

4. ТЕХНОЛОГИИ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

4.1 Основы инструментального биотестирования

Биотестирования – определение токсичности с помощью живых организмов – биоиндикаторов (тест-объектов), которые, будучи помещены в загрязненную среду, оперативно сигнализируют об опасном её воздействии на них. Токсичность определяется не по отдельным ЗВ, а по их смесям, часто неизвестной природы и не выявляемые другими методами диагностики. Биотестирование дает возможность определить, до какой степени необходимо снизить содержание ЗВ, чтобы полностью предотвратить или уменьшить последствия загрязнения ОС. Перечисленные возможности биотестирования позволяют определить следующие области его применения:

- токсикологическая оценка качества природных вод;
- мониторинг питьевой воды, водоемов, почв и донных осадков на содержание токсических веществ;
- плановый контроль выпусков сточных вод, а также оценка их влияние на качество воды в контрольных створах;
- корректировка расчетов предельно допустимых сбросов (ПДС) ЗВ с учетом выявленной токсичности сточных вод, сбрасываемых в водоем;
- объективная оценка соответствия условно-чистых вод данной категории;
- оперативный контроль сточных вод, поступающих на биологическую очистку с целью обеспечения нормального функционирования активного ила и своевременного выполнения профилактических мероприятий при аварийных сбросах сточных вод промышленных предприятий;
- контроль сточных вод в точках поступления их в канализацию от предприятий;
- сравнительная оценка токсичности отдельных ингредиентов, входящих в состав поверхностных, грунтовых и сточных вод с целью выявления максимально опасных ЗВ;
- проведение экологической экспертизы новых технологий и материалов, проектов очистных сооружений, реконструкции и технического перевооружения промышленных предприятий;
- экспресс-контроль промышленных отходов предприятий;
- контроль токсичности материалов и лекарственных веществ;
- контроль качества продуктов питания.

Под токсичностью - понимается степень проявления вредного действия ЗВ, которые повреждают, ингибируют, вызывают стрессы и генетические изменения или убивают живые организмы в воде, почве и воздухе. Она определяется по тест-реакциям организмов-биоиндикаторов, культивируемых в искусственно поддерживаемых стандартных условиях при лабораторных экспериментах.

ЗВ могут поступать в среду из естественных и антропогенных источников. Антропогенное загрязнение может быть первичным и вторичным. Первичное загрязнение обусловлено поступлением ЗВ из антропогенных источников. Вто-

ричное загрязнение вызывается появлением в среде избыточного количества продуктов жизнедеятельности и остатков организмов, связанных с нарушением естественных экологических взаимоотношений в результате первичного загрязнения. И то и другое способно вызывать токсический эффект.

Токсичность, устанавливаемая методами биотестирования, является интегральным показателем загрязнения ОС. Как и все интегральные показатели, он имеет тот недостаток, что не раскрывает тип ЗВ, присутствующих в пробе, поэтому результаты биотестирования могут, в отдельных случаях, не совпадать с выводами о загрязненности воды, полученными на основании гидрохимических анализов.

Токсичность может проявляться в острой и хронической форме. При острой токсичности тест-объекты не успевают включить компенсаторные и адаптационные функции организма, и он погибает. **Острая токсичность** определяется в остром опыте, краткосрочной процедуре биотестирования (с установленной в каждой методике временем экспозиции) по 50 % выживаемости тест-объектов. **Хроническая токсичность** проявляется при менее интенсивном, но более длительном воздействии ЗВ; при этом происходит нарушение равновесия между распадом и синтезом веществ в организме, разрушение генома и прекращение репродуктивной функции организмов. Определяется в хроническом опыте (с установленным для каждой методики временем экспозиции, составляющим не менее 1/10 продолжительности жизни испытуемых объектов) - долговременной процедуре биотестирования, по статистически достоверному отклонению от контроля плодовитости тест-объектов. Результаты эксперимента на хроническую токсичность отвечают на вопрос: обеспечит ли сохранность вида изменившаяся под влиянием исследуемых сточных вод плодовитость гидробионтов.

За критерий токсичности принимается достоверное количественное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности воды или вещества.

Тест-реакция это - изменение какого либо морфологического, биохимического, поведенческого или функционального показателя у тест-объекта под воздействием ЗВ.

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

Остро летальная концентрация ЗВ (или кратность разбавления исследуемой воды) - концентрация при которой в 50 % случаев наступает гибель тест-организмов.

Безвредная кратность разбавления - концентрация ЗВ, при которой гибель тест-организмов не превышает гибели в контрольной пробе. Безвредная кратность разбавления определяется в хроническом опыте. Достижение ПДК ЗВ в производственных, городских и каких-либо других сточных водах путем разбавления их чистыми, нормативно-чистыми и другими водами категориче-

ски запрещается, поскольку такой прием ликвидации токсичности сточных вод экономически не оправдан и не может быть обеспечен водными ресурсами.

Специфические эффекты действия малых доз ЗВ - эффекты регистрируемые иногда при лабораторном биотестировании, когда при значительном разбавлении сточных вод (в 30-300 раз) возникает эффект их токсичности, в то время, как при существенно меньших разбавлениях он не наблюдался, а острая токсичность была определена при не большом разбавлении (например, в 3-5 раз). В этих случаях за токсичные следует принимать те разбавления (в нашем случае 3-5 раз) исследуемых вод, в которых токсичность была зарегистрирована.

Стимуляция - положительная т-реакция тест-объектов на воздействие ЗВ (противоположная угнетению). Данные подобного рода сложного интерпретировать. Чтобы дать правильную оценку полученным результатам, следует тщательно проанализировать состав сточных вод. Кроме того, если в методике не оговаривается эффект стимуляции, то необходимо применить для такой воды несколько методов биотестирования и использовать для выводов результаты, полученные на других организмах.

5.2 Нормативно-правовое обеспечение инструментального биотестирования качества окружающей среды (а ГОСТы??)

В настоящее время сформирована самостоятельная система природоохранительной нормативной документации (ПНД) для целей государственного экологического контроля объектов ОС. В рамках этой деятельности подготовлены проекты основополагающих нормативных документов системы, регламентирующие требования и правила формирования блока взаимоувязанных актуализированных природоохранных нормативных документов. С целью обеспечения единства измерений и достоверности аналитической информации в системе государственного надзора, контроля и экологического мониторинга в рамках системы ПНД создан **«Государственный реестр методик количественного химического анализа и оценки состояния объектов окружающей среды допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга»**. Методам, включенным в реестр, присваивается статус национальных стандартов в области охраны окружающей среды.

