ на процессы самоочищения II
4. Опыты на одноклеточных водорослях I5
5. Опыты на элодее 26
6. Опыты на парамециях 30
7. Опыты на дафниях 34
8. Опыты на хирономидах 49
9. Опыты на прудовике обыкновенном 54
I0. Опыты на рыбах 6I
II. Опыты на эмбрионах рыб 72
I2. Расчетный метод обоснования ориентировочного безопасного уровня воздействия (ОБУВ) пестицидов 79
Список использованной литературы 86

Методические рекомендации
по установлению предельно допустимых
концентраций загрязняющих веществ для
воды рыбохозяйственных водоемов

Редактор Е.П.Яковлева

Отдел научно-технической информации ВНИРО

дп. к печ. 20/У 1986 г. Заказ 223
ьем 5,5 п.л. Формат 60x84 1/16 Цена 1 р. 10 к. Тираж 320

Ротапринт ВНИРО
107140 Москва, Верхняя Красносельская, 17