

В.В. Александрова

**БИОТЕСТИРОВАНИЕ
КАК СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ
ТОКСИЧНОСТИ ПРИРОДНЫХ
И СТОЧНЫХ ВОД**

Монография



Издательство
Нижевартовского
государственного
университета
2013

ББК 26.22
А 46

Печатается по постановлению редакционно-издательского совета
Нижевартовского государственного университета

Рекомендовано к печати кафедрой экологии
естественно-географического факультета
Нижевартовского государственного университета

Рецензенты:

доктор педагогических наук, профессор, директор НИИ географии,
экологии и природопользования Ленинградского государственного
университета им. А.С.Пушкина *Т.С.Комиссарова*;

кандидат биологических наук, главный специалист отдела
оценки воздействия на окружающую среду и экологического
мониторинга ЗАО «СибНИПИРП» *Р.Н.Костюченко*;

начальник отдела по УП ЗАО «СибНИПИРП» *З.М.Мартirosян*

Александрова В.В.

А 46 **Биотестирование как современный метод оценки токсичности природных и сточных вод:** Монография. — Нижевартовск: Изд-во Нижеварт. гос. ун-та, 2013. — 119 с.

ISBN 978–5–00047–090–9

В монографии анализируются вопросы необходимости внедрения метода биотестирования природных и сточных вод в комплексе с химическим анализом вод. Рассмотрены вопросы интерпретации результатов биотестирования. Оценены достоинства существующей концепции ПДК.

Для научных работников, работников экологических служб, интересующихся вопросами качества окружающей природной среды.

ББК 26.22

ISBN 978–5–00047–090–9

© Александрова В.В., 2013
© Издательство НВГУ, 2013

ВВЕДЕНИЕ

Материалом для монографии послужили результаты экотоксикологических исследований вод озер Самотлорской группы 2002—2004 гг., лабораторные экспериментальные исследования, экотоксикологические исследования сезонной динамики токсичности проб воды реки Обь 2002—2009 гг.

Фактические масштабы химического антропогенного пресса на окружающую среду давно переросли контролируемые возможности традиционного санитарно-гигиенического нормирования. Для осуществления контроля за загрязнением природных вод необходимо надежно определять несколько десятков ионов, веществ, классов соединений

Природные воды являются весьма специфической средой, в которой состояние токсикантов и проявление их химических свойств и биологической активности существенно отличается от более простых экспериментальных моделей, на которых обычно проводятся лабораторные исследования их химических, биологических, токсических и других свойств. Нормальная жизнедеятельность гидробионтов, а следовательно, и уровень их устойчивости к различным повреждающим агентам, в частности, к токсическим веществам, а также степень токсичности различных групп веществ в значительной степени определяются такими абиотическими факторами водной среды, как минерализация, жесткость, рН, соотношение ионов, наличие комплексонов, содержание кислорода, температура и т.д. (Лесников, 1969; Брагинский, Щербань, 1978; Линник, 1986). Устойчивость к воздействию токсикантов у организмов в разных зонах и регионах существенно различаются, что связано, прежде всего, с климатическими особенностями, гидрохимическим режимом, способностью к самоочищению (Хоружая, 2002).

Биотестирование, как правило, проводится в стандартных, оптимальных для тест-объектов условиях, в частности, при биотестировании редко принимается во внимание температурный фактор, существенно влияющий на результаты биотестов (Брагинский, 1981). Также не учитывается характер взаимодействия так называемых фоновых приоритетных загрязнителей. В условиях

постоянной опасности возникновения техногенных катастроф важное значение имеет прогнозирование эффектов комбинированного действия.

Нефтегазовая промышленность является основным источником загрязнения природных ресурсов в Нижневартовском районе. В исследуемом районе основное внимание уделяется охране и мониторингу речных систем, в то же время озера являются основной составной частью гидрографической сети.

Нижневартовским филиалом ФГУ «СИАК по ХМАО» проводятся наблюдения за качеством поверхностных вод на территории района в 7 створах, 2 водотоках по 26 ингредиентам. Нижневартовская Специализированная инспекция Государственного контроля контролирует водотоки, протекающие на территории нефтегазовых месторождений, всего контролируется 253 створа, установленные выше и ниже границ очагов возможного загрязнения, однако на озерах, расположенных на территории месторождений, подобный контроль не осуществляется. Мониторинг химического и токсикологического состояния озерных вод проводится не систематически (Состояние окружающей природной среды и природных ресурсов в Нижневартовском районе, 2003).

Озеро Самотлор является примером водного объекта, подвергающегося значительной антропогенной нагрузке в связи с развитием нефтедобывающей промышленности. В пресных водах Самотлорского месторождения на глубине 180—200 м обнаружено присутствие нефтепродуктов, что может повлиять на качество воды подземного водозабора г.Нижневартовска (Труды Института природопользования, г. Нижневартовск, 1997, Вып. 1).

В исследуемом регионе природный фон концентраций ряда химических веществ и элементов весьма высок и превышает ПДК в несколько раз. Превышение ПДК в течение года отмечается по следующим показателям: углеводороды нефти, аммоний, медь, железо, фенолы. Для данных веществ характерен не только антропогенный путь поступления в окружающую среду, но и естественная циркуляция в водах района исследования (Состояние окружающей природной среды и природных ресурсов в Нижневартовском районе, 2001).

Глава 1. ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГИДРОСФЕРЫ И ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЕГО УРОВНЯ

1.1. Основные группы веществ, загрязняющих водоемы, и их влияние на водные экосистемы

В настоящее время состав природных вод водоемов в значительной степени формируется под влиянием антропогенной нагрузки. На дне аккумулируется большое количество загрязняющих веществ разной природы: тяжелых металлов, органических веществ, нефтепродуктов. Происходит накопление наносов донных отложений в местах стоков промышленных предприятий (Никаноров, Жулидов, 1991; Beurskens, 1994).

Из загрязняющих веществ по объему поступления прежде всего заслуживают внимания тяжелые металлы, углеводороды нефти, полихлорированные бифенилы (ПХБ) и полиароматические углеводороды (ПАУ).

В отличие от органических загрязняющих веществ металлы практически вечны, так как они не разрушаются при воздействии природных факторов. Все тяжелые металлы обладают одним общим свойством: они могут быть биологически активными. Вследствие этого, попадая в результате антропогенной деятельности в окружающую среду в миграционно-активном состоянии, они включаются в той или иной степени в биологический круговорот, и при определенных биогеохимических условиях и концентрациях начинают оказывать токсическое действие на живые организмы (Никаноров, Жулидов, 1991).

Донные отложения водоемов являются активными накопителями металлов (Beurskens, 1994). Благодаря сорбционным процессам происходит самоочищение водоемов от соединений тяжелых металлов. Однако в определенных условиях не исключены процессы десорбции металлов и их переход в растворенном состоянии в толщу воды, т.е. донные отложения превращаются в источники вторичного загрязнения водных объектов (Линник, 1986).

Медь по биологическим функциям в живых организмах является типичным микроэлементом. Интенсивная сорбция меди обуславливает ее высокие концентрации в донных отложениях. Повышенное содержание меди (>1000 мг/кг сухой массы) в донных отложениях часто связано с влиянием сточных вод; незагрязненные осадки содержат меди не более 20 мг/кг.

Цинк относится к числу относительно широко распространенных металлов. Уровни общего содержания цинка в донных отложениях пресноводных систем в районах добычи металлов превышают 1000 мг/кг сухой массы. Более низкие уровни содержания характерны для рек, протекающих через городские районы, в незагрязненных зонах его содержание не превышает 50 мг/кг.

Накопление мутагенов создает опасность увеличения темпов мутации у гидробионтов и у человека, что приводит к генетической патологии у потомства и увеличению частоты развития рака у ныне живущего поколения (Burton, Stemmer, Winks, 1989).

Первые сообщения о влиянии нефтяного загрязнения на обитателей водной среды начали появляться еще в конце XIX в. В России это были работы, связанные, главным образом, с ущербом рыбному хозяйству Волги, обусловленным интенсивным загрязнением ее бассейна нефтепродуктами. Возрастающее нефтяное загрязнение водной среды в XX в. потребовало проведения более широких исследований.

Гидрофобная нефть образует тонкую пленку на поверхности воды, вода становится непригодной для использования при попадании 1 л нефти на 106 л воды. На открытых водных поверхностях с течением времени образуется эмульсионный слой «нефть — вода», который частично препятствует газообмену между водой и воздухом. Этот эффект приводит к тому, что все живые организмы, находящиеся под этой пленкой, постепенно задыхаются (Плотников, 1997). При этом прежде всего при дыхании в клетках накапливается CO_2 , что ведет к ацидозу, т.е. подкислению клеточной жидкости (Фелленберг, 1997). Так, в лабораторных условиях при толщине нефтяной пленки в 4,1 мм количество растворенного кислорода понижается в течение 20—25 суток до 40% (Blokker, 1966).

Циклические углеводороды представлены в нефти нафтеновыми и ароматическими углеводородами. Нафтеновые углеводороды составляют от 35 до 60%. О токсичности нафтенов сведений

почти нет. Вместе с тем имеются данные о нефтенах как о стимулирующих веществах при действии на живой организм (лечебная нефть Нафталанского месторождения в Азербайджане). Биологически активными факторами этой нефти служат полициклические нефтяные структуры (Anderson, 1950; Пиковский, 1993).

Содержание в нефти ароматических углеводородов колеблется от 5 до 40%. Среди полициклических ароматических углеводородов большое внимание обычно уделяет 3,4-бензапирену, как наиболее распространенному представителю канцерогенных веществ (Andelman, Suess, 1970). Ароматические углеводороды — наиболее токсичные компоненты нефти. В концентрации, равной всего 1% в воде, они убивают все водные растения. Нефть, содержащая от 30 до 40% ароматических углеводородов, значительно угнетает рост высших растений. Ароматические углеводороды трудно поддаются разрушению. Главным фактором деградации полициклических ароматических углеводородов в окружающей среде, особенно в воде и воздухе, является фотолиз, инициированный ультрафиолетовым излучением (Солнцева Н.П., 1998).

Моноядерные углеводороды — бензол и его гомологи — оказывают более быстрое токсическое воздействие на организмы, чем полициклические ароматические углеводороды, так как последние медленнее проникают через мембраны клеток, но действуют более длительное время, являясь хроническими токсикантами (Пиковский, 1993; Nuzzi, 1978).

Большую часть легкой нефти составляют метановые углеводороды (алканы — пентан, гексан). Метановые углеводороды, находясь в почвах, водной или воздушных средах, оказывают наркотическое и токсическое действие на живые организмы. Они лучше растворимы в воде, легко проникают в клетки организмов. Вследствие летучести и более высокой растворимости низкомолекулярных алканов их действие обычно не бывает долговременным. В соленой воде нормальные алканы с короткими цепями растворяются лучше и, следовательно, более ядовиты (Leppakoski, Linstrom; 1987). Метановые углеводороды с температурой кипения выше 200°C практически нерастворимы в воде. Их токсичность выражена гораздо слабее, чем у углеводородов с более низкомолекулярной структурой (Квасников, Ключникова, 1981). Парафины нетоксичны для живых организмов, хорошо ассимилируются

многими микроорганизмами (дрожжи, грибы, бактерии) (Lay et al., 1985).

Нефти Самотлорского месторождения (находящегося на территории района исследования) нафтенно-метанового типа, малосернистые, содержание сернистых соединений в нефти колеблется в диапазоне от 0,07 до 0,09% (Бейко, Головки, Горбунова, 1988).

По данным Н.Д.Мазманиди, нефть — это сложная смесь с комбинированным токсическим действием. Каждый из компонентов нефти может выступать как самостоятельный токсикант, с другой стороны, в природных водах нефть циркулирует как групповой токсикант до того момента, пока не подвергнется деструкции и трансформации под действием биотических и абиотических факторов. Существует утверждение о том, что сырая нефть, будучи продуктом естественного происхождения, не является «настоящим» загрязнителем. Но вряд ли можно считать естественным присутствие нефти и нефтепродуктов в озерах и реках (Мазманиди, 1974).

Включение нефтяных углеводородов нефти в ткани животных приводит к аккумуляции полициклических ароматических углеводородов (включая канцерогенные) и к передаче их выше по пищевой цепи (Ковалева, Бажашвили, 1973; Ковалева, 1976; Котов, 1976). Наиболее критическими стадиями в онтогенезе, чувствительными к нефтепродуктам, являются ранние стадии онтогенеза. Биологическими критериями здесь служат снижение темпов роста и развития, склонность к изменениям тератологического характера, снижение плодовитости или даже потеря способности к размножению (Мазманиди, 1974). Установлено также, что при интоксикации нефтяным загрязнением у креветок, морских звезд и морских ежей могут происходить изменения в содержании свободных нуклеотидов и нуклеиновых кислот (Дивавин, 1975; Дивавин, Ерохин, 1978).

На основании большого сравнительного материала по воздействию нефтяного загрязнения на обитателей водной среды можно сделать, прежде всего, следующие два обобщенных вывода. В систематическом отношении наименее чувствительными к токсикантам являются наименее организованные организмы — бактерии, водоросли и грибы. Наибольшей чувствительностью обладают рыбы (являясь высокоорганизованными водными животными

с дифференцированной нервной системой, особенно чувствительной к ядам). Беспозвоночные животные на этой шкале занимают промежуточное положение (Строганов, 1976). В экологическом отношении донные организмы более устойчивы, чем пелагические рыбы и беспозвоночные планктона, а в физиологическом отношении более устойчивыми оказались малоподвижные гидробионты (Giesy, Hoke, 1996). Между тем специальных исследований по воздействию нефтяного загрязнения на природные биоценозы несравненно меньше, чем экспериментальных исследований.

1.2. Биотестирование как современный метод оценки качества окружающей природной среды

Биотестирование как интегральный метод оценки токсичности водной среды является необходимым дополнением к химическому анализу (Туманов, Постнов, 1983). Биотестирование включено в стандарты по контролю качества вод различного назначения (Методическое руководство..., 1991).

Токсикант — фактор, работающий на энтропию, фактор разрушения живого. В экологической системе нарастает противодействие, стремящееся устранить энтропический фактор, и это создает ее особое свойство — буферность (Камшилов, 1973; 1979). Экосистема поглощает и перерабатывает токсикант в определенных пределах. Лишь когда этот потенциал сопротивления исчерпан, начинается собственно токсическое действие.

Характеристика и качество выполнения биологического тестирования напрямую зависят от выбора трех показателей: 1) тест-организмов; 2) условий проведения испытаний; 3) регистрируемых показателей.

Основной принцип практического лабораторного биотестирования природных и сточных вод, реализуемый в развитых странах, — применение одновременно 3—4 методов с тест-организмами, представляющими разные трофические группы: водоросли и высшие растения — первичные продукты, дающие начало большинству пищевых цепей в водоеме; рачки — один из основных фильтраторов и седиментаторов в пресных водоемах. Как

тест-организмы в экспресс- и хронических опытах используют также моллюсков, рыб — речных и акваториальных (Строганов, 1971; Мерц, 1994).

В России при осуществлении государственного экотоксикологического контроля допускается использование только тех методик биотестирования, которые внесены в Госреестр или, пока они не внесены в Госреестр, приведены в РД 118-02-90 (Методическое руководство..., 1991).

Цель биотестирования водной среды — выявление на гидробионтах степени и характера токсичности воды, загрязненной биологически опасными веществами, и оценка возможной опасности этой воды для водных и других организмов (Строганов и др., 1983). Главные достоинства биотестирования — простота и доступность приемов постановки опытов, высокая чувствительность тест-организмов к минимальным концентрациям токсических агентов, быстрота, отсутствие надобности в дорогостоящих реактивах и оборудовании. По мнению ряда авторов, ни один из отдельно взятых организмов не может служить универсальным тест-объектом, чувствительным к веществам различной химической природы, следовательно, для гарантированного выявления в среде токсического агента должен использоваться набор биотестов, представляющих организмы различных таксономических групп (Брагинский и др., 1979; Лесников, 1983; Филенко, 1989).

Классическим объектом в качестве аналитического индикатора среди ветвистоусых рачков стала *Daphnia magna* Straus. *D. magna* как тест-объект входит в большинство национальных и международных стандартов исследования качества воды (Baldwin, Milan, Leblanc, 1995; Frear, Boyd, 1967). Для определения в воде неорганических ионов дафний используют с 1940—50 гг.