При осуществлении государственного экотоксикологического контроля допускается использование только тех методик биотестирования, которые внесены в Госреестр или (пока они не внесены в Госреестр) в РД-118-02-90. Требования к внесенным в Госреестр методикам биотестирования таковы:

- методики должны быть изложены в соответствии с ГОСТ 8.010-90 ГСИ. "Методики выполнения измерений", с 1 июля 1997 г. в соответствии с требованиями I Р.8.563-96 ГСИ. "Методики выполнения измерений";

- должны содержать свидетельство о метрологической аттестации, проведения в соответствии с требованиями ГОСТ 8.505-84 "Метрологическая аттестация методик выполнения измерений содержаний компонентов проб веществ и материалов"*,

* Метрологическая аттестация проводится при участии центров по аккредитации экоаналитических лабораторий Уральского НИИ метрологии (620219, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, д. 4, тел. (3432 20-39), ВНИИ

Методики, вносимые в Госреестр, относятся к категории федеральных природоохранных нормативных документов — ПНД Ф. Регистрационный номер методики в Госреестре состоит из номера комплекса системы ПНД, номера группы ПНД, порядкового номера государственной регистрации и двух последних цифр года утверждения МКХА. Обозначение методики вод - 14 — номер комплекса системы ПНД (для охраны поверхностных вод, включая методики анализа); номера группы ПНД (1 — сточные, 2 — поверхностные воды, 3 — подземные воды, 4 — питьевые воды). символом Т перед номером системы ПНД отмечены токсикологические методы контроля. Символами СБ отмечены санитарно-биологические методы контроля.

Например, ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1-96, 16.2:2.2.1-96. Методика допущена для целей государственного экологического контроля вод (сточных, поверхностных, подземных, питьевых), почв, донных осадков.

Предлагаемые методы биотестирования построены на одних и тех же принципах - стандартизована процедура биотестирования, культивирования тест-организмов, поскольку в Госреестр включено еще явно недостаточное число методик биотестирования, для использования при осуществлении государственного и производственного экологического контроля качества природных и сточных вод допускаются методы биотестирования, изложенные в нормативном документе "Методическое руководство, по биотестированию воды. РД 118-02-90" (Госкомитет СССР по охране природы, М., 1990). Данное руководство является нормативным документом как для природоохранных органов, так и для водопользователей. В качестве биотестов предлагается по данному РД использовать гидробионты различных систематических групп: водоросли — *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*; беспозвоночные — *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*; рыбы — *Poecilia reticulata* Peters, *Brachy-danio rerio* Hamilton-Buchanan. Включенные в РД 118-02-90 методы допускаются для использования до внесения их в Госреестр.

Методы биотестирования, рекомендованные для государственного экологического контроля приведены в табл. 5.1.

Результаты биотестирования, какой бы методикой они не были получены, должны сопровождаться результатами гидрхимических анализов качества исследуемой воды, не считая обязательно представляемых данных о температуре, содержании растворенного кислорода и рН, измеряемых в процессе биотестирования.

С помощью гидробиологического анализа подобных организмов активного ила производится оценка эффективности работы очистных сооружений.

Таблица 5.1

**Методы биотестирования, рекомендованные
для государственного экологического контроля**

Метод биотестирования	Тест-организмы	Критерии токсичности	Области применения	Средства измерений
Определение токсичности воды по жизнедеятельности дафний	<i>Daphnia magna</i>	Смертность 50% за 96 ч (острая токсичность). Достоверное снижение плодовитости за 30 сут. в сравнении с контролем (хроническая токсичность)	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые, питьевые воды	
Определение токсичности воды по жизнедеятельности цериодафний	<i>Ceriodaphnia affinis</i>	Смертность 50% за 48 ч (острая токсичность). Достоверное снижение плодовитости за 7 сут. в сравнении с контролем (хроническая токсичность)	То же	
Определение токсичности воды, почв и донных отложений по ферментативной активности бактерий	Леофилизи-рованные мутантные бактерии <i>Escherichia coli</i>	Изменение интенсивности окрашивания исследуемой среды	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые, питьевые воды, водные вытяжки из почвы и донных осадков	Комплект "Тоху-kit"
Определение токсичности воды по ингибированию темпа роста водорослей	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Изменение численности клеток водорослей за 96 ч экспозиции (острая токсичность). Изменение численности водорослей за 14 сут. (хроническая токсичность)	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные воды	
Определение токсичности воды по жизнедеятельности дафний	<i>Daphnia magna</i>	Смертность 50% за 96 ч (острая токсичность). Достоверное снижение плодовитости за 30 суток в сравнении с контролем (хроническая токсичность)	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые, питьевые воды	—

Метод биотестирования	Тест-организмы	Критерии токсичности	Области применения	Средства измерений
Определение токсичности воды по жизнедеятельности цериодафний	<i>Ceriodaphnia agginis</i>	Смертность 50 % за 48 ч (острая токсичность). Достоверное снижение плодовитости за 7 суток в сравнении с контролем (хроническая токсичность)	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые, питьевые воды	—
Определение токсичности воды, почв и донных отложений по ферментативной активности бактерий	Лиофимезированные мутантные бактерии <i>Escherichia coli</i>	Изменение окрашивания исследуемой среды	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые, питьевые воды, водные вытяжки из почвы и донных осадков	Комплект "Toxykit"
Определение токсичности воды по ингибированию темпа роста водорослей	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Изменение численности клеток водорослей за 96 ч экспозиции (острая токсичность). Изменение численности водорослей за 14 суток (хроническая токсичность).	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные воды	—
Определение токсичности воды по жизнедеятельности рыб	<i>Poecilia reticulata</i> Peters или <i>Brachydanio rerio</i> Hamilton Buchanan	Смертность 50 % за 96 ч. Достоверное снижение плодовитости за 30 суток экспозиции	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные воды	—
Определение токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий	Инфузории <i>Paramecium Caudatum</i>	Хемотаксическая реакция (хемотаксис)	Поверхностные, природные пресные, сточные и очищенные сточные, грунтовые, питьевые воды, водные вытяжки из почвы и донных осадков	Прибор "Биотестер"

5.3 Технологии инструментального биотестирования

Отбор и хранения проб. При осуществлении токсикологического контроля качества природных и сточных вод требуется, прежде всего, отобрать и подготовить пробы. Пробоподготовка существенно влияет на результаты биотестирования. Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования должна обеспечивать подготовку посуды, пробоотборников, места хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность.

Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемую воду. Посуда для отбора проб не должна адсорбировать ЗВ, изменяя тем самым состав исследуемой воды. Обычно используется посуда из пластика, а при наличии в воде нефти, углеводородов, моющих средств и пестицидов используются банки из темного стекла. Сосуды для отбора проб должны быть четко промаркированы. Посуда для пробоотбора и биотестирования должна быть химически чистой. Она промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью), затем тщательно водопроводной водой, а затем 3—4 раза дистиллированной водой. Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования (за исключением мерной) сушат в сушильном шкафу при 160 °С в течение 1 часа. Не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями.

Химически чистая посуда для биотестирования должна храниться с закрытыми стеклянными притертыми пробками или закручивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

Вся грязная посуда после отбора проб и проведения анализов должна подвергаться стерилизации кипячением в течение 1 часа.

При отборе природных вод допускается отбор разовой пробы. Сточные воды характеризуются непостоянным составом, что зависит от хода технологического процесса на предприятиях, периодически возникающих повышенных объемов используемой воды в бытовых целях и т.д., поэтому однократного взятия пробы для исследования токсичности сточных вод недостаточно.

Программа отбора проб должна быть подготовлена так, чтобы обеспечить их репрезентативность.

Для получения данных, более полно характеризующих исследуемую сточную воду, необходимо анализировать средние пробы, отобрав в течение смены или суток через определенные промежутки времени, как правило, каждый час. Выбор количества необходимых порций делают на статистическом анализе или опыте проведения контроля. Частота отбора проб может быть уменьшена, если есть уверенность в незначительном колебании содержания ЗВ в сточной воде в течение суток.

