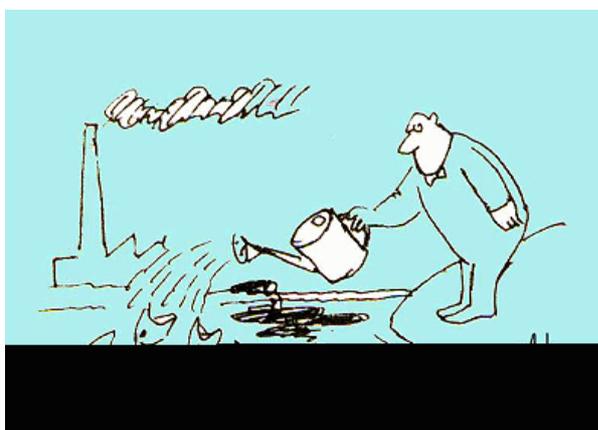


А.Г. Бубнов, С.А. Буймова, А.А. Гуцин, Т.В. Извекова

БИОТЕСТОВЫЙ АНАЛИЗ – ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Учебно-методическое пособие



Иваново

2007

Федеральное агентство по образованию

Государственное образовательное учреждение

высшего профессионального образования

Ивановский государственный химико-технологический университет

А.Г. Бубнов, С.А. Буймова, А.А. Гушин, Т.В. Извекова

**БИОТЕСТОВЫЙ АНАЛИЗ – ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТОД
ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Учебно-методическое пособие

Иваново 2007

УДК [502.51(282.02):556.3.01]:574.24

Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды: учебно-методическое пособие / А.Г. Бубнов [и др.]; под общ. ред. В.И. Гриневича; ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т. - Иваново, 2007. - 112 с. ISBN 5-9616-0237-0

Представлены методики биотестирования с использованием различных тест-организмов, включающие процедуры отбора, хранения и подготовки проб воды для анализа, выращивания и проверки чувствительности культуры тест-объектов, построения калибровочных графиков, а также обработки и оценки полученных результатов.

Учебно-методическое пособие предназначено для выполнения научно-исследовательских и исследовательских работ студентов, а также представляет собой основу практикума дисциплин «Экология», «Экологический мониторинг», «Техника защиты окружающей среды» и «Сертификация продукции и услуг по экологическим требованиям», преподаваемых студентам специальностей 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» и 200503 «Стандартизация и сертификация», а также для исследователей и специалистов практиков из специализированных эколого-аналитических лабораторий.

Табл. 8. Ил. 12. Библиограф.: 35 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета ГОУ ВПО Ивановского государственного химико-технологического университета

Рецензенты: доктор химических наук А.М. Колкер (Институт химии растворов РАН); Ивановский филиал ФГУ "Центр лабораторного анализа и технических измерений по ЦФО".

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ИСТОРИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	7
2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	8
3. БИОИНДИКАЦИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	9
3.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОИНДИКАТОРОВ	11
3.2. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ.....	15
3.3. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ.....	17
3.4. ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРОВ	20
4. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОИНДИКАТОРОВ	21
4.1. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОЗДУХА	21
4.2. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ	23
4.3. ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ПОЧВ.....	25
5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ И КОЭФФИЦИЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ИНДИКАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	28
6. БИОТЕСТИРОВАНИЕ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ	35
6.1. ЗАДАЧИ И ПРИЁМЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА СРЕДЫ.....	39
6.2. ТРЕБОВАНИЯ К МЕТОДАМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	41
6.3. МЕСТО БИОТЕСТИРОВАНИЯ И БИОИНДИКАЦИИ В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА	42
6.4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	44
6.5. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ МЕТОДА БИОТЕСТИРОВАНИЯ	49
6.6. ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	50
6.6.1. РАКООБРАЗНЫЕ <i>DAPHNIA MAGNA</i>	51
6.6.2. ПРЕСНОВОДНЫЕ РЫБЫ <i>ROESILLIA RETICULATA</i> PETERS	59
6.6.3. ПРОСТЕЙШИЕ <i>PARAMESCIUM CAUDATUM</i>	62

7. МЕТОДИКИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.....	68
7.1. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ, ПОДГОТОВКА ПРОБ ВОДЫ.....	68
7.2. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ DAPHNIA MAGNA.....	68
7.3. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ ПРЕСНОВОДНЫХ АКВАРИУМНЫХ РЫБ ROESILLIA RETICULATA PETERS (ГУППИ).....	75
7.4. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ PARAMESCIUM CAUDATUM	81
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Устройство и принцип работы прибора «Биотестер».....	99
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Алгоритм установления характеристик погрешности методик биотестирования.....	104
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Установление средней эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки), бурового раствора.....	110

ВВЕДЕНИЕ

Многообразные загрязняющие вещества (ЗВ), попадая в окружающую среду (ОС), могут претерпевать в ней различные изменения, усиливая при этом свое токсическое действие [1]. Это приводит к необходимости разработки комплексных, интегральных методов контроля качества ряда объектов окружающей природной среды (ОПС), в том числе воды, почвы и воздуха, позволяющих оценить их качество и возможную опасность различных источников загрязнения.

Традиционная эколого-гигиеническая оценка химического загрязнения водных объектов (поверхностных и подземных водоисточников, питьевой воды, сточных вод и др.), основанная на санитарно-химических анализах, нашедшая широкое применение в практике надзорных служб и при производственном контроле, полностью себя оправдывающая, тем не менее, не даёт полного представления о биологической опасности воды того или иного водного объекта [2]. Это связано с тем, что в силу технических и финансовых причин в воде контролируется и определяется только часть вероятных тех или иных загрязнителей. Многие химические вещества, присутствующие в водных объектах, особенно в местах размещения химических, металлургических, машиностроительных и др. предприятий, остаются не идентифицированными. В то же время поверхностные и подземные воды могут загрязняться вредными веществами вследствие миграции их из атмосферного воздуха, талых вод, почвы, производственных отходов, а также при сбросе сточных вод [3].

В связи с этим представляется необходимым иметь данные о возможном неблагоприятном токсическом действии как обнаруженных, так и неидентифицированных вредных веществ, присутствующих в водных объектах. С этой целью распространяется практика биотестирования воды на тест-объектах для характеристики и оценки её токсического эффекта [2]. Наиболее эффективными инструментами аналитического контроля при этом являются методы **биотестирования** и **биоиндикации** [4].

Чтобы в дальнейшем различать очень близкие по целям применения и смысловому использованию понятия, необходимо пояснить значения терминов «биоиндикация» и «биотестирование».

Биоиндикация (*bioindication*) — обнаружение и определение экологически значимых природных и антропогенных нагрузок на основе реакций на них живых организмов непосредственно в среде их обитания. Биологические индикаторы обладают признаками, свойственными системе или процессу, на основании которых производится качественная или количественная оценка тенденций изменений, определение или оценочная классификация состояния экологических систем, процессов и явлений. В настоящее время можно считать общепринятым, что основным индикатором устойчивого развития в конечном итоге является качество среды обитания.

Биотестирование (*bioassay*) — процедура установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Для оценки параметров среды используются стандартизованные реакции живых организмов (отдельных органов, тканей, клеток или молекул). В организме, пребывающем контрольное время в условиях загрязнения, происходят изменения физиологических, биохимических, генетических, морфологических или иммунных систем. Объект извлекается из среды обитания, и в лабораторных условиях проводится необходимый анализ. Живой организм может тестироваться также в специальных камерах или на стендах, где создаются условия изучаемого загрязнения (что очень важно для выявления реакций организма на то или иное доминирующее загрязнение или целый комплекс известных загрязняющих веществ на данной территории обитания).

Хотя подходы очень близки по конечной цели исследований, надо помнить, что биотестирование осуществляется на уровне молекулы, клетки или организма и характеризует возможные последствия загрязнения окружающей среды для биоты, а биоиндикация — на уровне организма, популяции и сообщества и характеризует, как правило, результат загрязнения. Живые объекты — открытые системы, через которые идет поток энергии и круговорот веществ. Все они в той или иной мере пригодны для целей биомониторинга.

1. ИСТОРИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Биотестирование как способ оценки качества воды вошел в практику в начале XX в., когда для токсикологической характеристики широко использовали «рыбную пробу». Первые биотесты на дафниях и циклопах были выполнены в 1918 г. В дальнейшем основным тест-объектом длительное время служила *Daphnia Magna*. С конца 1930-х годов в качестве тест-объектов стали использовать гидробионты разного систематического уровня и с разными трофическими связями. В 1940 – 1941 гг. в систему испытаний включили простейших, ракообразных, червей и рыб. За биологические показатели оценки качества воды были приняты выживаемость, репродуктивность (размножение), выживаемость нарождающейся молодежи, дыхательный и сердечный ритмы, потребление кислорода, выделение углекислого газа и аммиака как конечных продуктов обмена, дыхательный коэффициент, темп роста и питания, кормовой коэффициент, увеличение массы и др. [7].

В средние века был известен метод биотестирования, основанный на использовании канареек для индикации появления рудничного газа в горных выработках. Поведение птицы или её гибель оповещали шахтеров о грозящей им опасности.

Исследования в области разработки и использования метода биотестирования в водоохранной практике проводились во многих научно-исследовательских и учебных институтах [8]. В 1980 г. была признана необходимость применения биотестирования как показателя оперативной интегральной диагностики качества вод. В 1981 – 1986 гг. методики биотестирования были апробированы и рекомендованы для определения токсичности сточных и природных вод. По итогам апробации Всесоюзным научно-исследовательским институтом по охране вод (ВНИИВО) – головным институтом по разработке и использованию методов определения токсичности вод в 1990 г. было подготовлено и утверждено Государственным комитетом СССР по охране природы «Методическое руководство по биотестированию

воды» (РД 118-02-90) [9]. В этот документ вошли методики с использованием тест-объектов – представителей основных трофических звеньев водной экосистемы: водорослей, ракообразных и рыб. Позднее, для целей государственного экологического контроля Минприроды России, а затем Госкомэкологией России были подготовлены и утверждены методики для определения токсичности воды с использованием в качестве тест-объектов инфузорий и ракообразных (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.3-99; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.4-99) и для определения токсичности вод, почв и донных отложений – методика биотестирования по ферментативной активности бактерий (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1-96, 16.2:2:3:1.2-96). ПНД Ф Т – федеральный природоохранный нормативный документ, регламентирующий токсикологические методы контроля [4, 8].

В настоящее время биотесты введены в стандарты на качество воды во многих странах мира.

2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

При использовании методов биотестирования оперируют рядом понятий и определений: под **тест-объектом** понимают живой организм, используемый в биотестировании [4]. При выборе таких организмов приходится соблюдать определенные требования, среди которых возможность фиксировать четкий, воспроизводимый и объективный отклик на воздействие внешних факторов, чувствительность этого отклика на малые содержания поллютантов и др. [1].

Показатель жизнедеятельности водного организма – морфологическая, физиологическая, биохимическая или другая характеристика состояния водного организма.

Тест-реакция (функция) – изменение (ответ) какого-либо показателя тест-объекта под воздействием токсичных веществ, содержащихся в ОПС (воде, почве и воздухе).

Тест-параметр – количественное выражение тест-реакции.

Критерий токсичности – значение тест-параметра или правило, на ос-

новании которого делают вывод о токсичности исследуемой среды [4].

Измерительная система (прибор) – дает количественную величину ответной реакции тест-объекта на воздействие внешних факторов.

Концентрация средняя летальная (ЛК₅₀) – концентрация токсического вещества, вызывающая гибель 50 % тест-объекта при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений.

Концентрация средняя эффективная (ЭК₅₀) – концентрация токсического вещества, вызывающая изменение тест-реакции на 50 % при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений.

Воспроизводимость результатов биотестирования – характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, но в различных условиях (разными операторами или в разных лабораториях, или в разное время).

Сходимость результатов биотестирования – характеристика качества биотестирования, которая отражает близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, в одинаковых условиях (в одной лаборатории, одним и тем же оператором, в одно и то же время) [8].

3. БИОИНДИКАЦИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Биоиндикацию можно проводить на уровне молекул, клеток, органов (систем органов), организмов, популяций или даже биоценоза. Повышение уровня организации живой природы может приводить к усложнению, неоднозначности взаимосвязи биологического отклика с антропогенными факторами исследуемой среды, поскольку на них могут накладываться и природные факторы. Поэтому в качестве биотестов выбирают наиболее чувствительные к исследуемым загрязнителям организмы [1].

Биоиндикация качества наземных экосистем возможна по различным видам и сообществам растений и животных. Для гидробиологического анализа качества вод могут быть использованы практически все группы