При тестировании вод природных водоемов главное требование — чувствительность тест-объектов к микроколичествам токсиканов, характерных для естественных вод (Брагинский, Береза, Биргер и др., 1979; Макрушин, 1988; Щербань, 1992; Волков, Заличева, 1993 и др.); при тестировании возвратных вод главное требование — оперативность теста. Исходя из того, что чувствительность к присутствию отдельных веществ у видов разной систематической принадлежности и трофического статуса не одинакова, при биотестировании используются реакции разного уровня:

структурные (динамика численности, поведенческие и т.д.), функциональные (темп размножения и т.д.) (Лесников, 1969; Строганов, 1981; Филенко, Исакова, 1981; Щербань, 1992).

Выбор стандартных условий проведения испытаний также немаловажен, как и выбор тест-объектов. При постановке опыта следует обязательно установить и учесть действующие факторы и диапазоны их изменения. К числу таких факторов следует отнести, в первую очередь, концентрацию токсиканта, продолжительность экспозиции тест-организмов в токсической среде и температуру воды, т.е. факторы, присутствующие в каждом эксперименте и практически неустраняемые (Брагинский, Щербань, 1986).

При выборе длительности опытов необходимо учитывать биологию тест-объектов, характер действия исследуемого вещества, цель и задачи биотестирования. Наиболее часто используемые тесты — по критериям выживаемости и плодовитости. Популяционный смысл критерия выживаемости: любая популяция неоднородна в отношении чувствительности к токсиканту, в ней есть особи резистентные и толерантные, и токсикант в плане дальнейшей судьбы популяции действует как фактор отбора. Одним из главных критериев благополучия, с точки зрения популяции, является соотношение между рождаемостью и смертностью. Учесть его в естественных условиях очень трудно, но оно отчетливо может быть охарактеризовано в опытах на синхронизированной тест-культуре беспозвоночных животных с коротким жизненным циклом. Отрезок времени наблюдения за ответной реакцией организма выбирается с учетом цели анализа (хронический эксперимент может продолжаться 40—50 суток). В острых опытах проявления токсического действия веществ существенно изменяются в течение 24, 48, 72, 96 и 120 часов. Для простейших, в связи с их коротким жизненным циклом, время экспозиции сокращается до 3 часов в остром опыте и 24—48 часов в хроническом. Острые опыты рассчитаны на получение экспресс-информации о токсичности исследуемого вещества для данного тест-организма. Так, при наблюдении за динамикой гибели тест-культур (беспозвоночных, водорослей и др.) в острых опытах с тяжелыми металлами установлено (при температуре 25°C), что в первые сутки гибель незначительна, а максимум смертности достигается на 5 сутки. В других случаях максимум смертности может быть

достигнут за трое суток. Не случайно при определении острой токсичности указывается по крайней мере LC_{50-48} (летальная концентрация вещества для 50% тест-объектов за 48 часов испытаний). В то же время не все тест-объекты могут существовать *in vitro* 4—5 суток. Срок, который для достаточно долго живущих организмов (ветвистоусые, веслоногие, гаммариды, рыбы) может рассматриваться как время острого опыта, у тест-объектов с очень коротким жизненным циклом (например, бактерии, простейшие, коловратки) может охватывать время жизни нескольких генераций (т.е. является хроническим). Срок проявления эффективного действия разных токсикантов весьма различен. Методика выполнения биотестирования с водными животными подробно изложена в работах (Строганов, 1968; Брагинский, Береза и др., 1979; Methoden zur Bestimmung der Toxizität, 1970).

В литературе широко освещены результаты тестирования искусственно приготовленных растворов (тяжелые металлы, СПАВ и т.д.) известных концентраций (Щербань, 1977; Лазарева, 1985; Филенко, Лазарева, 1989 и др.). Интерпретация результатов тестирования природных вод, загрязненных многокомпонентными стоками, сложно перекомплексованных между собой и с природными компонентами, представляет собой задачу чрезвычайно сложную. Взаимосвязи между химико-аналитическими показателями токсичности вод и данными биотестирования сложны и теоретически не разработаны (Брагинский, Комаровский, Щербань и др., 1989).

Малое воздействие может быть полностью перекрыто компенсационным ответом организма, и эффект в этом случае не выходит за значения нормы. При сублетальных воздействиях (что чаще всего и бывает в реальной ситуации водного объекта) накопление повреждений может и не превышать компенсаторный потенциал, причем в этих условиях организм не только живет и размножается, но и получает стимуляцию. Периоды стимуляции и угнетения жизненных функций чередуются, представляя собой две фазы в динамике токсического воздействия на организм (Maki, Bishop, 1979; Филенко, Исакова, 1981).

В токсикологических исследованиях, в частности, при биотестировании, редко принимается во внимание температурный фактор, существенно влияющий на результаты биотестов (Брагинский, 1981). Критерии к выбору диапазона варьируемых температур

основываются на представлении о том, что ферментные системы водных организмов наиболее активно функционируют и, соответственно, наиболее уязвимы для действия токсикантов, в пределах 18—25°C. Температура свертывания белка, как правило, ограничивает допустимый интервал изменения температуры. От температуры зависят скорость поступления и выделения токсиканта, реакции, вызывающие повреждения, процессы, определяющие обезвреживание ксенобиотиков, и процессы репарации. При повышении температур на 4—15°C различия в эффективности действия токсикантов могут выражаться резким возрастанием чувствительности гидробионтов к химическим агентам. В отличие от пойкилотермных организмов, гидробионты физиологически открыты для доступа яда только в условиях оптимальных температур. При температуре ниже 15°C их ферментные системы угнетены, обмен с окружающей средой ослаблен, а присутствие токсикантов в среде для них не представляет серьезной угрозы (Caings, Heath, Parker, 1975; Брагинский, 1981). Таким образом, сам факт токсичности вещества и высокая смертность, устанавливаемая в опытах, не являются доказательством его популяционной опасности, а лишь предупреждают об угрозе токсического действия при оптимальных условиях. В лабораторных условиях, как правило, поддерживаются оптимальные температуры 18—25°C, а эти температуры не типичны для естественных водоемов России, где даже летом вода не нагревается свыше 25°C или такая температура кратковременна (Брагинский, Щербань, 1978; Сапрыкина, 2000).

Влияние температуры на гидробионтов сказывается по-разному для веществ различной химической природы. При действии серноокислых солей металлов Cu, Cd, Ni, Mn при увеличении температуры от 10 до 30°C их токсичность для *D. magna*, *Acanthocyclops vigidis*, *Cloen dipterum* резко возрастала на 1—3 порядка для кадмия и на 2—3 порядка для меди и цинка (Щербань, 1977; Брагинский, Щербань, 1978). Токсичность пестицидов, альдрина, дильдрина, эндрина, полихлорпинена, 4,4-ДВ, 2,4-триазола возрастала с увеличением температуры (Кнарек, Lacota, 1974). Существуют данные о том, что при увеличении температуры (с 5 до 18°C) возрастает токсикорезистентность *D. magna* для соединений, таких как пирокатехин, CdCl₂. Резорцин был несколько более токсичен для *D. magna* при низкой температуре (Бархатова, 2000).

1.3. Нормирование качества природной среды

До последнего времени оценка токсичности вод осуществлялась только с помощью физико-химических методов анализа (Гелашвили и соавт., 1998, 1999). Фоновые концентрации зачастую значительно превышают установленные ПДК, при этом следует учесть, что программа постоянного мониторинга водоемов ведется по ограниченному списку ингредиентов и не включает большинство известных токсикантов.

В качестве ПДК принимается допустимая недействующая концентрация для наиболее чувствительного звена среди набора использованных тест-объектов (Протасов, Матвеев, 2001). Сравнительный анализ токсикологических данных по веществам, для которых установлены ПДК, показывает, что в большинстве случаев наиболее слабыми звеньями, по которым шло нормирование ПДК, были планктонные ракообразные (дафнии), развивающаяся икра, личинки и молодь рыб, одноклеточные водоросли (Baldwin, Milan, Leblanc, 1995).

Интегральная токсичность по итогам биотестирования может существенно отличаться от показателей, устанавливаемых по формальному критерию, соответствующему условным величинам ПДК (Жмур, 1999). С позиций экологии, ПДК вредных веществ обозначают верхний предел устойчивости организма, при превышении которого то или иное вещество (или фактор) становится лимитирующим. Упомянутое далее ПДК рыбохозяйственных водоемов означает максимальные концентрации, при которых вещества не оказывают прямого или косвенного вредного воздействия на водные организмы.

Экологические нормативы — ПДК — не могут быть едиными для всех типов экосистем и для разных климатографических условий (Хоружая, 2002). В ряде регионов страны природный фон концентраций ряда химических веществ, металлов например, весьма высок и превышает ПДК в несколько раз. Существующая система единых национальных нормативов ПДК давно подвергается справедливой критике. Специалисты считают, что межрегиональная экстраполяция рыбохозяйственных ПДК недопустима, и необходим биогеохимический подход к лимитированию

техногенных воздействий на экосистемы. Перечислим основные недостатки концепции ПДК

Нормативы ПДК определяются в лабораторных условиях в краткосрочных и хронических экспериментах на изолированных популяциях организмов, по ограниченному набору физиологических и поведенческих реакций для отдельных факторов без какого-либо учета их возможного взаимодействия.

ПДК принимаются как единые нормативы для огромных административных территорий, в то время как действие загрязняющих веществ зависит от специфических фоновых, климатических, хозяйственных и многих других характеристик конкретного региона.

За несколько десятилетий установлено около тысячи ПДК, тогда как число загрязняющих веществ антропогенного происхождения превысило миллионы наименований. Кроме того, при попадании в водоем химические вещества вступают во взаимодействие и образуют вещества разнообразной химической природы.

Нормативы ПДК считаются универсальными для любого времени года.

Альтернативой методологии ПДК, биологической основой которой является существование пределов толерантности для отдельных организмов, могла бы служить концепция экологической толерантности, устанавливающая допустимые уровни воздействий для биотической части реальных экосистем (Хоружая, 2002).

Должно учитываться, что устойчивость (чувствительность) к воздействию у организмов в разных зонах и регионах существенно различается, что связано, прежде всего, с климатическими особенностями, гидрохимическим режимом, способностью к самоочищению. Каждая экосистема обладает эволюционно обусловленным уникальным комплексом связей между отдельными компонентами, специфическим адаптационным потенциалом (Хоружая, 2002). Устойчивость гидробионтов и их популяций к продолжающимся токсическим воздействиям со временем может повышаться. Показано, например, повышение устойчивости водорослей, копопед, изопод, личинок хираномид к металлам. Это повышение является следствием адаптации. Адаптация в одном случае представляет собой изменения в организме, которые повышают способность особи или популяции противостоять неблагоприятным факторам

окружающей среды. Продолжение популяции будет обеспечено размножением выживших устойчивых особей. Итогом такого преобразования популяции становится общее повышение ее устойчивости к токсическому воздействию.

Механизмы фенотипических адаптаций гидробионтов могут быть разнообразными. Устойчивость гидробионтов может повышаться за счет продуцирования экзометаболитов, связывающих ионы токсических металлов; связывания ионов компонентами клеточных стенок (например, полисахаридами); изменения свойств мембран, приводящего к снижению их проницаемости; связывания ионов внутри клеток специальными веществами; компенсаторных изменений метаболизма, нивелирующих поражение токсикантом. Для водоросли *Anabaena cylindrica* повышение устойчивости обеспечивалось экзометаболитами. Понижение накопления тяжелых металлов показано для микроорганизмов, полихет, хлореллы. Адаптированные личинки хирономид переносили большие содержания тяжелых металлов в грунте, и реакция избегания у них была выражена слабее. Повышенная устойчивость рачков к свинцу формировалась за 5 дней. Изоподы приобретали повышенную устойчивость за счет образования «купросом» в клетках гепатопанкреаса (Филенко, 1988). Адаптации всегда носят системный характер (Строганов, Филенко, Лебедева, 1983).

Среди процессов, ответственных за адаптацию, можно выделить специфические и неспецифические проявления. Так, изменение солёности может вызвать активность процессов, обеспечивающих регуляцию проницаемости ионов через мембраны. Повышение температуры может включить химические процессы, регулирующие скорость ферментных процессов в клетках, нарушенную этим повышением. Но при тех и других изменениях имеет место повышение синтеза макроэргических связей за счет активизации митохондрий, а в последующем — за счет образования новых митохондрий. Это повышение продукции макроэргических связей является уже проявлением неспецифической адаптации. Это может послужить причиной того, что организм, адаптированный к одному фактору, часто обладает повышенной устойчивостью и к другому.

Хронические эксперименты на поколениях рачков дают возможность рассматривать адаптивные изменения как фенотипические, возникающие в результате прямого действия среды на организм, так и генотипические, передающиеся по наследству.

Установлено, что в процентном отношении биомасса токсикорезистентных видов гидробионтов возрастает с севера на юг. Уязвимость природы Севера связана с малым количеством вещества и энергии, вовлекаемых в круговорот, — на 1—2 порядка меньше на единицу площади за единицу времени, чем в более южных зонах. На Севере проходят экологические границы многих растений и животных, что делает их генетически неустойчивыми к антропогенной нагрузке (Докучаев, 1948; Троли, 1989; Базиневич, Гребенщиков, Тишков, 1986).

Таким образом, ПДК должны разрабатываться для отдельных регионов с использованием местных популяций тест-организмов. Другим принципиальным ограничением применения стандартной процедуры нормирования загрязнения водных объектов является то, что «концепция ПДК» в подавляющем числе случаев рассматривает нормирование изолированного действия поллюантов, тогда как в реальных условиях имеет место комбинированное воздействие их смесей переменного состава (Жмур, 1999). Единственным объективным показателем характера комбинированного действия (аддитивного, потенцирующего или антагонистического) смеси загрязнителей является ответная реакция (отклик) тест-системы. Биотестирование в такой ситуации методологически более верно по сравнению с гидрохимическим анализом (Степанов, 1989; Золотев, 1999; Баканов и соавт., 2000).

Для определения влияния того или иного фактора на организм существенное значение имеет понимание роли дозы или уровня воздействия этого фактора. Температура, концентрация растворенных веществ, в том числе и кислорода, имеют некоторый диапазон оптимума для гидробионтов. Различные вещества по-разному ведут себя при одинаковом характере изменений среды, в том числе в плане трансформации и токсичности метаболитов. Незагрязненные природные воды представляют собой сложные по физико-химическому составу системы и содержат различные по дисперсности взвешенные вещества и растворенные соединения минеральной и органической природы. Эти компоненты могут

либо усиливать, либо снижать токсичность попадающих в водоем загрязняющих веществ. Так, адсорбция ионов металлов взвешенными частицами и выпадение их в осадок приводит, как правило, к детоксикации (Сафонова Т.А., 1989).

Взвесив достоинства и недостатки ныне существующей концепции ПДК, учитывая климатические особенности района исследования, считаем методологически более верным использовать методы биотестирования наряду с гидрохимическим анализом. Биотестирование рекомендуется проводить на нескольких тест-объектах.

Глава 2. ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ КАК АНАЛИТИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ

2.1. Живые организмы различных систематических групп, используемые в качестве аналитических индикаторов

Микроорганизмы как аналитические индикаторы привлекают большое внимание исследователя в силу высокой чувствительности к широкому кругу веществ, простоты культивирования и объективности получаемых аналитических результатов.

Наиболее изученными микроорганизмами с точки зрения возможности их использования при определении неорганических ионов являются плесневые грибы рода *Aspergillus* (Злочевская, 1968). Исследованные культуры наиболее чувствительны к нитратам ртути, кадмия, таллия и серебра, токсическое действие которых объясняется блокированием SH-групп молекул белков микроорганизмов.

Помимо плесневых грибов, при микробиологическом определении веществ применяются бактерии. Наиболее чувствительны методики определения катионов тяжелых металлов по хемотаксису бактерий. Также для биологической оценки содержания меди в воде используется влияние Cu^{2+} на рост бактерий *Bacillus cereus* и *Bacillus articulatus*. Минимальная определяемая концентрация меди $3 \cdot 10^{-8}$ М (Крестьянинов, 2002). Бактерии как аналитические индикаторы успешно используются при определении металлоорганических соединений.