Допустимое минимальное количество отбираемых проб для следующего смешения — три, с интервалами между отборами не менее часа. При отборе проб, их хранении и транспортировке следует руководствоваться требованиями

используемой методики биотестирования, а также требованиями документов, действующими в системе Государственного экологического контроля.

Объем пробы для исследования на токсичность определен в применяемой методике биотестирования, но он в любом случае должен быть в два раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца процедуры биотестирования.

Для отбора глубинных проб воды из озер, водохранилищ, рек следует использовать батометры системы Молчанова, Рутнера Скадовского-Зернова. Отбор донных осадков производится при помощи дночерпателей облегченных моделей, например, системы Петерсена, Берджа.

Для отбора проб с глубины не более 0,5 м используется с привязанной пробкой, которую помещают в футляр или пробоотборник с грузом. Футляр снабжен петлей, к которой привязывают веревку с отмеченными отрезками, указывающими глубину погружения. На требуемой глубине с помощью привязанной к пробке веревки выдергивают пробку из горла бутылки. После заполнения бутылки водой (на поверхности вод являются пузырьки воздуха) ее поднимают на поверхность.

Пробы питьевой и сточной воды отбираются пробоотборником объемом 500—700 см³. Пробы питьевой воды отбираются из-под крана после 5-минутного шва, кран антисептической обработке не подвергается. Активный хлор, используемый для обеззараживания питьевой воды, является токсичным веществом, поэтому перед биотестированием его следует удалить отстаиванием не менее 12 часов.

Отбор природных вод следует производить в местах наибольшего перемешивания с глубины 0,5 м.

Отбор проб сточной воды производится из коллектора в местах, обеспечивающих интенсивное перемешивание всего потока там, где твердые частицы равномерно распределены. Если вода стекает через водослив, пробу можно брать непосредственно из падающей струи. Разнообразие условий спусков сточных вод от разных предприятий и очистных сооружений довольно велико, поэтому в каждом конкретном случае отбор проб следует производить, сообразуясь с местными условиями.

На очистных сооружениях отбирать пробы следует до системы хлорирования. Если необходимо проанализировать качество сточных вод после хлорирования, свободный хлор следует предварительно удалить отстаиванием пробы с открытой крышкой при температуре от +2° до +4 °С не менее, чем 12 часов.

При взятии проб измеряют температуру воды. Для этого используются термометры с ценой деления 0,1 °С. Для определения температуры на месте взятия пробы 1 дм³ воды наливают в склянку, нижнюю часть термометра погружают в воду и через 5 мин отсчитывают показания, держа его вместе со склянкой на уровне глаз. Точность определения ±0,5 °С.

При отборе пробы составляется протокол по утвержденной форме, в котором указывается цель пробоотбора, число, время, место отбора пробы, температура воды, предполагаемые загрязняющие вещества, номер пробы, Ф.И.О. отбиравшего. На бутылку наклеивается этикетка с указанием номера пробы, места и даты отбора.

Отобранные пробы наливают, предварительно ополаскивая отбираемой водой, в банки или флаконы. Заполняют их до краев и закрывают без пузырей воздуха пришлифованными стеклянными пробками или полиэтиленовыми крышками. Под полиэтиленовые крышки подкладываются прокладки — тефлоновые или из алюминиевой фольги. Пробы упаковываются в деревянные ящики для переноски проб и прокладываются бумагой или ветошью. Транспортируют пробы, не подвергая их воздействию света.

При отборе проб следует соблюдать технику безопасности. На крупных водотоках и водоемах следует соблюдать навигационные правила и правила эксплуатации используемого судна.

Постоянные места контроля следует выбирать в местах, которые были бы доступны в любое время.

При отборе проб воды со льда необходимо отмечать участки, и толщина льда еще мала. В месте отбора должен находиться деревянный шест или брус.

На очистных сооружениях отбор проб осуществляется в специально предназначенных местах, маркированных и освещаемых в темное время ток.

Отбор проб воды производится бригадой, состоящей минимум из двух человек.

Перед работой бригада должна быть проинструктирована о мерах предосторожности при выполнении программы работ в зависимости от места отбора, климатических условий и т.д.

Необходимо анализировать пробы тотчас же после отбора. При длительном хранении проб в химическом составе воды могут происходить значительные изменения, что может сказаться и на токсичности воды. В связи с тем, что применение химических консервантов недопустимо, биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают $+2+4$ °C. Хранить пробы при данной температуре следует не более 24 часа после отбора. В исключительных случаях допускается замораживание проб (-20 °C) и их хранение до двух недель, однако следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться.

В случае предполагаемого замораживания пробы, при ее отборе следует заполнять сосуды полностью, чтобы избежать их разрыва. Ее пробы требуется оттаивать или фильтровать, то фильтрация и оттаивав должны предшествовать замораживанию.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений необходима фильтрация пробы через обеззоленные фильтры, наиболее пористые белую или красную ленты (недопустимо использовать синюю ленту, так она задерживает коллоидные вещества, что занижает результаты биотестирования).

Природные воды фильтруют через стеклянные фильтры с диаметром пор 3,5 мкм. Для освобождения от крупных примесей вместо процедуры фильтрации пробы допускается ее оттаивание в течении 1 часа с последующим сифонированием жидкости над отстоем. Грунтовые воды предварительной обработке не подвергаются.

При биотестировании почвы или донных отложений необходимо подготовить водную вытяжку, для чего почвы (донные осадки), отобранные с террито-

рий, которые необходимо проконтролировать на токсичность, освобождают от корней, крупных посторонних частиц, гомогенизируют в почвоизмельчителе и помещают в чистую стеклянную посуду. Выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 1 часа и после охлаждения навеску взвешивают. Для биотестирования берут 1 часть высушенной почвы (донных осадков) и 4 части культивационной воды. Встряхивают полученную смесь в течение двух часов на аппарате для встряхивания жидкости, после 30-минутного отстаивания и сифонирования осадочной жидкости она фильтруется через бумажный фильтр (белая, красная ленты).

Проба воды, подлежащая биотестированию, должна иметь рН 6,5— 8,5; если рН пробы выходит за указанные пределы, подкисление осуществляют 10%-ным раствором HCl, подщелачивание — 10%-ным раствором NaOH.

Биоиндикаторы землетрясений и вулканических извержений

Многие растения способны чувствовать малейшие изменения электромагнитного и сейсмического полей Земли и газового состава ее атмосферы.

Изменения напряжений и как следствие дефизикаций в местах тектонических разломов приводит из-за пьезоэффекта к изменению электромагнитного поля Земли. Эти явления, а также сейсмоакустическое и ультразвуковые поля, не ощущаемые человеком, но являющиеся предвестниками землетрясений и вулканических извержений оказывают заметное влияние на растения.

Так цветок королевской примулы, растущий на склонах вулканов острова Ява, распускается только в преддверии извержения вулкана. Данный факт связан с тем, что возникающее накануне извержения ультразвуковое поле ускоряет движение питательных соков по капиллярам и весь процесс обмена веществ растения.

Королевскую примулу в Индонезии, так и называют — «цветок извержений», «цветок разрушения», «цветок смерти». Завидев расцветший цветок этого замечательного растения обитатели деревень, расположенных у подножия вулкана, покидают свои дома и уходят в безопасные места.