В проводившихся токсикологических исследованиях на микроорганизмах, как правило, не учитывалось возможное взаимодействие катионов металлов с компонентами среды, и полученные в них данные не совсем точно отражают истинную токсичность катионов. В большинстве работ соли металлов вносились непосредственно в культуральные среды. При этом количество внесенного вещества и его содержание в биологически активной форме могут сильно различаться, так как часть или все ионы металла могут быть выведены в осадок в виде малорастворимых

фосфатов, карбонатов или гидроокисей. Тяжелые металлы взаимодействуют также с некоторыми органическими компонентами сред с образованием комплексов, действие которых неравнозначно исходной биоцидности катионов (Hansen and Bonde, 1969).

Беспозвоночные широко распространены как в пресных, так и в соленых водоемах и, таким образом, могут служить показателем качества водной среды и аналитическими индикаторами при определении веществ в водных растворах. Рассмотрим различные виды беспозвоночных с аналитической точки зрения.

Среди *простейших* в качестве аналитических индикаторов наиболее перспективны *Paramecium caudatum*. В аналитическом аспекте простейшие интересны тем, что могут рассматриваться как простые рецепторно-электронные системы, обладающие способностью реагировать на химическое воздействие всем комплексом биологических, физиологических и биохимических изменений (Dryl, 1970). Поведенческие реакции, как правило, являются откликом на воздействие весьма малых (сублетальных) доз вредных веществ, что обеспечивает высокую чувствительность методик, основанных на использовании реакций этого типа (Пожаров, Рахманин, Шелемотов и др. 1994). Эти инфузории неприхотливы, легко культивируются в лабораторных условиях и обладают высокой чувствительностью к биологически активным веществам. Чувствительность парамеций к катионам тяжелых металлов, гербицидам, органическим кислотам, фенолам, спиртам, альдегидам, некоторым лекарственным препаратам обсуждается в ряде работ (Pietrowicz-Kosmynska, 1971, 1972; Dryl, 1970; Nakatani, 1970; Sleigh, 1970; Трунова, 1979; Туманов, Постнов, 1983).

Среди работ, в которых описаны методики определения концентрации веществ с использованием парамеций, следует отметить (Methoden zur Bestimmung der Toxizitat, 1970; Осипова, 1969).

Из *ракообразных* классическим объектом в качестве аналитического индикатора среди ветвистоусых рачков стала *D. magna*. *D. magna* отвечает целому ряду требований, предъявляемых к биотесту: доступность в природе, простота лабораторного содержания и высокий темп размножения, небольшой, но в то же время достаточный для визуального наблюдения размер животного.

Установлено (Ривьер, Флеров, 1973; Лестников, 1976), что молодые *D. magna* чувствительнее к токсичным веществам, чем взрослые,

в связи с чем рекомендуется в качестве биотестов использовать молодь в возрасте не более 15—26 часов (Frear, Boyd, 1967).

Еще в 1940-е гг. была исследована чувствительность рачков к неорганическим ионам (Anderson, 1950), где констатировалась наибольшая чувствительность *D. magna* к ионам серебра, ртути, кадмия, хромата, бихромата, цианида и йодида. В последующие годы этому вопросу было посвящено большое количество работ (Щербань, 1975; Biesinger, Christensen, 1972; Schweyer, 1974; Bertran, Hart, 1979; Qureshi and all, 1980). Сравнительно невысокая чувствительность *D. magna* к катионам тяжелых металлов связана с наблюдающейся детоксикацией катионов в воде за счет комплексообразования (Авакян, 1967; Алимарин, 1960; Злочевская, 1968; Dryl, 1970).

Эти животные являются фильтраторами и пропускают через себя большое количество водной среды, что обуславливает их чувствительность к растворенным в воде веществам. Аналитическим сигналом служит время 100%-ной иммобилизации дафний. Диапазон определяемых концентраций для ДДВФ составляет 0,005—1 мкг/г, для бутифоса — 1—20 мкг/г; погрешность — 2—8%. При хроническом воздействии катионы металлов оказывают неблагоприятное влияние на размножение *D. magna* при концентрациях (мг/л): кадмий $1,7 \cdot 10^{-3}$, ртуть $3,4 \cdot 10^{-2}$, медь, свинец, никель, платина $1 \cdot 3 \cdot 10^{-1}$, железо, хром, мышьяк, алюминий 3-5, щелочные и щелочноземельные металлы 40-120, а натрий в виде соли NaCl вызывает неблагоприятное воздействие на жизнедеятельность животных при концентрациях не менее 500—680 мг/л (Biesinger, Christensen, 1972).

При концентрациях менее 0,1 мг/л остротоксического действия катионы металлов на дафний не оказывают, однако при сублетальных концентрациях наблюдается воздействие на воспроизводительную функцию животных: увеличение периода эмбрионального развития, снижение численности молоди в помете, замедление скорости полового созревания (Щербань, 1975). При сопоставлении чувствительности дафний и инфузорий к катионам тяжелых металлов практически совпадает (Biesinger, Cliristansen, 1972; Трунова, 1979).

Токсичность катионов, как уже отмечалось выше, может существенно снижаться за счет присутствия в воде различных комплексообразователей (Gacher, Lum-Shue-Chan, 1973), а также

с повышением жесткости воды (Blac and all, 1973; Carter, Cameron, 1973; Lake and all, 1979). Токсичность катионов металлов зависит также от рН среды (Baudouin, Scoppa, 1975) и температуры раствора (Caims and all, 1975). Метод биотестирования с помощью дафний Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , а также CN^- в сточных водах по чувствительности занимает промежуточное положение между рыбами и микроорганизмами (Schweyer, 1974).

На металлоорганические соединения дафнии реагируют обычно сильнее, чем на катионы соответствующих металлов. Трибутилоловоакрилат летально действует на животных при концентрациях порядка $1 \cdot 10^{-3}$ мг/л, в то же время $2 \cdot 10^{-6}$ мг/л трибутиловохлорида стимулируют их жизнедеятельность, а растворы $2 \cdot 10^{-2}$ — $4 \cdot 10^{-2}$ М тетраметил- и тетрафенилсвинца не оказывают влияния на выживаемость, но уменьшают плодовитость дафний (Колосова, Строганов, 1973). Тест-реакция дафний на металлоорганические соединения заслуживает внимания в связи с тем, что осуществление контроля соединений этого класса в объектах среды, в том числе и химическими методами, представляет в ряде случаев сложную задачу.

Чувствительность дафний к органическим веществам существенно зависит от их природы. Фенол при содержании 1—2 мг/л стимулирует размножение животных (Алымова, 1975). Летальное действие поверхностно-активных веществ на дафний проявляется при концентрациях 0,8—30 мг/л (Брагинский, Буртная, Щербань, 1979; Коскова, Козловская, 1979). Сообщается (Ривьер, Флеров, 1973) о губительном действии на дафний 0,5 мг/л полихлорпиненна. Приводятся данные (Frear, Boyd, 1967), свидетельствующие о еще более высокой их чувствительности к ДДТ, метокси-хлору, гептахлору, ронеллу, альдрину, LC_{50} которых находится в пределах $1 \cdot 10^{-3}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ мг/л. Напротив, в работе (Phillips, 1978) говорится о слабой чувствительности биологических объектов к ХОС и высказывается сомнение в возможности их биоиндикации.

Повышение температуры анализируемой водной среды на 8—10°C по сравнению с оптимальной для жизнедеятельности дафний приводит к сокращению времени анализа в 2—6 раз и понижению предела обнаружения в среднем на порядок (Брагинский, Щербань, 1978).

С повышением температуры снижается концентрация кислорода, что обычно повышает эффект токсических веществ для

гидробионтов (Плотиков, 1997; Трахтенберг, 1991). В то же время токсичность кадмия и его накопление в водных насекомых возрастали с повышением концентрации кислорода.

К недостаткам дафний можно отнести сложность их разведения в зимний период и трудоемкость операций, связанных с поддержанием культуры.

Кроме *D. magna* в качестве аналитических индикаторов в биологическом методе анализа могут выступать циклопы, гаммариды, артемии, ракушковые рачки (Брагинский и др., 1978; Гудкова, 1979; Гроздов и др., 1979; Исакова, Строганов, 1975; Строганов, 1968; Kawtski, Schmulbach, 1971; Muirhead-Thomson, 1979; Miura Takeni Takashi, 1974). Однако они менее распространены в анализе, так как чувствительность их к химическим веществам уступает таковой у дафний.

Рачок артемия представляет интерес как аналитический индикатор. Благодаря тому, что этот рачок может приспосабливаться к колебаниям солености воды, его можно использовать в качестве подопытного организма. Установлено, что артемия лучше всего растет при солености 12%, но может переносить и более соленую воду — до 24%, хотя развитие его при этом замедляется (Волцит, Черняховский, 1999).

Среди **насекомых**, используемых для аналитических целей, следует в первую очередь выделить личинки комаров. Эти организмы легко доступны и их можно содержать в большом количестве в лабораторных условиях. В качестве аналитического сигнала используют поведенческие реакции, выражающиеся в изменении скорости и траектории движения, фототаксис личинок и их выживаемость. Личинки комара *Culex pipiens molestus* наиболее чувствительны к пестицидам. Личинки хирономид *Chironomus plumosus* показали высокую чувствительность к нитратам кадмия и меди. Минимальные концентрации солей, изменяющие реакцию фототаксиса этих животных, составили $1 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л соответственно (Javier, 1976; Darwazch, Mulla, 1974; Кербабаяев, Мальцман, 1970; Седых, Попов, Абеленцева, 1972).

Среди **червей** наиболее исследованы с аналитической точки зрения свободноживущие нематоды семейства Panogrolaimidae. Известны методики определения биологически активных начал пчелиного яда по времени жизни нематод *Panagrellus redivivus*

в серии стандартных растворов. Также нематоды чувствительны к катионам Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . В связи с этим разработаны методики определения вышеперечисленных катионов с использованием в качестве аналитического сигнала продолжительности жизни нематод в растворах солей тяжелых металлов.

Также аналитическими индикаторами при биологическом определении веществ могут выступать пиявки (*Hirudo medicinalis*) и коловратки, однако эти животные используются реже (Флеров, Лапкина, 1976; Франке, Франц, 1973; Блохина, Помазкова, Стом, 1978).

Водоросли. Основными факторами, определяющими выбор одноклеточных водорослей в качестве тест-объектов, являются высокий темп деления клеток, способность водорослей развиваться в условиях клональной, моно- и смешанной культуры, приспособленность к регулярному пересеву. *Scenedesmus carpicornutum* — стандартный тест-объект (Blanck, Wangberg, 1988), в качестве тест-параметра используют рост этой водоросли за 96 часов, интенсивность фотосинтеза, основанную на ассимиляции меченой углекислоты за 24 ч. Описаны тесты с *Chlorella vulgaris* по оценке токсичности природных и сточных вод. В опытах с хлореллой учитывают видимые изменения, происходящие с колониями: изменение количества, размеров, цвета и структуры поверхности (Безрукова, 2000).

При использовании **позвоночных** в биологическом методе анализа в качестве аналитических индикаторов можно применять как целый организм, так и органы, ткани и системы, обладающие ярко выраженной хеморецепцией.

Рыбы — излюбленный объект для определения пригодности воды для водных организмов и токсичности промышленных стоков. Биологическое определение веществ, основанное на применении целого организма, предполагает контроль поведенческих реакций, скорости размножения и выживаемости. Авторами получен ряд чувствительности гуппи к катионам тяжелых металлов: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. Минимальная определяемая концентрация Hg^{2+} $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Использование изолированных органов и тканей представляет интерес вследствие их высокой чувствительности, быстроты отклика и возможности автоматизации. Известны методики определения кислот, щелочей и некоторых катионов тяжелых металлов по изменению биоэлектрической активности седалищного нерва

лягушки *Rana redibunda* Z. Установлено, что седалищный нерв с достаточно высокой чувствительностью реагирует на хлориды меди, цинка, марганца и кобальта. Растворы $MnCl_2$ с концентрацией порядка $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л приводят к длительному повышению возбудимости нерва, а растворы той же соли с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л угнетают возбудимость нерва. Растворы $CuCl_2$ с концентрацией 10^{-9} — 10^{-8} моль/л снижают возбудимость нерва вплоть до полного блокирования. Описана методика количественного определения катионов Ag^+ , Hg^{2+} на уровне концентраций 10^{-7} моль/л, и Co^{2+} , Ni^{2+} на уровне 10^{-6} моль/л с использованием в качестве аналитического сигнала степени дегенерации тканей человека (Крестьянинов, 2002).

Для изучения экотоксикологических эффектов комбинированного действия ксенобиотиков на животный и растительный мир, кроме млекопитающих, в качестве тест-объектов в работах по комбинированному действию используются также амфибии, беспозвоночные и одноклеточные микроорганизмы (Dawson, 1994).

2.2. Биотестирование с использованием *Daphnia magna*

Характеристика тест-объектов. Род дафний включает около 50 видов, среди которых наиболее обычны *Daphnia magna*, *D. pulex*, *D. longispina*, *D. carinata*. Самый крупный вид — *Daphnia magna* Straus (отряд Cladocera, класс Crustacea). Это организмы, относящиеся к группе фильтратов и живущие преимущественно в толще воды. Обитают в стоячих и слабопроточных водоемах, на территории России распространены повсеместно. Они играют большую роль в процессах самоочищения водоемов от взвешенных в воде веществ, при этом на них могут оказывать значительное действие растворимые, мелкодисперсные взвешенные компоненты сточных вод.

Короткий биологический цикл развития позволяет проследить рост и развитие на всех жизненных стадиях. В течение жизни выделяют ряд стадий, сопровождающихся линьками: первые 3 — ювенильные — следуют через 20—24—36 часов, четвертая — созревание яиц в яичнике и пятая — откладка яиц в выводковую

камеру — следуют с интервалом 1—1,5 суток. Начиная с шестой стадии каждая линька сопровождается откладкой яиц. Период созревания рачков при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и хорошем питании — 5—8 дней. Длительность эмбрионального развития обычно составляет 3—4 дня, а при повышении температуры до 25° — 48 часов. Партеногенетические поколения следуют друг за другом каждые 3—4 дня. Вначале число яиц в кладке 10—15, затем может возрастать до 30—40, формирование яиц прекращается за 2—3 дня до смерти. В природе *D. magna* живут в среднем 20—25 дней, в лаборатории при оптимальных условиях — 3—4 месяца и более. При температуре свыше 25°C продолжительность жизни может сократиться до 25 дней. Размеры взрослых самок достигают 6 мм в длину, молодых — 0,7—0,9 мм.

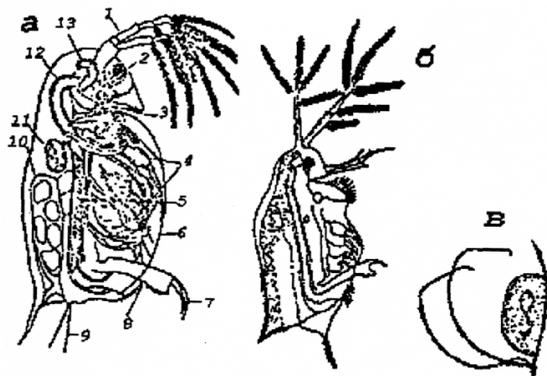


Рис. 1. Строение *Daphnia magna* Straus:

- а* — самка: 1 — антенна, 2 — сложный глаз, 3 — антеннула,
 4 — грудные ножки, 5 — яичник, 6 — створки панциря, 7 — каудальные когти,
 8 — постабдомен, 9 — хвостовые щетинки, 10 — выводковая камера,
 11 — сердце, 12 — кишечник, 13 — печеночные выросты;
б — самец; *в* — внешний вид эфитциума

С помощью грудных ножек *D. magna* отфильтровывает мелкие взвешенные в воде частицы. Даже кратковременные отклонения от нормальных условий жизни (изменение температуры, уменьшение количества пищи, загрязнение) могут прервать процесс партеногенеза, и тогда из неоплодотворенных яиц выходят не самки, а самцы (рис. 1, б). Они имеют небольшие размеры, их передние антенны удлинены, а первая пара грудных ножек снабжена коготками.

Часть яиц в половой системе самки подвергается редуционному делению и способна развиваться только после оплодотворения. Оплодотворенные яйца содержат большое количество желтка, в выводковой камере они окружаются плотным слоем клеток, поверхность которых образует кутикулу.

В выводковой камере возникает так называемое седлышко-эфиппиум (рис. 1, в), которое после линьки оказывается на свободе и благодаря воздухоносному слою плавает на поверхности. На этой стадии яйцо переносит неблагоприятные условия (Ивлева, 1969).

Культивирование дафний в лабораторных условиях. Для биотестирования воды по критериям выживаемости и плодовитости следует использовать культуру *D. magna*, полученную из природного водоема района исследования. Для этого из самого чистого водоема с помощью гидробиологического сачка отлавливаю *D. magna* и помещают в стеклянные емкости, которые заполняют под пробку водой из этого же водоема. Одновременно отбирают 5—10 л воды для последующей посадки дафний. *D. magna* отделяют декантированием жидкости. *D. magna*, отловленных в природном водоеме, рассаживают в стеклянные кристаллизаторы объемом 2—5 л при плотности посадки не более 25 особей на 1 литр воды, переносят дафний с помощью стеклянной трубки с внутренним диаметром 0,5—0,8 см с оплавленным концом. Спустя 5—7 суток, в течение которых *D. magna* привыкают к лабораторным условиям существования и начинают размножаться, в сосуды доливают воду для дальнейшего культивирования. Для исследований токсичности воды по критериям выживаемости и плодовитости поддерживают оптимальную температура $20 \pm 2^\circ\text{C}$, продолжительность светового дня 12—14 ч.

Биотестирование водной среды необходимо проводить на синхронизированной культуре *D. magna*. Для получения синхронизированной культуры отбирается одна самка средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, и помещается в химический стакан на 250 см^3 , наполовину заполненный культивационной средой. Появившуюся молодь переносят в кристаллизатор (25 особей на 1 дм^3 среды) и культивируют указанным способом. Полученная следующая генерация является синхронизированной культурой и может быть использована для биотестирования в возрасте 24 часа.

Основные гидрохимические показатели воды должны находиться в следующих пределах: рН = 7,0—8,2, жесткость общая — 3—6,5 мг-экв./л (200 ± 50 мг CaCO_3); концентрация растворенного кислорода менее 6,0 мг/л. Раз в 7—10 суток половину объема воды с культурой *D. magna* заменяют на свежую, удаляют скопившийся на дне осадок, прореживают культуру. Кормом для *D. magna* служат зеленые водоросли (хлорелла). Кормят культуру *D. magna* 1—2 раза в неделю.

Чувствительность культур *D. magna* проверяется на растворах модельного токсиканта бихромата калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), ряда концентраций (от доли ПДК до 2—4 ПДК, а именно: 0,9; 1,2; 1,7; 2,0 мг/дм³). Концентрация бихромата, при которой в течение 24 часов иммобилизуется 50% тест-объектов, обозначается как ЛК₅₀₋₂₅ (Жмур, 1997). Величина летальной концентрации для 50% тест-объектов за 24 часа опыта должна укладываться в интервал 0,9—2,0 мг/дм³.

Проведение опыта. Тестирование каждой исследуемой пробы по критерию выживаемости проводят в 3-х повторностях. Каждая проба исследуется в трех повторностях, тестируемую воду заливают в 3 сосуда по 100 мл, 3 сосуда для контрольной пробы, не содержащей токсичных веществ. В каждый сосуд помещается по 10 особей *D. magna*. Их переносят стеклянной трубкой диаметром 5—7 мм сначала в сачок, а затем в сосуд, погрузив его в воду. В остром опыте (длительностью до 96 часов) учет выживших *D. magna* проводят через 1, 6, 24, 48, 72, 96 часов. Выжившими считаются особи, если они свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позднее 15 с после его легкого покачивания.

Проба воды оценивается как обладающая острой токсичностью, если за 24 ч биотестирования в ней гибнет 50% и более дафний по сравнению с контролем.

Хроническое тестирование на *D. magna* в четырех последующих поколениях выполняют в 10 повторностях. В химические стаканы со 100 мл опытного раствора вносят по 1 особи *D. magna*. Молодь первого вымета, появившуюся у исходных особей (поколение P), подсчитывают и помещают по 1 экземпляру в новые 10 химических стаканов (поколение F1), аналогичным образом получают второе (поколение F2) и третье поколение (поколение F3)

рачков. Молодь последующих поколений подсчитывают и удаляют. При наблюдении за размножением рачков учитывают время первого вымета (выход яиц их выводковой камеры), среднемесячную плодовитость поколений (отношение родившейся молоди к количеству самок), выживаемость.

Динамика плодовитости *D. magna* определяется как количество экземпляров выметанной молоди в пересчете на одну партеногенетическую самку в течение 30 дней наблюдения за каждой самкой.

В хронических опытах с *D. magna* критерием токсичности по показателю плодовитости является достоверное снижение показателей в тестируемой воде по сравнению с контролем за период опыта. Оценка достоверности различий биопараметров (выживаемости и плодовитости) в хроническом опыте проводится с использованием критерия Стьюдента.

2.3. Биотестирование с использованием *Ceriodaphnia affinis*

Характеристика тест-организма. Вид *Ceriodaphnia affinis* относится к низшим ракообразным, отряду ветвистоусых, семейству дафнид, роду цериодафний.

Этот вид распространен по всему земному шару. Цериодафния обитает в водоемах всех типов в Европе, Северной Африке, Азии, Южной Америке. Населяет неглубокие, преимущественно небольшие озера, пруды, садки, реки и разнообразные маленькие водоемы, а также каменистые лужи побережий полярных морей. В маленьких водоемах этот вид встречается реже, чем другие ветвистоусые рачки. В больших, глубоких водохранилищах и озерах встречаются единично. В Европе встречаются только в литоральном планктоне на открытых местах между зарослей тростника и между растениями над заиленным дном.

Тело цериодафний овальное, заключено в хитиновую прозрачную раковинку, створки раковины на брюшной стороне не соединены, образуют щель. Тело неясно сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы. Впереди под головным отделом находятся две маленькие антеннулы, вооруженные осязательными

щетинками. По бокам головы расположены две задние сильно развитые антенны, служащие для скачкообразного передвижения в воде. В грудном отделе расположено 5 пар грудных ножек, которые покрыты многочисленными щетинками, участвующими в процессе фильтрации воды. Сердце находится на спинной стороне грудного отдела. Брюшной (абдоминальный) отдел туловища — с развитыми абдоминальными выростами, один из них сильно выступающий конусовидный. Постабдомен с коготками, на вогнутой стороне его находятся мелкие щетинки (рис. 2).

Половая система представлена парными гонадами: яичниками у самок и семенниками у самцов, которые расположены по обеим сторонам кишечника. Самки несут до шести яиц в выводковой камере. В природе вид *Ceriodaphnia affinis* моно- или дициклическ с максимумом полового периода осенью. В лабораторных условиях самцы появляются при сокращении освещенности, снижении температуры воды, недостатке кислорода, голодании, а также при воздействии других неблагоприятных факторов. В лабораторных условиях, чтобы обеспечить опыты достаточным числом рачков, необходимо создавать условия для поддержания культуры в состоянии партеногенетического размножения. Появление самцов особенно искажает результаты хронических опытов.

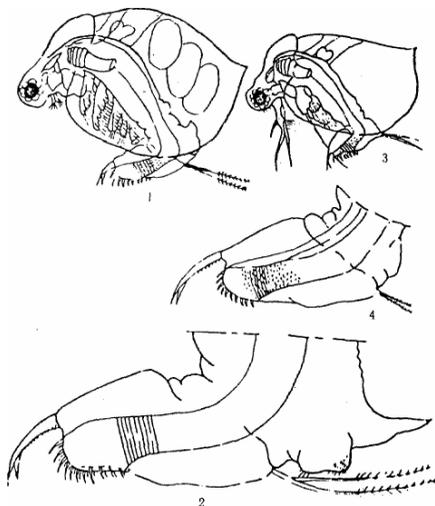


Рис. 2. Строение *Ceriodaphnia affinis*

1 — самка, 2 — постабдомен самки, 3 — самец, 4 — постабдомен самца

Культивирование цериодафний в лабораторных условиях.

Культивационная вода используется: для культивирования цериодафний, в качестве контрольной при биотестировании, для разбавления исследуемых вод. Для подготовки культивационной воды питьевую воду отстаивают и аэрируют в течение 3—7 суток (до полного дехлорирования) в бутылках из бесцветного стекла в присутствии высшей водной растительности (2—3 г по воздушной-сухой массе любой аквариумной растительности на 1 дм питьевой воды).

Биотестирование воды и водных вытяжек проводят только на синхронизированной культуре цериодафний. Синхронизированной является одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении. Такая культура генетически однородна. Рачки, ее составляющие, обладают близкими уровнями устойчивости к токсическим веществам, одновременно созревают и в одно время дают генетически однородное потомство. Подробнее техника культивирования описана на примере *Daphnia magna*.

Проведение опыта. «Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости цериодафний, ПНДФ Т 14.1:2:3:4.4-99» основана на определении смертности и изменений в плодовитости цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*, Cladocera, Crustacea) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль).

Острое токсическое действие исследуемой воды на цериодафний определяется по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более цериодафний за 48 часов в исследуемой воде при условии, что в контроле гибель не превышает 10%.

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают:

— среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления вод, содержащих смеси веществ), вызывающую гибель 50% и более тест-организмов;

— безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления вод,

содержащих смеси веществ), вызывающую гибель не более 10% тест-организмов.

Хроническое токсическое действие исследуемой воды на цеериодафний определяется по смертности и изменению их плодovitости за период 7 и более суток (до появления третьего помета молоди в контроле) в исследуемой воде по сравнению с контролем. Критерием хронической токсичности служит гибель 20% и более тест-организмов и (или) достоверное отклонение в плодovitости из числа выживших по сравнению с контролем.

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов, а также следов обработки помещений инсектицидами, пестицидами и пр.

Температура окружающего воздуха в лаборатории от +19 до +24°C, в люминостате для биотестирования от +22 до +24°C. Атмосферное давление 84—106 кПа (630—800 мм рт. ст.).

Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничено особыми требованиями. Освещение в люминостате, или эквивалентном приспособлении, лампами дневного света. Освещенность для цеериодафний 500—1000 лк, для водорослей 3000—4000 лк.

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

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 следует не более 24 часов после отбора.

Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до температуры от +19 до +24°C.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений (с диаметром частиц более 3,5 мкм) необходима фильтрация пробы через наиболее пористые обеззоленные фильтры «белая лента»

(недопустимо использовать «синюю ленту», так как она задерживает коллоидные вещества, что занижает результаты биотестирования).

Природные воды фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 3,5 мкм (фильтр перед применением должен быть промыт и простерилизован кипячением в дистиллированной воде не менее 10 мин) или через обеззоленные фильтры «белая лента».

Активный хлор, используемый для обеззараживания питьевых и сточных вод, является токсическим веществом, поэтому перед биотестированием питьевых вод, а также при необходимости анализа сточных вод после системы хлорирования хлор следует удалить из исследуемой воды отстаиванием пробы с открытой крышкой при температуре от +2 до +4°C не менее 24 часов.

Проба воды, подлежащая биотестированию, должна иметь рН 7,0—8,2, если рН пробы выходит за указанные пределы, в отдельном эксперименте устанавливается токсичность, вызываемая водородным показателем. Затем определяется токсичность воды после нейтрализации пробы.

При исследовании грунтовых или других вод с содержанием железа двухвалентного более 1 мг/дм (валовая форма) необходимо предварительное отстаивание проб не менее 24 часов при температуре от +2 до +4°C. Осветленная вода сифонируется и анализируется на токсичность.

Биотестируемая проба воды должна иметь концентрацию растворенного кислорода не ниже 6 мг/дм³, в противном случае пробу аэрируют при помощи аквариумного компрессора перед процедурой биотестирования.

Для приготовления разбавлений исследуемых вод используют культивационную воду. Предварительно, перед приготовлением необходимых разбавлений вод для исследования, 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 комнатной температуре. Температура культивационной и исследуемой воды должна быть также доведена до комнатной температуры перед приготовлением разбавлений.

Для приготовления разбавлений берут определенные, отмеренные мерной посудой, объемы исследуемой и разбавляющей (культивационной) воды. В качестве мерной посуды для объемов меньше 10 см^3 используются мерные пипетки. Для объемов более 10 см^3 — мерные цилиндры. Поверхностные, пресные, грунтовые и сточные воды с неизвестной степенью токсичности анализируются в 100, 30, 9, 3 и 1%-ной концентрациях. Сточные и очищенные сточные воды (отобранные до системы хлорирования), если не известны их токсические свойства, тестируются в первичном испытании в большем наборе разведений при 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,5, 0,78%-ной концентрации. Если предварительно известно, что сточные воды обладают гипертоксичностью, а также если это можно предположить по данным гидрохимического исследования, исследуемые концентрации уменьшаются и составляют 10, 3, 0,3, 0,1%. Возможен произвольный выбор разведений. Чем выше предполагаемая токсичность, тем большей должна быть кратность разбавлений исходной пробы.

После получения предварительных результатов биотестирования при необходимости готовятся и анализируются дополнительные разбавления (Жмур, 1997).

Для определения острого токсического действия проводится биотестирование исходной исследуемой воды и нескольких ее разбавлений. Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводится в десяти параллельных сериях. В качестве контроля используется 10 параллельных серий с культивационной водой.

Биотестирование проводится в химических стаканах объемом 30 см^3 , которые заполняются 15 см^3 исследуемой воды, в них помещается по одной цериодафнии не более 24-часового возраста (разница между возрастом рачков не должно составлять более 8 часов,

что определяется по размеру рачков и обеспечивается синхронизированным культивированием). Цериодафний отлавливают из химических стаканов, в которых выращивается синхронизированная культура, пипеткой объемом 2 см^3 (с отпиленным и оплавленным концом) с резиновой грушей. Помещают их по одной на сачок, через который вода сливается в отдельный химический стакан, после чего цериодафний сачком вносят в стаканы с исследуемой водой. Посадку рачков начинают с контрольной серии. В исследуемые растворы цериодафний помещают, начиная с больших разбавлений (меньших концентраций загрязняющих веществ) к меньшим разбавлениям. После каждой посадки в исследуемые растворы сачок тщательно промывается в сосуде объемом 2 дм^3 с культивационной водой. Для работы с серией контроля должен быть отдельный сачок.

Для каждой серии исследуемой воды используется 10 химических стаканов. Общее количество стаканов, используемых в опытах, равно удесятеренной сумме всех разбавлений, плюс 10 для исходной воды, плюс 10 для контроля.

В экспериментах по определению острой токсичности цериодафний кормят перед началом эксперимента, а в последующие сутки — ежедневно.

Учет смертности цериодафний в опыте и контроле проводят через каждый час до конца первого дня опыта, а затем 2 раза в сутки ежедневно до истечения 48 часов.

Неподвижные особи считаются погибшими, если они не начинают двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания стакана.

Если гибель цериодафний в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитываются, и он должен быть повторен.

После того, как результаты эксперимента учтены, все цериодафнии из стаканов выбрасываются, каждая серия разбавлений из 10 стаканов сливается в химический стакан объемом 200 см^3 , и проводятся измерения рН, температуры, содержания растворенного кислорода с помощью оксиметра. Содержание растворенного кислорода в конце эксперимента должно быть не ниже 4 мг/дм^3 , рН — в диапазоне 7,0—8,2. Все отклонения от установленных норм, а также данные по каждой серии разбавлений, исходной воды и контролю также заносят в рабочий журнал и протокол результатов эксперимента.

Для определения хронического токсического действия продолжается острый эксперимент с использованием контроля и серии разбавлений, в которых острое токсическое действие не проявилось или готовится новая серия разбавлений с учетом результатов острых опытов. За исходную воду принимается разбавление исследуемых вод, не вызвавшее острого токсического действия.

Определение токсичности каждой пробы и каждого разбавления проводится в 10 параллельных сериях и сопровождается одной для всех разбавлений серией контроля в 10 стаканах.

Биотестирование по определению хронического токсического действия проводится с соблюдением требований к температуре, продолжительности фотопериода и качеству культивационной воды. При несоблюдении этих условий продолжительность хронического эксперимента может увеличиться или его результаты будут сомнительны. Вынужденное нарушение требуемых условий следует отмечать в журнале и протоколе.

В экспериментах по определению хронического токсического действия кормят цериодафний перед началом эксперимента и в последующие дни один раз в сутки.

Смена растворов на новые осуществляется через каждые двое суток на третьи из свежесобраных проб или из проб, хранящихся в холодильнике при температуре от +2 до +4°C.