Приготовление разбавлений исследуемых вод. Процедура приготовления разбавлений имеет ряд специфических особенностей, которые следует учитывать, чтобы не допускать ошибки как при приготовлении разбавлений, так и в последующих расчетах. В зависимости от используемой методики биотестирования для приготовления разбавлений исследуемых вод используется дистиллированная или культивационная (дехлорированная водопроводная) вода. Перед приготовлением необходимых разбавлений вод для исследования предварительно подготавливают соответствующей емкости посуду, в которой будут готовить растворы. Объем используемой посуды должен на 1/3 превышать необходимый объем приготавливаемого разбавления исследуемых вод.

Перед приготовлением разбавлений нужно подготовить по возможности два одинаковых сосуда: один для разбавления, а другой для хранения раствора (может случиться, что в ближайшие часы процедуру биотестирования в определенном разбавлении необходимо будет повторить). Как во время приготовления разбавлений, так и при их хранении бутылки или другая посуда обязательно должны быть закрыты предварительно подобранными пробками и снабжены надписями о приготовленной концентрации исследуемых вод. Приготовление растворов, разбавлений, проведение биотестирования выполняются при ком-

натной температуре. Температура исследуемой воды должна быть также доведена до комнатной температуры перед приготовлением разбавления.

Практически все методики биотестирования требуют предварительного освобождения сточных вод от крупнодисперсных включений и взвешенных веществ. Для приготовления необходимых разбавлений берут определенные, отмеренные мерной посудой, объемы исследуемой и разбавляющей жидкостей. В качестве мерной посуды для объемов меньше 50 см³ используются пипетки, для объемов более 50 см³ — мерные цилиндры. Сточная вода на выпуске в водоем разбавляется с коэффициентом разбавления 0,3; 0,5 (если не известны ее токсические свойства) и тестируется в первичном испытании при 100; 50; 12; 5; 6; 25; 3,1; 1,5%-ной концентрации сточной воды. Если предварительно известно, что сточная вода очень токсична, а также если это можно предположить по данным гидрохимического исследования, исследуемые концентрации уменьшаются и составляют 10; 3; 0,3. При первичном токсикологическом испытании разбавление сточных вод делается с предлагаемыми коэффициентами разбавления или наугад. При повторном исследовании разбавления готовят исходя из полученных результатов проведенных исследований.

При биотестировании используются два наиболее важных показателя, характеризующих свойства исследуемой воды: кратность разбавления и процентное соотношение в разбавлении. Данные показатели заносятся в акты проведения тестирования.

Пример. Как путем разбавления получить x %-ный раствор воды и рассчитать, во сколько раз разбавлена вода. Величину x будем измерять в долях. Тогда единица соответствует раствору, в котором x - исследуемой воды и $(1 - x)$ - чистой воды. Чистой воды в растворе больше чем грязной в $\frac{1-x}{x}$ раз. Если x измеряется в процентах, то эта величина, называемая степенью разбавления, запишется в виде:

$$\frac{100\% - x\%}{x\%}$$

Итак, если к одной доле сточной воды добавить $\frac{100\% - x\%}{x\%}$ долей чистой воды, мы получим x %-ный раствор. Например, для полученного 5% -ного раствора сточной воды вычислим степень разбавления:

$$\frac{100\% - 5\%}{5\%} = \frac{95\%}{5\%} = 19$$

и получим, что 1 доля сточной воды и 19 долей чистой воды составят при смешении 5%-ный раствор сточной воды. То есть 5%-ный раствор воды получится при ее 19-кратном разбавлении.

Принцип биотестирования на *Ceriodaphnia affinis* отличается большим временем биотестирования до 48 ч при кратковременном и до 7 суток при длительном биотестировании. Кратковременное биотестирование позволяет опре-

делить острое токсическое действие воды на цериодафний по их выживаемости. Критерием токсичности является гибель 50 и более процентов цериодафний за период времени до 48 ч в тестируемой воде по сравнению с контролем. Длительное биотестирование позволяет определять хроническое токсическое действие воды на цериодафний по снижению их выживаемости и плодовитости. Показателем выживаемости служит количество выживших исходных особей в контроле и тестируемой воде, показателем плодовитости — среднее количество молоди, выметанной в течение биотестирования, в пересчете на одну выжившую исходную самку. Критерием токсичности является гибель 20 и более процентов цериодафний или достоверное снижение их плодовитости в тестируемой воде по сравнению с контролем за период времени до 7 суток

Данный метод разработан американскими специалистами Д. И. Маунтом и Т. Дж. Норбергом и адаптирован к условиям биотестирования на территории СССР в Институте биологии внутренних вод АН СССР и Центральной специализированной инспекции Госкомприроды РСФСР. В качестве тест-объекта служит *Ceriodafnia affinis* Lilljeborg. Характеристика тест-объекта- *Ceriodafnia affinis* Lilljeborg, систематическое положение которой приведена ниже.

Систематическое положение, местообитание

Тип	Artropoda
Класс	Crustacea
Отряд	Cladocera
Семейство	Daphniidae
Род	Ceriodaphnia
Вид	Ceriodaphnia affinis Lilljeborg.

Этот вид распространен по всему земному шару. *Ceriodaphnia affinis* населяет преимущественно небольшие, неглубокие озера, пруды, реки с замедленным течением. Встречается реже чем другие виды цериодафний, в основном — на открытых местах или между зарослями тростника и погруженными растениями, над заиленным дном. Обнаружена в каменистых лужах побережий полярных морей.

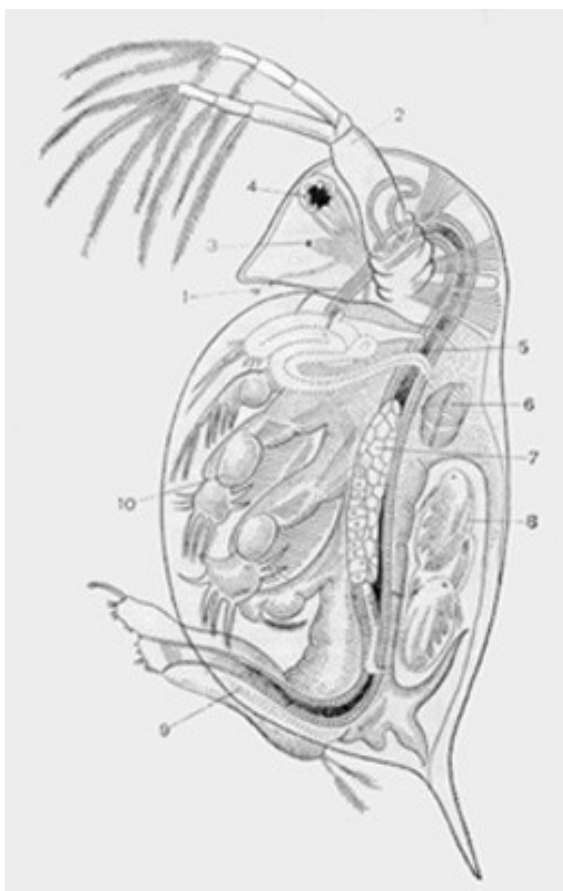


Рис. 5.1. Строение дафнии:

- 1 – передняя антенна;
- 2 – задняя антенна;
- 3 – наупмальный глазок;
- 4 – фасеточный глазок;
- 5 – кишечник;
- 6 – сердце;
- 7 – яичник;
- 8 – эмбрионы в выводковой сумке;
- 9 – брюшко;
- 10 – грудная ножка.