Для смены растворов готовят 10 параллельных рядов испытуемых разбавлений (и контроль), аналогичных исходным, куда из старых растворов выжившие цериодафнии переносятся при помощи сачка, на который они помещаются пипеткой объемом 2 см³, в свежеприготовленные растворы. Старые растворы профильтровывают через сито из мельничного газа и на нем производят подсчеты родившейся молодежи, а в растворах — измерения физико-химических параметров. Содержание растворенного кислорода в конце хронического эксперимента должно быть не ниже 4 мг/дм³, рН — в диапазоне 7,0—8,2.

Учет смертности и родившейся молодежи в опыте и контроле проводят один раз в сутки ежедневно до конца хронического опыта. Молодь подсчитывают и удаляют пипеткой, пропуская исследуемый раствор через сито над тем стаканом, в котором производится подсчет.

Хронический опыт считается законченным, если в контроле выжило 80% испытуемых цериодафний, а 60% и более из них дали три поколения молоди (первый помет при удовлетворительных условиях на 3—4-й день и каждый следующий через 36—48 часов; при соблюдении удовлетворительных условий обычно происходит три помета за 7—10 суток эксперимента; в зимний период третий помет, как правило, происходит на 10-е сутки). Считают погибших цериодафний и прекращают эксперимент в стаканах с погибшей самкой. Родившуюся молодь подсчитывают (при помощи лупы или стереоскопического микроскопа) и выбрасывают.

Продолжительность хронического токсикологического эксперимента с использованием цериодафний — 7 и более суток (до появления третьего помета молоди в контроле). Хроническая токсичность устанавливается по двум параметрам: гибели 20% и более исследуемых тест-организмов и (или) по достоверному отклонению в плодовитости исследуемых тест-организмов по сравнению с контролем.

2.4. Биотестирование с использованием *Chlorella vulgaris*

Характеристика тест-организма. Хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer, Euchlorophyceae, Chlorophyta) — одноклеточная водоросль шаровидной формы без жгутиков и глазков и сократительных вакуолей. Ее размеры колеблются в пределах 4,2—10,5 мкм. Клеточная оболочка гладкая, двухконтурная. Постенно расположен колоколовидный хлоропласт с одним крахмальным пиреноидом в утолщенной части. В фотосинтетическом аппарате задействованы пигменты: хлорофиллы а и b, а- и 0-каротины и несколько разновидностей ксантофиллов.

У *Ch. vulgaris* обнаружен единственный процесс размножения: внутри оболочки материнской клетки, в результате 2—3, реже 4, делений возникают, соответственно, 4 или 8 (16) автоспор, которые после разрыва общей оболочки уже непосредственно существуют как самостоятельные единицы данного вида. Цикл размножения протекает у *Ch. vulgaris* весьма быстро, этим объясняется способность культуры данной водоросли быстро наращивать

свою биомассу. В природе *Ch. vulgaris* встречается в пресной и соленой воде, а также в почве. *Ch. vulgaris* можно отвести активную роль в качестве первичного продуцента органики (Ботаника с основами экологии, 1979).

Культивирование в лабораторных условиях. 1 способ. В качестве тест-объекта используют одноклеточную зеленую водоросль *Ch. vulgaris*. Выбор этого объекта обусловлен тем, что данная водоросль быстро размножается и легко культивируется (выращивается) на искусственных питательных средах. В качестве питательной среды используется минеральная среда Тамия следующего состава: KNO_3 — 5,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,5; KH_2PO_4 — 1,25, цитрат железа или FeSO_4 — 0,003 г/л. В готовую среду вносят раствор микроэлементов Арнона (2 мл/л среды). Питательную среду и растворы всех солей готовят на дистиллированной воде и не подвергают стерилизации.

Наращивание культуры водоросли производят в специально разработанном для этих целей культиваторе КВ-04. В приборе предусмотрено выращивание в двух отдельных стаканах емкостью 150 мл одновременно двух культур водоросли. Для обеспечения их углекислым газом, за счет растворения содержащегося в воздухе CO_2 , обе суспензии непрерывно перемешиваются магнитными мешалками, смонтированными в отсеках культиватора. В процессе культивирования суспензия водоросли облучается видимым светом люминесцентной лампы DL-9, установленной между стаканами. Постоянная температура культуральной среды, равная $30 \pm 1^\circ\text{C}$, поддерживается автоматическим включением и выключением встроенного вентилятора по команде блока термостабилизации прибора.

Засев водоросли производится с начальной плотностью 0,1—0,15 единиц оптической плотности (D), которая измеряется на входящем в состав лаборатории приборе ИПТ-02. В качестве показателя светопропускания в приборе ИПТ-02 используется величина оптической плотности, регистрируемая в круглой кювете («пенициллиновом» флаконе) на красном свете, который близок по спектру длинноволновому максимуму поглощения хлорофилла. Расчет оптической плотности производится в самом приборе по следующей формуле:

$$D = \lg \frac{I_0}{I_t}, \quad (1)$$

где I_0 — интенсивность светового потока, прошедшего через эталонную кювету с дистиллированной водой;

I_t — интенсивность светового потока, прошедшего через кювету с суспензией водоросли.

Согласно основному закону светопоглощения, между величиной оптической плотности и концентрацией растворенного вещества в измеряемом растворе существует прямо пропорциональная зависимость. Аналогичная связь имеет место между D и количеством клеток в суспензии водоросли. Таким образом, через величину оптической плотности можно оперативно и достаточно точно определить, насколько изменилась численность клеток в процессе роста культуры водоросли. Измерение температуры позволяет производить прибор ИНГ-02 после его переключения в соответствующий режим работы (T°). В качестве критерия токсичности выступает скорость роста *Ch. Vulgaris* (Григорьев, 1999).

2 способ. Водоросли культивируют 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 18—20°C. Питательные растворы: среда Тамия, среда Арнона (состав см. выше), готовят на дистиллированной воде.

Процедура биотестирования. 1 способ. После сбора образцы воды в количестве 200—300 мл доставляются в лабораторию. Перед биотестированием пробы воды отделяются от твердых частиц и других механических примесей путем фильтрования через бумажный фильтр.

Затем:

1) исходная культура водоросли фильтруется через 4 слоя марли и разбавляется 50% средой Тамия до оптической плотности $0,07 \pm 0,01$;

2) полученная суспензия водорослей разливается малым шприцом-дозатором (1 мл) в реакторы культиватора;

3) тестируемые воды вносятся большим шприцом-дозатором (6 мл) в те же реакторы.

В качестве контроля используется дистиллированная вода. Поскольку в тестируемые и контрольные воды добавляется по 6 мл, то на момент биотестирования оптическая плотность суспензии водоросли в реакторах культиватора составляет 0,01. В каждом из вариантов опыта используется по три флакона, которые последовательно, начиная с контрольной пробы, устанавливаются в кассету культиватора со стартовой метки.

Биотестирование проб природной воды проводится при оптимальном режиме ($T = 34\text{—}36^\circ\text{C}$, интенсивность света — 80 Вт/м^2) и скорости вращения кассеты с реакторами — 30 об/мин. Характер воздействия тестируемых вод оценивается путем сравнения суточного прироста численности клеток водорослей в контрольном и опытных вариантах. Контроль за численностью клеток проводится посредством измерения оптической плотности суспензии.

Расчет показателя токсичности (КТ) проводится по формуле:

$$КТ = (D_k - D_t) / D_k, \quad (2)$$

где D_k и D_t — величины оптической плотности контрольного и тестируемого образца, соответственно, после 24 часов культивирования.

Превышение КТ величины 0,2 свидетельствует о токсичности пробы воды (Григорьев, 1999).

2 способ. Методика основана на определении изменения интенсивности размножения водорослей при воздействии токсических веществ, содержащихся в тестируемой воде, по сравнению с контролем. Показателем интенсивности размножения является коэффициент прироста численности клеток водорослей. При биотестировании в колбы емкостью 250 мл наливают по 100 мл контрольной или тестируемой воды. Повторность трехкратная. В каждую колбу пипеткой добавляют по 0,5 мл сгущенной культуры водорослей, по 0,1 мл раствора микроэлементов и тестируемого раствора.

Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, их содержимое тщательно перемешивают и в каждой колбе определяют исходную численность клеток, которая должна составлять в норме 25—50 тыс. кл/мл. Колбы помещают в люминостат или в хорошо освещенное место, защищенное от прямых солнечных лучей.

Через 96 часов биотестирование заканчивают. В каждой колбе учитывают численность клеток для определения наличия острого токсического действия. Для подсчета клеток используют счетную камеру Горяева. Камеру и относящееся 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 край покровного стекла. Камеру заполняют так, чтобы не образовывалось пузырьков воздуха. Избыток суспензии вытесняется по канавкам. Просматривают 16 квадратов по диагонали и все камеры в случае малой численности водорослей. Из каждой колбы просматривают не менее трех проб. По формуле вычисляют количество клеток водорослей в 1 мл суспензии:

$$M = \frac{m}{n \times V} \cdot 10, \quad (3)$$

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

2.5. Биотестирование с использованием *Elodea canadensis* Rich

Характеристика тест-организма. Элодея — представитель погруженных растений, но прикрепленных ко дну корешками. Это тенелюбивое растение, живет на дне неглубоких водоемов. Предпочитает минерализованные озера с плотным донным отложением.

Культивирование в лабораторных условиях. Растения отбирают из естественной популяции условно чистого водоема в начале июня, когда много молодых жизнеспособных побегов. Отбирают зеленые верхушечные побеги длиной 8—10 см, без видимых повреждений и не имеющих боковых отростков и корней.

Отобранные растения помещают отдельно в сосуды с водой, взятой из этого же водоема. В лаборатории элодею размещают в широкие, но неглубокие емкости объемом 10—15 л, где они свободно плавают.

В таких же условиях при комнатной температуре в течение 7—10 суток растения проходят период акклиматизации. Через 10 суток у элодеи образуются боковые отростки и корни. Каждые 2—3 суток производят смену воды для удаления продуктов метаболизма. Воду для проведения опытов берут из незагрязненного участка водоема, процеживают через воронку с ситом (газ № 68), во избежание попадания простейших и других живых организмов, и заливают в аквариум с постоянной продувкой воздуха. Воду для опыта можно использовать только через 4—5 дней после осажде-ния органического вещества.

Процедура биотестирования. До постановки основного опыта необходимо провести предварительный 10-дневный опыт для установления концентраций, при которых токсическое действие проявляется наиболее сильно, т.е. устанавливается диапазон летального действия вещества. Из раствора токсиканта готовят в убывающем порядке не менее 3—6 разведений, отличающихся на порядок, и проводят эксперимент.

Для опыта лезвием срезают верхнюю часть побега элодеи длиной 4 см без боковых отростков и корней. Повреждение растений устанавливают либо визуально, либо с помощью микроскопа. Побеги элодеи в количестве 5 штук помещают в кристаллизаторы с растворами исследуемого вещества в речной воде и с чистой водой (по 1 литру). Сосуды располагают у окон на дневном рассеянном свете, с освещенностью не менее 1500 лк, при температуре 17—22°C. Опыт проводят в трехкратной повторности, продолжительностью не менее 30 суток. Смену опытных растворов проводят в зависимости от стабильности вещества (через 2—6 суток), одновременно меняют воду в контроле. Температуру измеряют утром и вечером, затем вычисляют среднюю температуру дня.

Учет выживаемости и других параметров проводят через каждые пять суток. У элодеи учитывают общее состояние растения (изменение окраски, повреждение точек роста, потеря тургора), число растений (выживаемость), прирост основного, число боковых отростков, длину боковых отростков, число корней, длину корней. Прирост основного побега элодеи вычисляют путем вычитания из длины растения исходных 4 см. Измерения проводят с помощью линейки. Кроме того учитывают показатель суммарного

прироста растений, который составляется из суммы прироста основного побега и длины боковых отростков. Среднее значение показателей рассчитывают на одно растение, прирост основного побега, длину боковых отростков и корней, суммарный прирост выражают в сантиметрах, число боковых отростков, лопастей и корней — в штуках. В качестве критерия эффекта токсичности может быть принято статистически достоверное отклонение значения одной из интегральных характеристик растения при токсическом воздействии от значения соответствующего параметра в контроле.

2.6. Биотестирование с использованием *Lemna minor* L.

Характеристика тест-организма. Ряска малая — представитель растений с плавающими листьями, широко представлен в слабопроточных, стоячих водоемах. Это тенелюбивое растение, устойчивое к низким температурам. Обитает в пресноводных участках с рН от 6,2 до 7,5, не переносит кислой и щелочной среды. В водоемах плавает в виде групп, образующихся в результате вегетативного размножения.

Культивирование в лабораторных условиях. Растения отбирают из естественной популяции условно чистого водоема в начале июня, когда много молодых жизнеспособных побегов. При отборе рясок обращают внимание на цвет растения и используют зеленые популяции рясок без видимых повреждений и имеющие лопасти и корни.

Отобранные растения помещают отдельно в сосуды с водой, взятой из этого же водоема. В лаборатории ряску размещают в емкости объемом 1 л с речной водой. В таких же условиях при комнатной температуре в течение 7—10 суток растения проходят период акклиматизации. Каждые 2—3 суток производят смену воды для удаления продуктов метаболизма. Воду для проведения опытов берут из незагрязненного участка водоема, процеживают через воронку с ситом (газ № 68), во избежание попадания простейших и других живых организмов, и заливают в аквариум с постоянной продувкой воздуха. Воду для опыта можно использовать только через 4—5 дней после осаждения органического вещества.

Процедура биотестирования. До постановки основного опыта необходимо провести предварительный 10-дневный опыт для установления концентраций, при которых токсическое действие проявляется наиболее сильно, т.е. устанавливается диапазон летального действия вещества. Из раствора токсиканта готовят в убывающем порядке не менее 3—6 разведений, отличающихся на порядок, и проводят эксперимент.

В популяции ряски отбирают зеленые растения, имеющие одну сформировавшуюся и одну развивающуюся лопасть и корень с неповрежденным корневым чехликом, корни должны быть относительно одинаковой длины (разница в длине не должна превышать 0,5 см). Повреждение растений устанавливают либо визуально, либо с помощью микроскопа. Ряску в количестве 5 штук помещают в стаканы по 500 мл, с растворами исследуемого вещества в речной воде и с чистой водой. Сосуды располагают у окон на дневном рассеянном свете, с освещенностью не менее 2000 лк, при температуре 17—22°C.

Опыт проводят в трехкратной повторности, продолжительностью не менее 30 суток. Смену опытных растворов проводят в зависимости от стабильности вещества (через 2—6 суток), одновременно меняют воду в контроле. Температуру измеряют утром и вечером, затем вычисляют среднюю температуру дня.

Учет выживаемости и других параметров проводят через каждые пять суток. У рясок отмечают общее состояние растений (изменение окраски, размер лопастей, состояние корней), число растений, число лопастей, число корней, длину корней. Измерения проводят с помощью линейки. В качестве критерия эффекта токсичности может быть принято статистически достоверное отклонение значения одной из интегральных характеристик растения при токсическом воздействии от значения соответствующего параметра в контроле.

2.7. Биотестирование с использованием прорастающих семян растений

Чаще используются мелкие семена (льна, кресс-салата, мака, редиса, укропа). Для достоверной оценки применяют не менее трех тестов с разными видами семян. В тестах используются свежие

семена, так как на лежалых семенах развивается сапрофитная микрофлора и при прорастании в условиях влажных камер (колбы, чашки Петри, пробирки) они могут загнивать и выбывают из опыта. С целью профилактики семена протравливают. Сухие семена погружают в 1% раствор марганцовокислого калия на 0,5 часа, затем промывают дистиллированной водой, используя два слоя марли, обсушивают на фильтровальной бумаге на воздухе.

1 способ. На дно широкогорлой колбы помещают вату или фильтровальную бумагу, выделяющие токсические пары тех или иных веществ, которыми они пропитаны. К пробке на проволоке подвешивают шарообразный комок обильно увлажненной ваты, в который предварительно вдавливают семена тест-растения. Другую колбу без токсичных паров, но с ватой и семенами, используют как контроль. Ставят обе колбы в термостат при температуре 25—26°C до начала прорастания, а затем выставляют на свет. Наблюдают за появлением всходов и ростом проростков (число всходов, разворачивание листочков), а затем измеряют длину и массу каждого проростка.

2 способ. Два фильтра, смоченные 2 мл вытяжки из почвы, или загрязненной водой (в случае очень слабого загрязнения нужна концентрация воды), помещают на дно чашки Петри, раскладывают на них 50 семян, закрывают крышкой, ставят в термостат при температуре 25—26°C. Оценивают степень прорастания семян и величину проростков по отношению к контролю, когда семена в контроле прорастут на 50%. Контроль ставят на дистиллированной воде.