Морфология. Тело цериодафний заключено в прозрачный хитиновый панцирь, створки которого на брюшной стороне не соединены и образуют щель. Тело нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной (абдоминальный) отделы. Впереди под головным отделом находятся две антеннулы, которые более развиты у самцов, вооруженные осязательными щетинками. По бокам головы расположены две задние хорошо развитые антенны, служащие для скачкообразного передвижения рачков в толще воды. В грудном отделе имеется 5 пар грудных ножек, функции которых связаны с фильтрацией воды, питанием и дыханием. Сердце находится на спинной стороне грудного отдела. Половая система представлена парными гонадами: яичниками у самок и семенниками у самцов, которые расположены по обеим сторонам кишечника. Брюшной отдел самки имеет хорошо развитые абдоминальные выросты, один из которых, сильно выступающий, конусовидный является видоспецифическим признаком *C. affinis*. На вогнутой стороне каудального коготка имеются щетинки.

Этот вид цериодафнии моно- или дициклический. Максимум полового периода приходится на август—сентябрь. Эфиппиум с одним покоящимся яйцом. В лабораторных условиях самцы появляются при недостаточном освещении, снижении температуры, концентрации растворенного кислорода и голодании.

Выращивание культуры цериодафнии осуществляют в лабораторных условиях в климатостате, люминостате, боксе или помещении, в котором отсутствуют токсические пары или газы. Оптимальные условия для содержания цериодафнии: температура $25 \pm 2^\circ\text{C}$, освещенность 400—600 лк.

Для культивирования цериодафнии используют дехлорированную, отстоянную водопроводную воду, которая должна удовлетворять следующим требованиям - pH 7,0—8,2, общая жесткость 1,3—2,0 мг-экв/л, содержание растворенного кислорода — не менее 5,0 мг/л.

Рекомендуется содержать культуру цериодафнии в кристаллизаторах объемом 2—3 л, которые заполняют водой наполовину. Используют и другие стеклянные сосуды указанного объема. Требования к чистоте посуды такие же, как и для дафний.

Каждые 7—20 суток культуру цериодафний обновляют. Для этого отбирают 20 половозрелых самок и помещают в сосуды для культивирования, заполненные водой из расчета 50—100 мл на одну особь. При оптимальных условиях содержания цериодафнии выметывают молодь ежедневно или раз в двое суток. Пометы молодых самок состоят из 2—6 особей. Максимальное количество молоди получают от 7—20 дневных самок.

Кормят цериодафний раз в сутки суспензией хлебопекарных дрожжей, раз в неделю—суспензией зеленых водорослей. Для приготовления дрожжевой суспензии 1 г свежих или 0,5 г сухих хлебопекарных дрожжей заливают 100 мл дистиллированной воды. После набухания суспензию тщательно перемешивают, а затем отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в сосуды с цериодафниями из расчета 5 мл суспензии на 1 л воды. Допускается хранить дрожжевую суспензию в холодильнике не более суток.

В качества водорослевого корма для цериодафний рекомендуется использовать хлореллу, культуру которой выращивают на среде Тамия. Для кормления цериодафний водоросли отделяют от питательной среды центрифугированием или отстаиванием в холодильнике в течение 2—3 сут. Надосадочную жидкость сливают, а осадок разбавляют в два раза дистиллированной водой. Водорослевый корм добавляют в культуру цериодафний из расчета 0,5 мл суспензии (600—1000 млн. кл/мл) на 1 л воды. Кроме хлореллы, в качестве корма можно использовать культуру сценедесмус.

Подготовка цериодафний к биотестированию. Для биотестирования используют молодых особей через 0—2 ч после рождения. Допустимо использовать 6—8 часовых особей, но разница в возрасте рачков не должна превышать 4 ч. Чтобы получить одновозрастных цериодафний, из основной культуры отлавливают 10—20 половозрелых самок и помещают по одной в стеклянные сосуды, содержащие по 15 мл воды для культивирования. Раз в сутки цериодафний кормят, добавляя в сосуды по 0,05 мл суспензии хлебопекарных дрожжей.

Выметанную самками одновозрастную молодь изымают из сосудов, часть используют для биотестирования, а оставшуюся удаляют. В начале и конце рабочего дня удаляют молодь и тогда, когда биотестирование не проводят, иначе перенаселение окажет влияние на скорость размножения самок и количество молоди в помете. По мере старения отсаженных самок и сокращения количества молоди в пометах их заменяют более молодыми).

Условия биотестирования. Объем пробы воды для биотестирования—0,5 л. Вначале в воде определяют концентрацию растворенного кислорода. Если она менее 5,0 мг/л, то воду насыщают кислородом до этого уровня с помощью микрокомпрессора. В процессе биотестирования не рекомендуется аэрировать тестируемую воду. Биотестирование проводят в климатостате, люминостате, боксе или помещении, в котором обеспечиваются оптимальная освещенность (400—600 лк) и температура ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Для контроля и приготовления разбавлений используют воду, отвечающую требованиям, описанным в л. 3.2.3.1.

Результаты биотестирования считают правильными, если гибель цериодафний в контроле за весь период наблюдений не превышает 10 % и концентрация растворенного кислорода в тестируемой воде к концу биотестирования составляет не менее 2,0 мг/л.

Процедура биотестирования. Для определения наличия острого токсического действия сточной воды на сбросе в водный объект воду тестируют без разбавления. Если требуется сравнить степень токсичности сточной воды, отобранной из разных мест или в разное время, готовят серию разбавлений (не менее трех).

При биотестировании используют по 10 сосудов для контрольной, тестируемой воды и ее разбавлении. В каждый сосуд соответственно наливают по 15 мл контрольной, тестируемой воды или ее разбавлений и помещают по одной молодой цериодафнии. Цериодафний отлавливают пипеткой с диаметром отверстия 2,0 мм, переносят в сачок из планктонного газа и, погрузив сачок в воду, переводят в нее рачков.

Вначале сажают цериодафний в контрольную, а затем в тестируемую воду. При тестировании серии разбавлении посадку ведут от большего разбавления к меньшему.

Учет выживших цериодафний проводят через 1, 6, 24 и 48 ч от начала биотестирования. Особей считают выжившими, если они свободно передвигаются в толще воды или доплывают со дна сосуда не позднее 15 с после его легкого покачивания. Если в любой учитываемый период времени в сточной воде гибнет 50 и более процентов тест-объектов, биотестирование прекращают. В течение 48 ч цериодафний не кормят.

Для определения наличия хронического токсического действия воды в контрольном и других створах водного объекта воду тестируют без разбавления. Если требуется сравнить степень токсичности разных проб воды или использовать результаты биотестирования при установлении величин ПДС, готовят серию разбавлений. Определяют минимальную кратность разбавления, при которой хроническое токсическое действие не проявляется.

При длительном биотестировании так же, как и при кратковременном, используют по 10 сосудов для контрольной, тестируемой воды и ее разбавлении, в которые наливают по 15 мл каждой воды соответственно. Затем во все сосуды помещают по одной молодой цериодафнии. Раз в сутки рачков кормят суспензией дрожжей, которую вносят в каждый сосуд в количестве 0,05 мл.