2.8. Биотестирование с использованием *Lumbricus terrestris*

Характеристика тест-организма. Обыкновенный дождевой червь (*Lumbricus terrestris*) достигает 30 см в длину и сантиметра в ширину. Черви живут и питаются в слое подстилки, проникают в почву на глубину 10—20 см. В тундре и тайге выделяют подстилочные и почвенно-подстилочные формы. По образу жизни это ночные животные. Дождевые черви всеядны, они заглатывают огромное количество земли, из которой усваивают органические вещества. Норки черви роют или вертикально, или немного вкось,

практически всегда они выстланы изнутри тонким слоем черной переработанной животными земли.

Установлено, что черви способствуют увеличению содержания фосфора и калия в почве, кроме того, проходя через кишечный тракт червей, земля и растительные остатки склеиваются кальцием — производным углекислого кальция, выделяемого известковыми железками пищеварительного тракта червей. За сутки каждый червь пропускает через свой кишечник количество земли равное массе своего тела, т.е. 4—5 гр. Ежегодно дождевые черви выбрасывают на поверхность земли слой экскрементов толщиной 0,5 сантиметра.

Культивирование в лабораторных условиях. Исследования проводятся на синхронизированной культуре дождевых червей. Для получения синхронизированной культуры из участка леса, не подвергающегося антропогенной нагрузке, выкапывают дождевых червей, которых помещают в тканевые мешочки вместе с почвой, в которой они обитали. Черви переносятся в лабораторию в деревянные или стеклянные емкости площадью 50 м². Высота стенок емкости должна составлять 30 см, высота засыпки земли 20 см, что соответствует биологии червей. Спустя 5—7 суток, в течение которых *Lumbricus terrestris* привыкают к лабораторным условиям существования и начинают размножаться, производят отбор молоди. В лаборатории поддерживают оптимальную температуру 20±2°С, продолжительность светового дня 12—14 ч.

Процедура биотестирования. 1 способ. Оценку токсичности различных соединений для дождевых червей возможно проводить в чашках Петри диаметром 10 см. В них наливают по 30 мл испытуемого раствора или водной вытяжки. Контролем служит отстоянная водопроводная вода. В чашки Петри помещают по пять особей половозрелых червей одинакового размера (80—100 мм) и возраста (3 месяца). В остром опыте (длительностью до 96 часов) учет выживших червей проводят через 1, 6, 24, 48, 72, 96 часов. Проба оценивается как обладающая острой токсичностью, если за 24 ч биотестирования в ней гибнет 50% и более червей по сравнению с контролем.

2 способ. Для изучения отношения червей к различным концентрациям токсикантов используется деревянная установка общей площадью 150×150 см. Общая площадь разбивается на 9 отсеков

площадью 50 м², между отсеками располагаются деревянные перегородки, так чтобы отсеки сообщались между собой у дна. Высота стенок установки и перегородок составляет 30 см, высота засыпки земли составляет 20 см. Расчет концентраций производится на 1 кг земли (в каждом отсеке масса земли составляет 3 кг). В каждый отсек высаживаются по 10 особей дождевых червей, затем на поверхность почвы впрыскиваются исследуемые концентрации. Оценка реакции на токсиканты проводится по количеству червей, оставшихся в отсеке. Благоприятной считается та концентрация, при которой тест-объекты не покидают отсек. Неблагоприятной считается та концентрация, воздействие которой вызывает перемещение 50% червей в отсеки, не содержащие токсикантов, или же с благоприятной концентрацией токсиканта.

2.9. Биотестирование с использованием *Poecilia reticulata* Peters

Характеристика тест-организма. Гуппи — один из распространенных видов аквариумных рыб с ярко выраженным половым деформизмом. Мальки рождаются полностью сформированными и становятся половозрелыми в 4—6 месяцев.

Культивирование в лабораторных условиях. Для содержания гуппи используют термостатируемые аквариумы, обеспечивающие плотность посадки тест-объектов из расчета 1—2 л воды на 1 экз., производителей — 4 л на 1 экз.

Аквариумы размещают в помещении, не содержащем токсических паров или газов, и заполняют водопроводной водой, предварительно отстоянной в течение 3 суток. Воду в аквариумах аэрируют с помощью микрокомпрессоров. Перед размещением рыб аквариумы засаживают мелколистными и плавающими растениями.

Аквариумы освещают ярким верхним светом, для этого используют лампы накаливания или люминесцентные. Кормят тест-объекты 1—2 раза в сутки, производителей — 3—5 раз сухим (дафнии, циклопы) или живым кормом.

Самку, готовую к вымету, помещают в отдельную термостатируемую нерестовую емкость объемом не менее 4 л, заполненную

водопроводной водой с температурой $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и большим количеством мелколистных растений. После окончания вымета самок изолируют, т.к. они поедают свое потомство.

Кормят мальков «пылью», состоящей из инфузорий и коловраток. При отсутствии «пыли» молодь гуппи кормят перетертыми сухими дафниями. Одно-, двухнедельных мальков кормят до 5 раз в сутки, более взрослых — 2—3 раза.

Мальков сортируют по размерам и постепенно переводят из нерестовых аквариумов в «выростные» (вначале объемом в 50 л, а затем — 200 л).

Процедура биотестирования. Для биотестирования используют гуппи в возрасте 1—3 недель, при освещении рассеянным светом с естественной сменой дня и ночи, концентрацией кислорода в воде не менее 4 мг/л и температурой воды 25°C . Гибель рыб в контроле не должна превышать 10%. Объем воды для биотестирования — 20 л.

В аквариум наливают по 50 л контрольной воды или тестируемого раствора. В каждый аквариум помещают по 50 рыб. Воду в контрольных и опытных аквариумах аэрируют с помощью микрокомпрессора. Замену воды в контрольных и опытных аквариумах на свежееотобранную производят через 2 сут. При этом рыб быстро переносят с помощью сачка из одного аквариума в другой. Ежедневно в каждом аквариуме подсчитывают количество выживших рыб и удаляют погибших.

Если при биотестировании длительностью до 96 ч процент погибших рыб в тестируемом растворе по сравнению с контролем равен или больше 50%, тестируемая вода оказывает острое токсическое действие, если меньше 50% — тестируемый раствор не оказывает токсического действия на рыб.

Вывод о наличии хронического токсического действия водного раствора тестируемого вещества делают на основании определения достоверности различия выживаемости рыб в контроле и тестируемой воде. Достоверное снижение выживаемости в тестируемой воде по сравнению с контролем свидетельствует о наличии хронического токсического действия тестируемого раствора на рыб.

2.10. Биотестирование с использованием *Rattus*

Характеристика тест-организма. Крысы относятся к роду *Rattus*, семейству Muridae. Они рождаются голыми, слепыми, глазки их закрыты, ушки прижаты. Масса тела новорожденных крысят колеблется от 4 до 6 г. Живут они 2—2,5 года. Крыс доставляют из питомников в виварий, где они содержатся и разводятся. Уши открываются на 2—4-й день, слух появляется на 0—12-й день. Глаза открываются между 14-м и 17-м днями. Половая зрелость наступает на 40-й день. Продолжительность беременности у самок 20—25 дней.

Культивирование в лабораторных условиях. В вивариях крыс кормят натуральными или брикетированными кормами, к которым добавляют натуральные корма.

Температура воздуха в помещении, в котором содержат крыс, должна быть 18—22°C при влажности 55—65%.

Процедура биотестирования. Исследования проводят на половозрелых виргинных самках беспородных белых крыс, которым на протяжении всего срока беременности выпаивают раствор с тестируемым веществом.

Контрольным животным вводят водопроводную воду. Для получения крыс с известным сроком беременности вечером самцов подсаживают к самкам в соотношении 1:2 (30 самцов и 60 самок). Утром приготавливают нативные мазки вагинального содержимого, которые анализируют под микроскопом.

Показателем оплодотворения самок служит наличие в вагинальных мазках сперматозоидов. На основании анализа мазков в экспериментальную и контрольную группы отбирают по 20 самок.

На 20-е сутки после оплодотворения всех животных умерщвляют (эвтаназию самок осуществляют дислокацией шейных позвонков) и проводят их вскрытие. При этом подтверждают факт беременности. У беременных самок подсчитывают количество желтых тел в яичниках, число мест имплантации в матке, количество живых и резорбированных плодов. На основании этих данных определяют уровень предимплантационной и постимплантационной смертности зародышей.

Предимплантационную смертность определяют по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест

имплантации в матке; постимплантационную смертность — по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов.

Во всех группах определяют индекс плодовитости, равный соотношению числа оплодотворенных самок к числу самок, ссаженных с самцами. Кроме того, определяют индекс беременности самок по соотношению количества беременных самок к оплодотворенным самкам.

Плоды каждого помета тщательно осматривают с целью выявления внешних аномалий развития, отека или кровоизлияний подкожной клетчатки. Затем плоды взвешивают и определяют их краниокаудальный размер (от основания черепа до первого хвостового позвонка), по этим показателям делается вывод о степени доношенности плодов.

После этого 2/3 всех плодов из потомства каждой крысы используют для висцерального (внутреннего) исследования органов, с последующей фиксацией их тел в спирте и просветлением мягких тканей для анализа их скелета, у остальных исследуют внутренние органы.

Достоверность различия между изучаемыми препаратами в контроле и опыте оценивают по t-критерию Стьюдента.

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ ВОД МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

3.1. Физико-географическая характеристика района исследования

Нижневартовский район расположен в средней части Западно-Сибирской равнины, в Ханты-Мансийском автономном округе, между 57° 30' и 63° 05' северной широты и 75° 00' и 86° 03' восточной долготы. Район занимает территорию площадью 11 851 850 га (Лезин, Тюлькова, 1994).

В геологическом отношении Нижневартовский район представляет часть Западно-Сибирской эпипалеозойской плиты, фундамент которой сложен сильно дислоцированными и метафизированными докембрийскими и палеозойскими породами. Платформенный чехол мощностью местами до 3—4 км сложен в основном юрскими и меловыми отложениями, содержащими промышленные многопластовые месторождения нефти, сменяющиеся выше палеогеновыми отложениями. Территория Нижневартовского района находится в центральной части Западно-Сибирской равнины, представленной Среднесибирской низменностью, которая пересекается в междуречье Ваха и Агана Аганским Увалом. На севере эта низменность обрамляется Сибирскими Увалами. Плоский рельеф территории, избыточное увлажнение, наличие пород с низкими фильтрационными свойствами, близкое к поверхности залегание грунтовых вод и слабый их дренаж — все это создало благоприятные условия для широкого развития в пределах озерно-аллювиальных равнин процессов заболачивания и образования озер (Лезин, Тюлькова, 1994; Старков, Тюлькова, 1996).

Нижневартовский район характеризуется ярко выраженным умеренно-континентальным климатом с продолжительной холодной зимой, сильными ветрами и метелями, коротким сравнительно теплым летом, поздними весенними и ранними осенними заморозками. Переходные сезоны, особенно весна, очень короткие, с резкими колебаниями температуры.

В Нижнеартовском районе суммарная солнечная радиация составляет в среднем 250 кДж/см^2 в год. В течение года она сильно изменяется, достигая наибольших значений в июле (62 кДж/см^2), а наименьших — в декабре ($1,7 \text{ кДж/см}^2$). Продолжительность солнечного сияния 1700—1800 часов в год. Некоторое уменьшение его наблюдается в городах из-за большой загрязненности воздуха. Годовой радиационный баланс в теплое время года положительный и составляет 11 кДж/см^2 .

Нижнеартовск входит в зону умеренного ультрафиолетового дефицита. В декабре отмечается биологическая тьма (т.е. нет поступления суммарной ультрафиолетовой радиации), а с ноября по февраль наблюдаются биологические сумерки (нет поступления прямой радиации).

Существенное влияние на изменчивость погоды оказывает открытость территории с севера и юга и близость Арктики. Равнинный рельеф способствует беспрепятственному проникновению с севера на юг в течение всего года холодных арктических масс, а также свободному выносу летом прогретого континентального воздуха из Казахстана и Средней Азии. Климатические компоненты определяют не только компоненты водного баланса — осадки и испарение, но и основные черты внутригодового хода накопления и расходования влагозапасов: образование снежного покрова и его таяние, увлажнение почвогрунтов, пополнение запасов грунтовых вод, потери вод зоны аэрации и насыщения на испарение. Климатические условия определяют, таким образом, главные черты внутригодового режима стока — основные фазы и гидрологические сезоны.

Минеральные соли, содержащиеся в атмосферных осадках (хлориды, с концентрацией в снегах около $0,1 \text{ мг/л}$; сульфаты, со средним содержанием в осадках 2 мг/л) оказывают влияние на формирование химического состава поверхностных вод. Изменение состава воды совершается в результате выпадения на нее карбоната кальция при повышении температуры (Никаноров, 1989).

Большая заболоченность и огромное количество озер также сказываются на формировании климата в теплое время, особенно на формировании теплового режима. Наиболее значительно влияние их поздней весной и в начале лета, когда разливаются реки и наполняются водой озера и болота. Они образуют огромные

сплошные водные пространства, над которыми радиационный баланс увеличивается (Караваева, 1969; Орлова, 1962).

Неравномерное поступление солнечной радиации в течение года, особенности атмосферной циркуляции, открытость территории с севера на юг объясняют суровость термического режима и резкий переход от холода к теплу, и наоборот.

Средняя годовая температура воздуха $-2...-4^{\circ}\text{C}$. Самый холодный месяц в году обычно январь $-21...-22^{\circ}\text{C}$, в отдельные дни почти ежегодно температура ночью понижается до $-42...-48^{\circ}\text{C}$. От января к февралю средние температуры повышаются незначительно (на $2-3^{\circ}\text{C}$), от февраля к марту — более существенно (на $5-7^{\circ}\text{C}$). В апреле еще сохраняется морозная погода. Устойчивый переход средней суточной температуры воздуха через 0°C отмечается в среднем в 3-й декаде апреля на юге и в 1-й декаде мая на севере территории.

Средняя температура июля, самого теплого месяца, составляет 17°C . В отдельные дни летом почти ежегодно температура может повышаться до $25-30^{\circ}\text{C}$. Период с температурами выше 5°C продолжается 130—140 дней. От августа к сентябрю температура уменьшается на $3-7^{\circ}\text{C}$, 10—15 октября отмечается осенний переход через 0°C . Наступление устойчивых морозов приходится на конец октября, а прекращение их — на конец марта — начало апреля.

Среднее годовое количество осадков изменяется от 450 до 650 мм, что намного превышает величину испарения и создает благоприятные условия для заболачивания. В течение года осадки распределяются неравномерно. Основная масса (75—80%) выпадает в теплое время года (Лезин, Тюлькова, 1994).

Все озера Среднего Приобья являются пресными и ультрапресными. Общая минерализация воды внутриболотных озер, которые в описываемом районе составляют более 90% общего числа водоемов, из-за незначительных величин минерализации атмосферных осадков и болотных вод, питающих эти водоемы, очень мала. Она составляет в среднем 20—25 мг/л.

Природные воды характеризуются повышенным содержанием ионов аммония, что связано с их болотным питанием и выносом органики с болотными водами. Наличие нитратных ионов в природных водах связано, преимущественно, с процессами окисления

аммонийных ионов до нитратов в присутствии кислорода и атмосферными осадками, которые поглощают образующиеся при атмосферных электрических разрядах оксиды азота. Нитриты представляют собой промежуточную ступень в цепи бактериальных процессов окисления аммония до нитратов (нитрификация только в аэробных условиях) и, напротив, восстановления нитратов до азота и аммиака (денитрификация — при недостатке кислорода). Сезонные колебания содержания нитритов характеризуются отсутствием их зимой и появлением весной при разложении неживого органического вещества.

Повышенное содержание железа наблюдается в болотных водах, которые служат одним из основных источников питания водоема. Растворенное железо представлено соединениями, находящимися в ионной форме, в виде гидроксокомплексов и комплексов с растворенными неорганическими и органическими веществами природных вод. Наименьшие концентрации железа отмечены в период максимального уровня воды — в июне и в осенний период, когда происходит разбавление богатых железом болотных вод талыми снеговыми и дождевыми водами.

В составе главных ионов в озерах преобладают из анионов гидрокарбонатные и хлоридные ионы, из катионов — ионы натрия. Во многих озерах в составе катионов, кроме натрия, содержится много ионов кальция, реже магния. Водородный показатель в подавляющем большинстве озер (практически во всех внутриболотных) летом колеблется в пределах рН 5,0—6,0, т.е. реакция воды кислая или слабокислая. Зимой значения водородного показателя несколько ниже, чем летом.

Концентрация биогенных элементов (азот, фосфор, кремний) в озерах сильно колеблется по сезонам. Максимальных значений они достигают зимой, когда процесс фотосинтеза отсутствует, минерализация органических остатков и иловых отложений продолжается. Высокие концентрации в воде водоемов гуминовых кислот, ионов аммония, железа и марганца, а также части фенолов, образующихся при разложении растительных остатков, не зависят от антропогенной нагрузки и вызваны влиянием природных факторов, в частности, условиями формирования водотоков на территории района (Тюлькова, 1975).

Самотлорская группа озер лежит на междуречье Ваха и Ватинского Егана, в состав данной группы входят озера: Белое, Кымыл-Эмтор, Окунево, Самотлор, Мертвое, Эмтор, Проточное. Озера неглубокие и хорошо аэрируемые по всей толще, в летний период в большинстве их наблюдается дефицит кислорода. Содержание его в поверхностных слоях — в пределах 5—8 мг/л (иногда даже 2 мг/л). Высокие температуры в летний период (20—25°C) препятствуют растворению кислорода в воде.

Озеро Самотлор самое крупное в Самотлорской группе. До начала освоения Самотлорского месторождения оно имело площадь 63 кв. км, глубину 1,5—3,0 м. В 1968 г. из него была спущена вода по сбросному каналу в р. Люк-Колен Еган, в результате чего произошло нарушение естественного режима озера. В настоящее время оно представляет неглубокий водоем (1,0—1,5 м), с сетью автодорог, вдоль которых проложены трубопроводы. Суммарная площадь зеркала воды составляет 46,07 кв. км. Рыбохозяйственного значения озеро не имеет ввиду его загрязнения нефтью и пластовыми водами.

В геоморфологическом отношении территория Самотлорского месторождения представляет слабодренированную плоскую равнину, занятую обширными болотами с бесчисленным количеством озер, одно из самых крупных — озеро Самотлор.

Ледостав наблюдается в октябре, вскрытие озера происходит во второй декаде мая. Благодаря небольшим глубинам водоем хорошо прогревается. Ход температур воды сглажен и соответствует ходу внешних температур. В зимний период температура у дна составляет 2—3°C, у нижней поверхности льда 0°C. (Лезин, Тюлькова, 1994).

3.2. Сезонная динамика хронической токсичности природных вод

Оценку токсичности исследуемых проб с использованием тест-организмов *Daphnia magna* Straus и *Ceriodaphnia affinis* проводили методом биотестирования в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.3-99 и ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.4-99, ПНД Ф Т 14.1:2:3:4:16-2000).

В течение восьми лет (2002—2009 гг.) проводилось обследование реки Обь методом хронического биотестирования на тест-объектах: дафниях и цериодафниях. Были обследованы точки: 500 м выше сброса устья протоки р. Б.Рязанка, 500 м ниже сброса устья протоки р. Б.Рязанка. Данные участки выбраны с целью отслеживания негативного влияния городских и промышленных стоков на воды реки Обь. Первая точка находится выше по течению, вторая — ниже по течению относительно города Нижневартовска. Кроме того, обследованы следующие участки: точка № 3 — 1000 м выше устья р. Вах, точка № 4 — 1000 м ниже устья р. Вах, точка № 5 — 500 м ниже устья протоки Мулка, точка № 6 — район Речпорта, точка № 7 — стрелка Чехломей—Нижневартовск, точка № 8 — устье протоки р. Б.Рязанка.

Токсикологические анализы проб воды реки Обь в точках 500 м выше сброса устья протоки р. Б.Рязанка и 500 м ниже сброса устья протоки р. Б.Рязанка с использованием тест-объекта *C. affinis* проведены в специализированной лаборатории предприятия МУП «Горводоканал», Нижневартовский отдел филиала ФГУ «ЦЛАТИ по УрФО». Экотоксикологические эксперименты с использованием тест-объекта *D. magna* проводились в химической лаборатории кафедры экологии Нижневартовского государственного гуманитарного университета. Химический анализ проб природных вод озер Самотлорской группы, отобранных для анализов в период с 2002 по 2004 гг., химический анализ проб воды реки Обь с 2002 по 2007 гг. производился в лаборатории Нижневартовского отдела филиала ФГУ «ЦЛАТИ по УрФО».

Для оценки характера зависимости токсичности вод от их химического состава проводили математическую обработку экспериментальных данных с использованием методов корреляционного анализа, представленных в пакетах статистических программ «Microsoft Excel».

При обработке данных исследования токсичности вод по критерию выживаемости использовалась математическая модель повторяющихся независимых экспериментов с двумя исходами (модель Бернулли).

Для обработки данных исследования токсичности вод по критерию плодовитости использовали функцию ТТЕСТ программы Excel из пакета Microsoft Office.

Оценка достоверности различий биопараметров в хроническом опыте с использованием тест-объектов *D. magna* и *C. affinis* при проведении анализов вод реки Обь в период 2004—2007 гг. проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Оценка сезонной динамика хронической токсичности природных вод проводилась по результатам биотестирования *D. magna* и *C. affinis* по критериям выживаемости и плодовитости. Данные экспериментов и результаты их обработки приведены на следующих графиках.

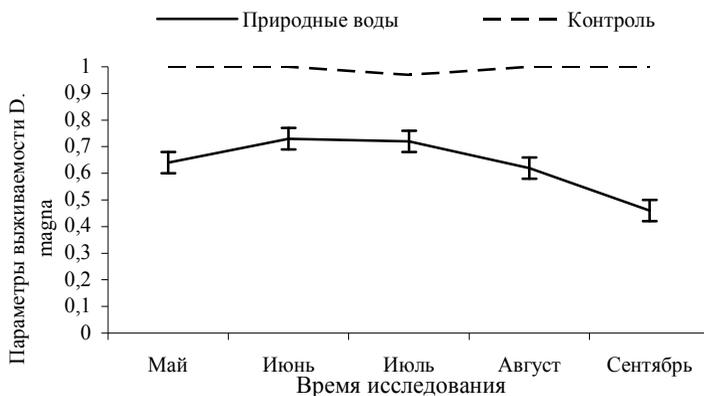


Рис. 3. Сезонная динамика токсичности природных вод оз. Самотлор по критерию выживаемости *D. magna* по результатам биотестирования

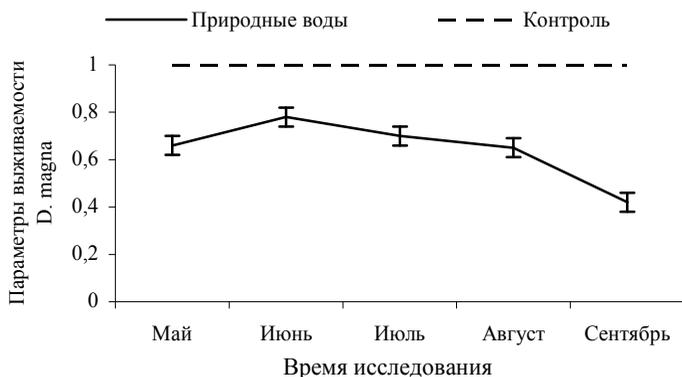


Рис. 4. Сезонная динамика токсичности природных вод оз. Кымыл-Эмтор по критерию выживаемости *D. magna* по результатам биотестирования

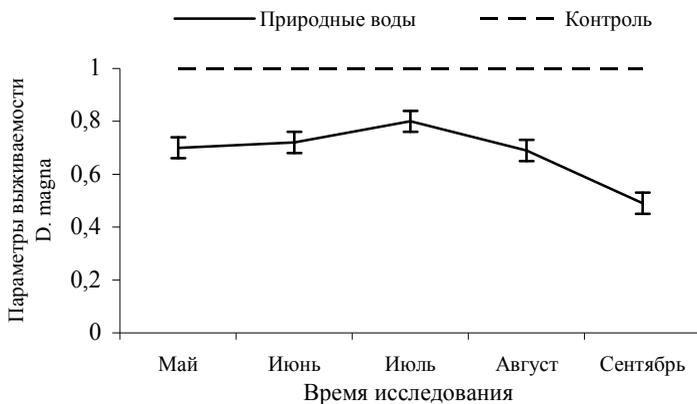


Рис. 5. Сезонная динамика токсичности природных вод оз. Белое по критерию выживаемости *D. magna* по результатам биотестирования

Все исследованные пробы дали результаты, достоверные на уровне 95%, т.е. значение $P < 0,05$.

Воды, отобранные в озере Самотлор, оказывали больший токсический эффект, чем воды из озер Кымыл-Эмтор и Белое, так в мае выживаемость тест-объектов в пробах воды озера Самотлор была на 2% ниже, чем в пробах воды оз. Кымыл-Эмтор, на 6% ниже, чем в пробах воды оз. Белое, в июне разница составила 5% и 1% соответственно. В июле наибольшей токсичностью отличались воды оз. Кымыл-Эмтор, выживаемость тест-объектов в данный период составила 70%, в пробах оз. Самотлор — 72%, оз. Белое — 80%. В августе наибольшая степень токсичности по критерию выживаемости отмечена в оз. Самотлор — 38% гибели особей тест-объекта *D. magna*, в оз. Кымыл-Эмтор — 35%, в оз. Белое — 31%. Критические отметки токсичности зафиксированы в сентябре в пробах воды оз. Кымыл-Эмтор, здесь выживаемость составила 42%, в оз. Самотлор — 46%, оз. Белое — 49%. В целом можно отметить, что «кривые» токсичности вод озер Самотлор, Кымыл-Эмтор и Белое аналогичны.

По критерию плодовитости хроническим токсическим действием обладали пробы № 3 в мае, проба № 2 в августе, пробы № 2, 3 в сентябре. В мае, в контрольных исследованиях, средняя плодовитость *D. magna* в пересчете на 1 самку превышала опытные

показатели в 1,5 раза, в период с июня по август отмечено превышение плодовитости в 1,2 раза, в сентябре плодовитость в сравнении с контролем угнеталась в 1,9 раз, что можно оценивать как хроническое токсическое действие проб воды на тест-объектов.

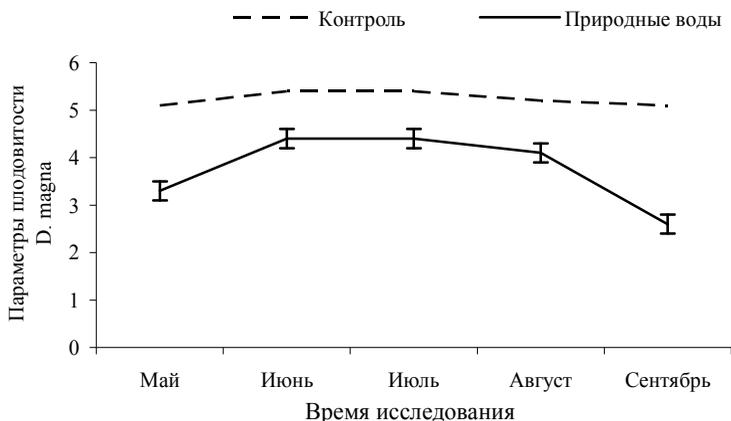


Рис. 6. Сезонная динамика токсичности природных вод оз. Самотлор по критерию плодовитости *D. magna* по результатам биотестирования

При использовании в процедуре биотестирования *S. affinis* эксперименты по оценке токсичности природных вод озер показали несколько иные результаты. Пробы в мае и сентябре обладали хроническим токсическим действием для *S. affinis* (табл. 1—5).

Таблица 1

Плодовитость *S. affinis* в пробах природной воды (время исследования — май)

№ п/п	Общее число молоди каждой самки к концу биотестирования, экз. (X_i)										Ср. знач., $X_{ср.}$	Значимость	Оценка токсичности
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Контроль	8	6	7	6	7	5	8	9	7	—	7,0	0,003	+
Опыт	14	14	13	10	10	7	16	17	10	6	11,7		

«+» — проба оказывает хроническое токсическое действие

«-» — проба не оказывает хроническое токсическое действие

Таблица 2

**Плодовитость *S. affinus* в пробах природной воды
(время исследования — июнь)**

№ п/п	Общее число молоди каждой самки к концу биотестирования, экз. (X_i)										Ср. знач., $X_{ср.}$	Значимость	Оценка токсичности
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Контроль	4	8	4	8	3	3	3	5	4	6	4,8	0,262	-
Опыт	10	6	4	4	5	6	4	6	8	5	5,8		

Таблица 3

**Плодовитость *S. affinus* в пробах природной воды
(время исследования — июль)**

№ п/п	Общее число молоди каждой самки к концу биотестирования, экз. (X_i)										Ср. знач., $X_{ср.}$	Значимость	Оценка токсичности
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Контроль	4	8	4	3	8	3	5	3	4	6	4,8	0,142	-
Опыт	9	9	7	8	2	4	4	5	7	8	6,3		

Таблица 4

**Плодовитость *S. affinus* в пробах природной воды
(время исследования — август)**

№ п/п	Общее число молоди каждой самки к концу биотестирования, экз. (X_i)										Ср. знач., $X_{ср.}$	Значимость	Оценка токсичности
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Контроль	4	8	4	8	3	3	3	5	4	6	4,8	0,096	-
Опыт	7	8	4	6	6	8	6	5	5	6	6,1		

Таблица 5

**Плодовитость *S. affinus* в пробах природной воды
(время исследования — сентябрь)**

№ п/п	Общее число молоди каждой самки к концу биотестирования, экз. (X_i)										Ср. знач., $X_{ср.}$	Значимость	Оценка токсичности
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Контроль	8	6	7	6	5	5	8	7	4	3	5,9	0,002	+
Опыт	3	5	2	1	4	—	6	1	2	3	3,0		

Пробы воды, отобранные в мае и июне, стимулировали процессы размножения тест-объекта *C. affinis*. В мае в опытном варианте плодовитость составила в среднем 11,7 особей (в пересчете на одну партеногенетическую самку за неделю исследования), тогда как в контрольных испытаниях равнялась 7 особям, в июньских исследованиях стимулирующий эффект ослабляется. Пробы в июле и в августе оказывали незначительное действие на плодовитость тест-объекта. Значительное угнетение плодовитости *C. affinis*, в 2 раза по сравнению с контролем, отмечено в исследованиях, проведенных в сентябре.

Таким образом, анализ полученных данных обнаружил наличие значительных различий между чувствительностью *D. magna* и *C. affinis*.

Для выявления степени токсичности предлагается установить отдаленные последствия воздействия токсических веществ через 3—4 поколения, вместе с этим данные исследования помогут решить вопрос о наличии у тест-объектов адаптационных механизмов к токсикантам. В связи с чем были проведены исследования плодовитости *D. magna* в ряду поколений P—F1—F2—F3, в те периоды исследований, когда были выявлены пробы, токсичные по критерию выживаемости тест-объектов.

Результаты исследования хронической токсичности проб воды в ряду последовательных поколений *D. magna* (P — родительское, F1 — первое, F2 — второе, F3 — третье) представлены на рисунках 7—12.

Анализ динамики изменения токсичности природных вод озера показал, что наибольшей токсичностью отличаются пробы воды, отобранные в мае и сентябре, что связано, по-видимому, с сезонным повышением концентрации загрязнителей в ливневых водах. В пробе, отобранной в середине мая, для *C. affinis* отмечалось значительное увеличение плодовитости рачков по сравнению с контролем, плодовитость *D. magna* в этот период была угнетена. Вода, отобранная в сентябре, оказывала достоверное угнетающее действие на тест-объекты ($P < 0,05$), которое выражалось в снижении плодовитости рачков.