Ежесуточно производят смену контрольной и тестируемой воды на свежееотобранную. При смене воды подсчитывают количество выживших исходных цериодафний и выметанной молоди. Исходных цериодафний пересаживают в сосуды, в которых произведена смена воды, а молодь после подсчета удаляют.

После того как в контроле все исходные самки дадут по три последовательных помета, биотестирование заканчивают.

Время биотестирования сокращается, если при промежуточном подсчете устанавливают гибель 20 и более % исходных цериодафний по сравнению с контролем или достоверное отличие от контроля показателя плодовитости.

Обработка и оценка результатов при кратковременном биотестировании сточной воды на сбросе в водный объект рассчитывают процент погибших цериодафний в тестируемой воде по сравнению с контролем. Если гибель цериодафний составляет 50 и более процентов, то тестируемая вода оказывает острое токсическое действие. Если гибель составляет менее 50 %, тестируемая вода не оказывает острого токсического действия на цериодафний.

Для определения степени острого токсического действия тестируемой воды рассчитывают графическим методом :

LKp_{50-48} — кратность разбавления тестируемой воды, при которой гибнет 50 % цериодафний за 48 ч;

ЛКро—48—минимальную краткость разбавления, при которой цериодафнии не гибнут за 48 ч.

Чем больше величины ЛКр₅₀—48 и ЛКро—48, тем токсичнее тестируемая вода.

Степень токсичности можно также установить, рассчитав ЛТ₅₀— время гибели 50 % цериодафний в тестируемой воде. Для этого строят график (на оси абсцисс откладывают время наблюдений, на оси ординат—выживаемость в процентах к контролю). Чем меньше ЛТ₅₀, тем токсичнее тестируемая вода.

Оборудование, материалы, реактивы. Используют обычное лабораторное оборудование, приборы, посуду, материалы, и лупу бинокулярную, стекла часовые, пипетки диаметром 2 мм, грушу резиновую, сачок для отлова цериодафний.

Принцип биотестирования на микроводорослях основан на определении изменения интенсивности размножения водорослей при воздействии токсичных веществ, содержащихся в тестируемой воде, по сравнению с контролем. Показателем интенсивности размножения является коэффициент прироста численности клеток водорослей

Кратковременное биотестирование — 96 ч позволяет определять наличие острого токсического действия тестируемой воды на водоросли, а длительное—14 суток -хронического токсического действия.

Критерием токсичности является достоверное снижение коэффициента прироста численности клеток в тестируемой воде по сравнению с контролем.

В качестве тест-объекта служит культура водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. или *Chlorella vulgaris* Beijer, вид которых приведен на рисунке 5.2.

Рисунок 5.2 - Почвенные зеленые водоросли: 1 – *Chlamydomonas atactogoma*, 2 – *Chlorella vulgaris*, 3 – *Ankistrodesmus falcatus*, 4 – *Gongrosira terricola*, 5 – *Ulothrix tenerrima*, 6 – *Hormidium nitens*, 7 – *Microspora tumidula*.

Систематическое положение тест-объекта Сценедесмус:

Отдел	Chlorophyta
Класс	Euchlorophyceae
Порядок	Chlorococcales
Семейство	Scenedesmaceae
Подсемейство	Scenesmoideae
Род	Scenedesmus Meyen
Вид	Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb

Данный вид относится к ценобиальным организмам. Ценобии 2,4, реже 8, 16-клеточные, в виде плоских пластинок. Клетки удлинено-овальные, с закругленными концами. Краевые клетки имеют два отогнутых наружу рога. Оболочка гладкая. Размеры клеток 7—43х2,5—16 мкм. Размножение автоспорами. Автоспоры в материнской оболочке располагаются пучком, после освобождения разворачиваются в виде пластинки. Иногда (особенно в условиях культуры)

вместо ценобиев обрадуются отдельные клетки. Вид широко распространен в разнообразных биотопах, главным образом в планктоне пресных водоемов.

Систематическое положение тест-объект Хлорелла:

Отдел	Clorophyta
Класс	Euchlorophyceae
Порядок	Chlorococcales
Семейство	Chlorellaceae
Подсемейство	Chlorelloideae
Род	Chlorella Beijer
Вид	Chlorella vulgaris Beijer

Хлорелла относится к одноклеточным водорослям. Клетки шаровидные, с тонкой оболочкой, без слизи. Хроматофор чашевидный, с пиреноидом. Размножение автоспорами, образующимися по 4—8, реже 16 и освобождающимися через разрыв материнской оболочки. Диаметр клеток 4,2—10,5 мкм. Широко распространенный вид.

Водоросли выращивают на искусственной питательной среде Успенского № I, состав которой приведен в таблице 5.2..

Таблица 5.2- Состав питательной среды водорослей

Реактивы	Содержание, г/л	
	в среде для культивирования	в растворах солей для биотестирования
KNO ₃	0,025	50,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,025	50,0
KH ₂ PO ₄	0,025	50,0
K ₂ CO ₃	0,0345	69,0
Ca(NO ₃) ₂	0,1	200,0
Контроль микро-элементов	1 мл	-

* H₃BO₃—2,86; MnCl₂ · 4H₂O — 1,81, ZnSO₄ · 7H₂O—0,222 г/л; MoO₃—17,64; NH₄VO₃ -22,96 мг/л. Раствор микроэлементов вносят в среду после стерилизации, перед посевом.

Питательную среду для культивирования водорослей готовят согласно процедуре подготовки корма для дафний.

Для биотестирования готовят отдельно по 1100 мл раствора каждой соли. Питательную среду, растворы отдельных солей и микроэлементов стерилизуют в автоклаве в течение 45—60 мин при 1 атм. Колбы для культивирования водорослей стерилизуют сухим жаром в течение 1 ч при 180 °С.

Культуру водорослей вносят в стерильную колбу с питательной средой в количестве, дающем светозеленое окрашивание. После посева колбу закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и колпачком из пергаментной бумаги. Культивируют водоросли при круглосуточном освещении лампами дневного света, размещенными на расстоянии 30—40 см от поверхности культуры, освещенность 2000—3000 лк. Водоросли можно выращивать на окне при естественном освещении, защищая их от прямых солнечных лучей. Культуру водорослей

периодически перемешивают, встряхивая 1—2 раза в сутки. Оптимальная температура для выращивания водорослей 18—20 °С.

Условия биотестирования. Для посева используют 5—7-суточную культуру водорослей, находящуюся в стадии экспоненциального роста. Перед биотестированием ее сгущают фильтрованием через мембранный фильтр № 4 или фильтровальную бумагу (синяя лента) с помощью аппарата Зейтца. Клетки можно также сконцентрировать отстаиванием культуры и последующим отсасыванием среды из колбы.

С фильтра водоросли переносят в колбы с 30—50 мл контрольной воды. Проверяют численность суспензии клеток, которую используют для посева. Численность клеток в суспензии должна составлять 5—10 млн. кл/мл.

Для подсчета численности клеток используют счетную камеру Горяева или Фукс-Розенталя. Камеру и относящиеся к ней покровное стекло обезжиривают, покровным стеклом накрывают камеру и притирают его до образования радужных колец интерференции. Из каждой колбы пипеткой наносят по одной капле тщательно перемешанной суспензии на верхний и нижний края покровного стекла. Камеру заполняют так, чтобы не образовывались пузырьки воздуха, избыток суспензии вытесняется по канавкам. Просматривают 16 квадратов по диагонали или все поле камеры в случае малой численности водорослей (при одном заполнении камеры просчитывают не менее 50 клеток). Из каждой колбы просматривают не менее трех проб. Вычисляют по формуле количество клеток водорослей в 1 мл суспензии:

$$M = \frac{m}{nV} 10^3$$

где m — количество подсчитанных клеток; n — количество просчитанных маленьких квадратов камеры, V —объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата.

Биотестирование проводят при оптимальных температуре и освещении.

Объем пробы сточной или природной воды 0,5 л. **При кратковременном биотестировании** сточной воды в колбы емкостью 250 мл наливают по 100 мл контрольной или тестируемой воды. Повторность двукратная. В каждую колбу пипеткой добавляют по 0,5 мл сгущенной культуры водорослей, по 0,1 мл каждого солевого раствора и раствора микроэлементов. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, их содержимое тщательно перемешивают и в каждой колбе определяют исходную численность клеток, которая должна составлять 25 — 50 тыс. кл/мл. Колбы помещают в люминостат или в хорошо освещенное место, защищенное от прямых солнечных лучей. Через 96 ч биотестирование заканчивают. В каждой колбе учитывают численность клеток для определения наличия острого токсического действия сточной воды

При длительном биотестировании воды из контрольного или других створов водного объекта проводят те же операции, что и при кратковременном биотестировании. Первый учет численности клеток водорослей производят через 96 ч от начала биотестирования, чтобы определить наличие острого токсического действия тестируемой воды

При отсутствии острого токсического действия биотестирование продолжают. На седьмые сутки от начала биотестирования производят смену контрольной и тестируемой воды на свежееотобранную. Для этого в новую партию колб емкостью 250 мл наливают по 75 мл контрольной или тестируемой воды из свежееотобранной пробы, в каждую колбу добавляют вышеуказанное количество растворов солей и микроэлементов.

Тщательно перемешивают содержимое колб, в которых проводили биотестирование в течение первых 7 сут. Пипеткой с резиновой грушей отбирают из содержимого каждой колбы по 25 мл, переносят соответственно в свежеприготовленные растворы и перемешивают. Затем в каждой колбе определяют численность клеток и продолжают биотестирование еще в течение 7 сут. Через 14 сут. устанавливают, оказывает ли тестируемая вода хроническое токсическое действие на водоросли.

Обработка и оценка результатов. Для определения наличия острого или хронического действия тестируемой воды на водоросли рассчитывают коэффициент прироста численности клеток водорослей в контроле и тестируемой воде.

$$K = \frac{Ni}{No}$$

где Ni — численность клеток водорослей в контроле или тестируемой воде через учитываемый промежуток времени, кл/мл;

No — исходная численность клеток, кл/мл

При длительном биотестировании No в контрольной и тестируемой воде определяют на седьмые сутки, после того как произведена смена воды

Статистической обработкой данных определяют достоверность различия между коэффициентом прироста численности клеток в контроле и тестируемой воде. Достоверное снижение коэффициента прироста численности клеток в тестируемой воде по сравнению с контролем свидетельствует о наличии острого или хронического токсического действия тестируемой воды на водоросли.

5.4 Требования к помещению, оборудованию, материалам, реактивам, приборам, метрологическому обеспечению

Производственный токсикологический контроль может осуществляться лабораториями, предприятиями или контрактными лабораториями.

Лаборатория или отдел, осуществляющие биотестирование, должны иметь необходимое помещение (отдельную комнату площадью не менее 12 м²) с водопроводом, канализацией и оборудован вытяжкой. Лаборатория должна быть оснащена необходимой для работы аппаратурой, оборудованием и тест-объектами согласно требованиям используемых методик биотестирования. Для выращивания культур цериодафний и дафний необходим термолюминостат (или аналогичное оборудование), обеспечивающий регулируемый режим освещенности и поддержания температуры на заданном уровне. Для выращивания культуры водорослей необходим люминостат (или аналогичное приспособле-

ние) с освещением 2,5-3 тыс. люкс лампами дневного света и поддержанием температуры воздуха 20-22°C.

Отдел (лаборатория) должен быть снабжен холодильником, стереоскопическим микроскопом или лупами, оксиметрами, рН-метрами, термометрами, аналитическими весами, сушильным шкафом, емкостями для воды и необходимой химической посудой в соответствии с требованиями применяемых методик.

Для обеспечения гарантии качества, сопоставимости и законности результатов измерений на токсичность, процедура биотестирования должна быть строго стандартизована. Необходимость стандартизации токсикологических исследований диктуется тем, что методы биотестирования относятся к методам не только качественного, но и полуколичественного и количественного анализа. Результаты токсикологических испытаний используются для исчисления платы за токсичные сбросы, а также для принятия решений по сокращению сбросов загрязняющих веществ, оказывающих токсическое влияние на природные водоемы, и поиска оптимальных производственных и очищающих отходы технологий.

При осуществлении токсикологического контроля методами количественного и полуколичественного анализа следует руководствоваться Законом Российской Федерации "Об обеспечении единства измерений" и установленными требованиями по обеспечению единства измерений, действующими в Системе Государственного комитета Российской Федерации по охране окружающей среды. Они предусматривают необходимость аттестации лабораторий, осуществляющих экоаналитический и токсикологический контроль, государственную метрологическую аттестацию методик, которые допущены для целей государственного экотоксикологического контроля.

Общий порядок аккредитации и аттестации биологических лабораторий, осуществляющих определение токсичности природных, поверхностных пресных, морских, сточных вод, а также водных вытяжек из почвы и донных отложений определен в Руководящем документе "Аттестация СИАК Минприроды России и аккредитация экоаналитических лабораторий" от 30 декабря 1999 г.

Метрологическая аттестация и государственный метрологический надзор за аттестованными методиками по определению токсичное проводится с 1.07.1997 г в соответствии с требованиями ГОСТ Р 8.563-96 "ГСИ. Методики выполнения измерений".

Оборудование, материалы, реактивы. Используется обычное лабораторное оборудование, приборы, посуда и реактивы, в том числе:

- автоклав по ГОСТ 9586—75;
- аппарат Зейтца или другой фильтровальный аппарат;
- дозаторы пипеточные на 0,1 и 0,5 мл П1 по ТУ 64—1—3329—81;
- камера счетная Горяева или Фукс Розенталя по ТУ 64—1—816—77;
- люминюстат;
- микроскоп биологический «Биолам»;
- фильтры мембранные № 4.

Биотестирование на люминисцентном бактериальном тесте основано на новой технологии экологического контроля, предусматривающей исполь-

зование высокочувствительных специализированных микробных биосенсоров "Эколюм", способных реагировать на появление в пробе ЗВ сверхслабым свечением. Сочетание нового биохимического датчика, разработанного на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, с высокочувствительной электронной аппаратурой (люминометрами) было реализовано в приборе "Биотокс-К", принятом на снабжение экологической службы Вооруженных сил РФ. Прибор позволяет обнаруживать с высокой достоверностью, практически исключая ошибочные выводы, чрезвычайно малые количества ЗВ и их смесей в пробе.

В приборе "Биотокс-К" используется простая и надежная технология отбора и предъявления проб, которая совершенно безопасна как для оператора, так и для лиц и предметов, подвергающихся экологической экспертизе.

Работа прибора "Биотокс-К" основана на измерении изменения интенсивности свечения микробного биосенсора "Эколюм" при его взаимодействии с ЗВ в исследуемой пробе. Регистрация сверхслабого свечения люминесцентной реакции осуществляется с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), работающего в режиме счета анодных импульсов.

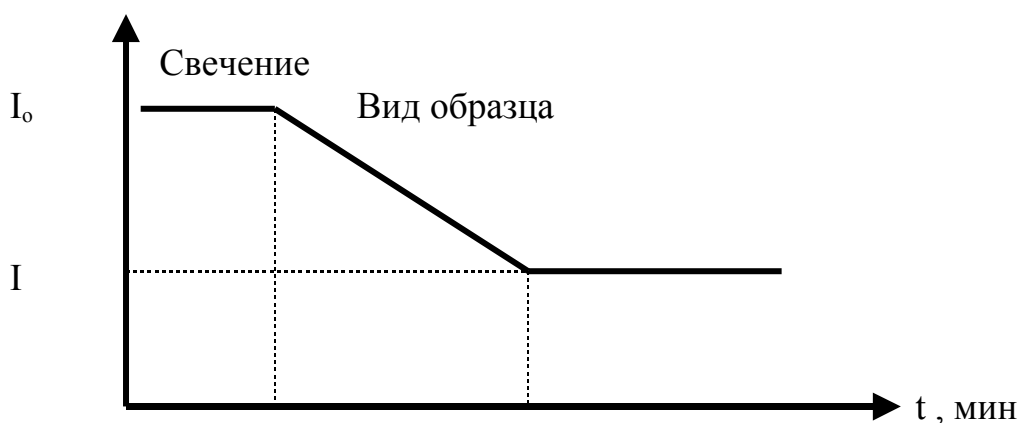


Рисунок 5.3- Изменение интенсивности свечения при введении в реакционную смесь пробы с токсическим соединением.

В результате формируется сигнал в виде последовательности импульсов тока, снимаемых в анода ФЭУ, частота следования которых пропорциональна интенсивности люминесценции. Сигнал с ФЭУ изменяется, обрабатывается с помощью микро ЭВМ и результат выводится на девятиразрядный цифровой индикатор. Прибор может измерять несколько параметров исследуемого раствора.

Индекс токсичности определяется по формуле:

$$\Pi = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100 \%$$

где I_0 – интенсивность свечения контрольного раствора,

I – интенсивность свечения раствора с исследуемой пробы.

Точность вычислений – 0,02 %.

Гамма - функция определяется по формуле:

$$\Gamma = \frac{I_0 - I}{I}$$

Возможный диапазон значений $\Gamma = \pm 4095,96$

Для **слаботоксичных ЗВ** вычисляется **коэффициент ЕС50**, являющийся прогнозом поведения исследуемого ЗВ и показывающим, на сколько более концентрированным может быть исследуемый раствор для достижения индекса токсичности, равного 50%. Для определения коэффициента ЕС50 исследуются 4 пробы, полученные путем смешивания исследуемого ЗВ и контрольного раствора в следующих соотношениях объемов: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8. Для каждой пробы измеряется индекс токсичности, который запоминается в памяти прибора. По данным 4-х измерений прибор автоматически вычисляет прогнозируемый коэффициент ЕС50. Максимальное значение ЕС50 = 126,99.

Для **высокотоксичных ЗВ** вычисляется **коэффициент ЕС20**, показывающий прогноз, на сколько нужно разбавить исследуемый раствор для достижения индекса токсичности, равного 20%. Измерения коэффициента ЕС20 осуществляются аналогично измерению коэффициента ЕС50. Пересечение полученной прямой отыскивается с уровнем $\log_2 0,25 = -3$, соответствующему $\Pi=20\%$. Минимально возможное значение ЕС20=0,01. Показания прибора ЕС20=0 означают, что измеренное значение ЕС20 менее 0,01.

Кроме того, прибор вычисляет **усредненное значение индекса токсичности**, полученное путем усреднения трех значений Π :

$$CP = \frac{\Pi 1 + \Pi 2 + \Pi 3}{3}$$

Классификация степеней токсичности образцов приведена в таблице 5.3.
Таблица 5.3 - Классификация степеней токсичности образцов

Группы	Значение «Т»	Вывод о степени токсичности пробы
1	меньше 20	допустимая степень токсичности
2	от 20 до 49	образец токсичен
3	равно или больше 50	образец сильно токсичен

Определение индекса токсичности по Г-функции можно осуществлять по графику, приведенному на рисунке 5.4.

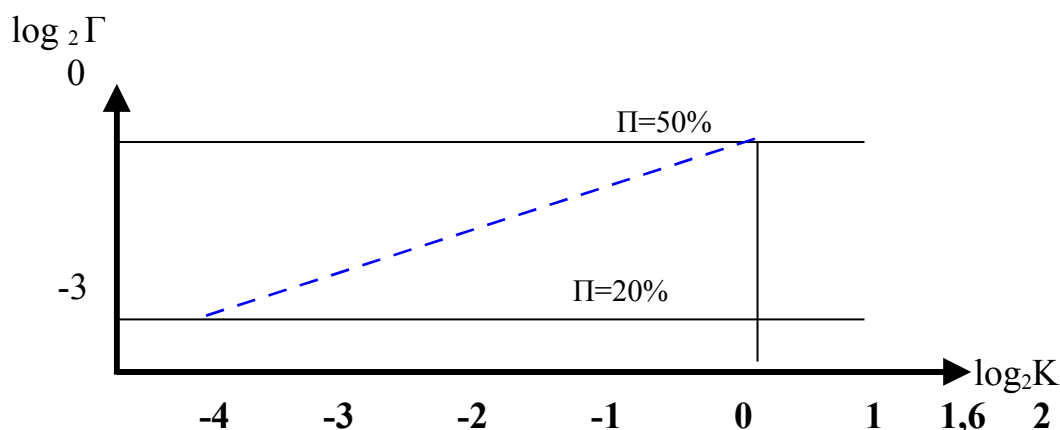


Рисунок 5.4- Вычисление коэффициентов ЕС50, ЕС20: Г - гамма функция;
К – отношение объема контрольного и исследуемого растворов.

Характеристика тест-системы "Эколюм" приведена в таблице 5.4.
Таблица 5.4 -Характеристика тест- системы "Эколюм"

Чувствительность, мг/л, ЕС50, время анализа 5 мин	Анализируемые соединения
8	Тяжелые металлы
2,5	Медь
0,065	Цинк
3,6	Фенолы
4,4	2, 4-дихлорфенол
0,08	2, 4-диметилфенол
1,16	Пентахлорфенол
40,3	Алифатические спирты и кетоны
7,9	2-деканол
0,45	Гексанол
9,8	2-деканон
0,56	Пестициды
1,7	Кельтан
0,2	Диазинон
0,15	Перметрин
8,5	Микотоксины
30	PR-токсин
70	Патулин

Блок – схема люминометра прибора "Биотокс- К" приведена на рисунке 5.5.