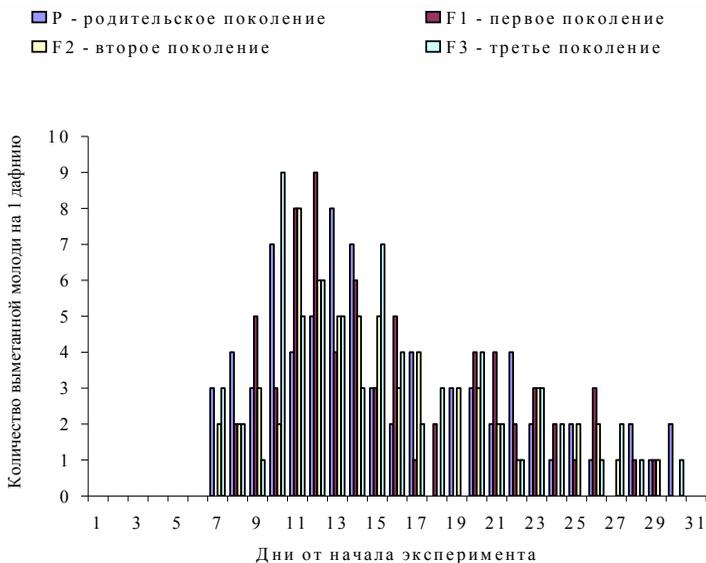


Рис. 7. Динамика плодовитости *D. magna* в ряду поколений P-F1-F2-F3 в контрольных испытаниях (время исследования — май)

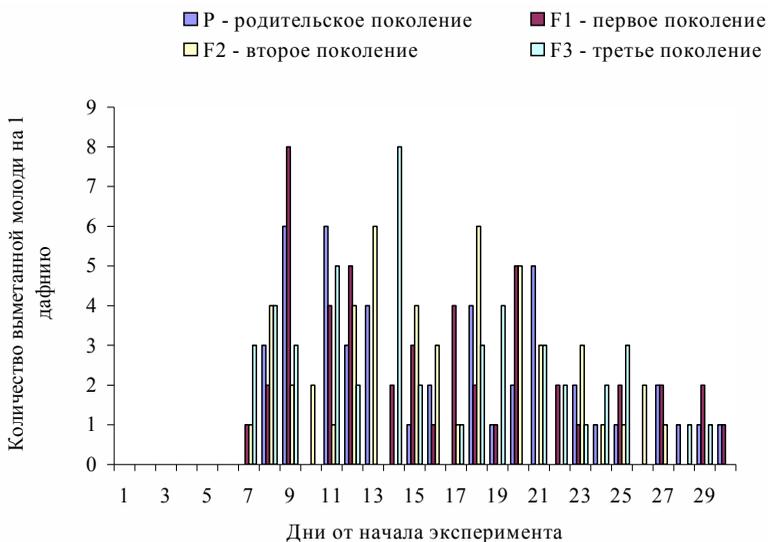


Рис. 8. Динамика плодовитости *D. magna* в ряду поколений P-F1-F2-F3 в пробе природной воды (время исследования — май)

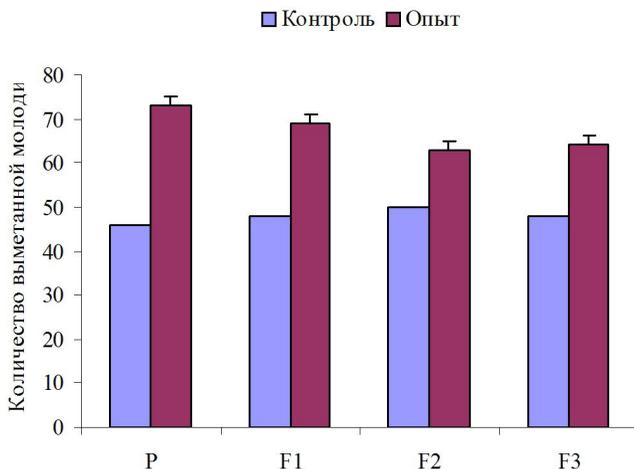


Рис. 9. Среднемесячная плодовитость *D. magna* в ряду поколений P–F1–F2–F3 (время исследования — май)

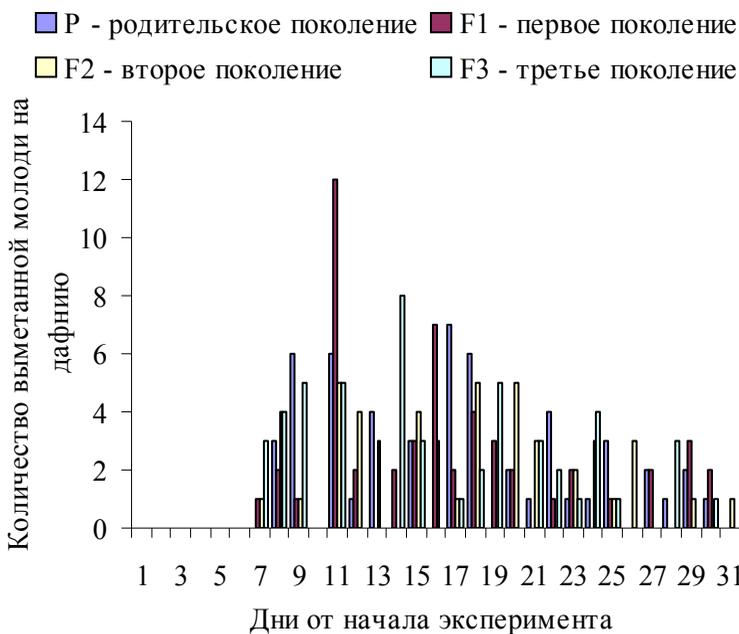


Рис. 10. Динамика плодовитости *D. magna* в ряду поколений P-F1-F2-F3 в контрольных испытаниях (время исследования — сентябрь)

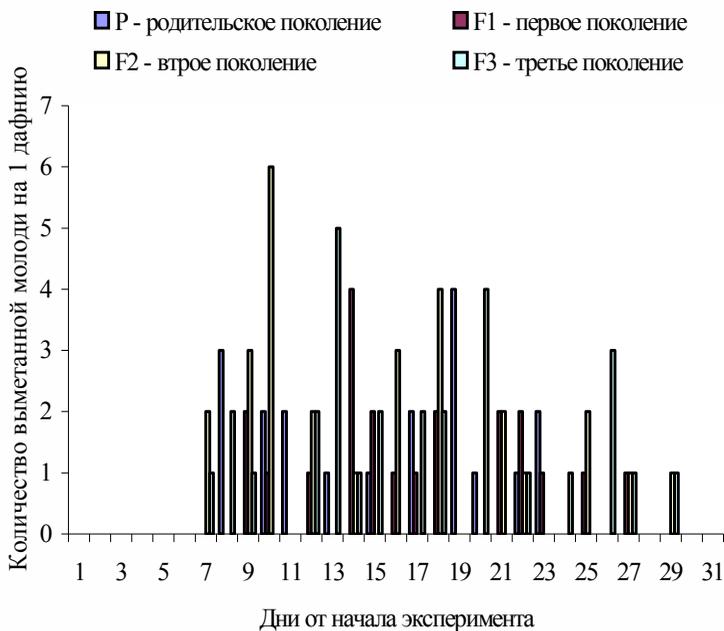


Рис. 11. Динамика плодовитости *D. magna* в ряду поколений P-F1-F2-F3 в пробе природной воды (время исследования — сентябрь)

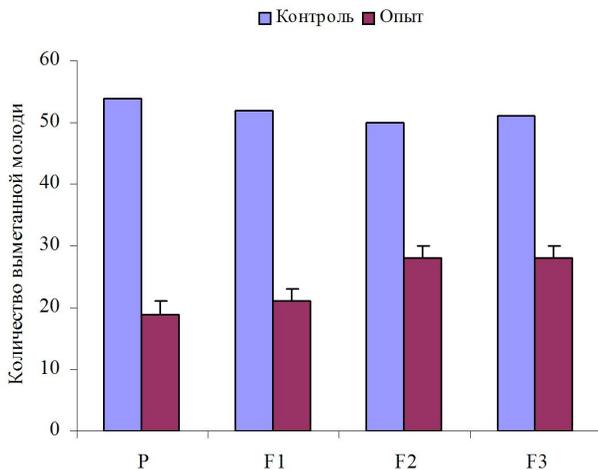


Рис. 12. Среднемесячная плодовитость *D. magna* в ряду поколений P - F1 - F2 - F3 (время исследования — сентябрь)

В хронических экспериментах в ряду поколений, в поколениях F2 и F3, в исследованиях, проводимых в сентябре, отмечается устойчивая тенденция к ослаблению спада плодовитости, в поколениях F2 и F3, в исследованиях, проводимых в мае, стимулирующий эффект снижается, показатели плодовитости стабилизируются, что говорит о включении адаптивных механизмов у тест-объектов.

Результаты по выживаемости дафний в условиях хронического эксперимента под воздействием исследованных токсикантов показали, что отклонение для четырех поколений по этому показателю не превышало 25%. Такая величина отклонения выживаемости от контрольных величин является допустимой для дафний, так как они быстро растут, партеногенетически размножаются, имеют короткий жизненный цикл. Для *D. magna* характерны ярко выраженные волны жизни. По этим причинам у *D. magna* возможна компенсация выживаемости.

Хронические эксперименты на поколениях рачков дают возможность рассматривать адаптивные изменения, как фенотипические, возникающие в результате прямого действия среды на организм, так и генотипические, передающиеся по наследству.

Для установления различий в уровне плодовитости в поколениях используется функция ТЕСТ программы Excel из пакета Microsoft Office. В качестве первой выборки использовали данные, полученные в контрольной группе за первую неделю наблюдения за организмами. Вычисляли суммарное число потомков от каждой из десяти особей. В качестве второй выборки использовали данные из опытной группы, полученные аналогичным образом. Средняя плодовитость определялась в пересчете на одну партеногенетическую самку. Результаты расчетов представлены в таблицах 6—9.

В контрольных группах различия в плодовитости статистически незначимы на уровне 5% ($P > 0,05$). Считаем, что уровень не зависит от поколения. В опытных группах в большинстве случаев различия в плодовитости статистически значимы на уровне 5%. По нашему мнению, это означает, что в ряду поколений идут адаптивные процессы, связанные с влиянием среды. Во всех случаях различия между плодовитостью во втором и третьем поколениях статистически значимы на уровне 5% ($P < 0,05$). Это означает,

что адаптивные процессы начинаются уже во втором поколении и продолжаются в третьем и четвертом.

Таблица 6

Суммарное число потомков от каждой из десяти особей D. magna за первую неделю наблюдения

Поколения	Контрольная группа										Ср. плодovitость	Значимость	Отличие
	Дата учета: май												
	Исходные самки												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
P	18	17	19	18	22	14	19	18	17	18	18	—	—
F1	23	23	25	18	20	21	17	15	21	17	20	0,114 (незначимо)	нет
F2	17	16	14	18	18	17	17	15	17	19	17	0,121 (незначимо)	нет
F3	18	19	18	17	14	16	20	8	20	20	17	0,092 (незначимо)	нет

- значимость — значение функции ТТЕСТ
- «нет» — отличия от предыдущего поколения нет,
- «есть» — отличие от предыдущего поколения есть

Таблица 7

Суммарное число потомков от каждой из десяти особей D. magna за первую неделю наблюдения

Поколения	Опытная группа										Ср. плодovitость	Значимость	Отличие
	Дата учета: май												
	Исходные самки												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
P	26	32	32	20	14	22	34	28	28	24	26	—	—
F1	26	21	23	25	20	27	29	33	33	33	27	0,694 (незначимо)	нет
F2	18	29	24	19	17	27	17	26	28	25	23	0,081 (незначимо)	нет
F3	27	27	24	23	29	27	29	32	23	29	27	0,039 (значимо)	есть

Таблица 8

Суммарное число потомков от каждой из десяти особей *D. magna* за первую неделю наблюдения

Поклоения	Контрольная группа										Ср. плодo-витость	Значимость	Отличие
	Дата учета: сентябрь												
	Исходные самки												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
P	16	14	15	22	21	12	19	18	14	19	17	–	–
F1	20	14	18	15	14	17	15	23	24	20	18	0,529 (незначимо)	нет
F2	12	11	11	11	18	18	18	23	18	10	15	0,120 (незначимо)	нет
F3	17	13	20	12	21	22	14	16	14	21	17	0,294 (незначимо)	нет

Таблица 9

Суммарное число потомков от каждой из десяти особей *D. magna* за первую неделю наблюдения

Поклоения	Опытная группа										Ср. плодo-витость	Значи-мость	Отличие
	Дата учета: сентябрь												
	Исходные самки												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
P	6	7	6	11	4	4	5	8	10	9	7	–	–
F1	2	2	4	3	4	6	5	4	5	5	5	0,004 (значимо)	есть
F2	11	14	13	15	12	13	16	15	16	9	11	0,000 (значимо)	есть
F3	6	7	9	6	10	7	5	6	7	7	8	0,000 (значимо)	есть

Качественный анализ динамики плодовитости проводили с использованием данных эксперимента на четырех последующих поколениях, для чего произвели усреднение количества потомков по каждому поколению в пересчете на одну самку. Таким образом, сглаживаются случайные погрешности экспериментов и выявляется динамика плодовитости в зависимости от возраста самки. Получив эти данные для контрольной и опытной групп, построили графики (рис. 13—14).

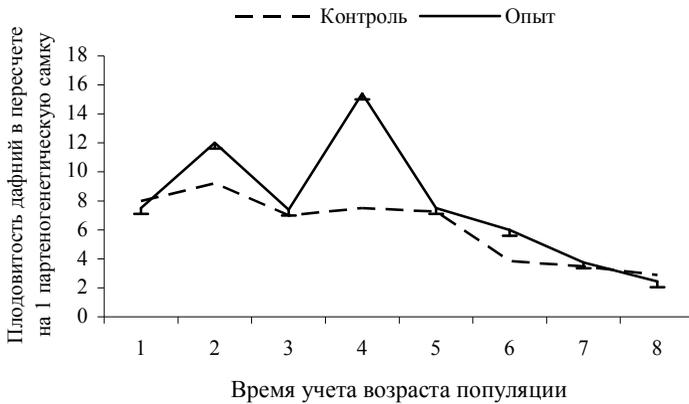


Рис. 13. Динамика плодовитости четырех последовательных поколений *D. magna* в исследованиях, проведенных в мае по итогам биотестирования

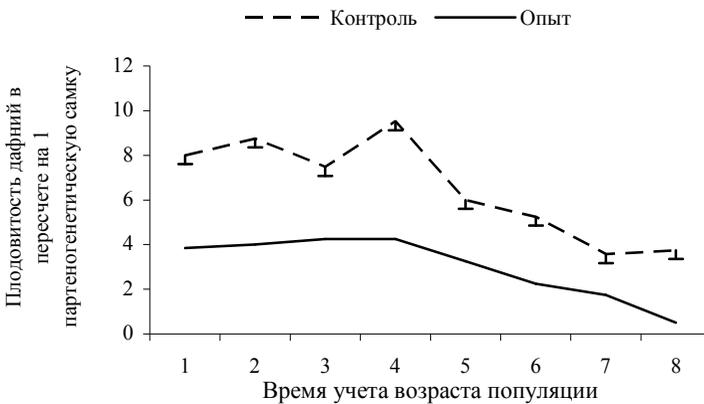


Рис. 14. Динамика плодовитости четырех последовательных поколений *D. magna* в исследованиях, проведенных в сентябре

Плодовитость — более изменчивый показатель во времени, чем выживаемость. Она изменяется и в течение жизни особи, в зависимости от возраста, и от поколения к поколению. Однако общая тенденция колебаний имеет определенную направленность. Кривые на графиках показывают, что во всех исследованиях в контрольных и опытных вариантах отмечены аналогичные «кривые» плодовитости. Анализ результатов исследований, проведенных в мае, позволяет выявить пики и спады плодовитости

тест-объектов в зависимости от возраста самок. Первый пик плодовитости приходится на 10—12-дневный возраст, второй пик — на 17—19-дневный. В опытном варианте исследований, проведенных в сентябре, «волны» плодовитости сглажены, однако для них так же, как и для контрольных групп, характерно повышение количества молоди в кладке к середине месяца, что соответствует 15—18-дневному возрасту самки, затем плодовитость снижается и достигает минимума к концу месяца, что соответствует 25—30-дневному возрасту самки. Это может свидетельствовать об отсутствии серьезных патологий в репродуктивной функции *D. magna*.

В течение восьми лет (2004—2009 гг.) проводилось обследование реки Обь методом хронического биотестирования на тест-объектах: дафниях и цериодафниях. Были обследованы точки: 500 м выше сброса устья протоки р. Б.Рязанка, 500 м ниже сброса устья протоки р. Б.Рязанка. Обследование проводилось круглогодично, обобщенные данные в рисунках приведены поквартально.

В хронических опытах с *D. magna* критерием токсичности по показателю плодовитости являлось достоверное снижение показателей в тестируемой воде по сравнению с контролем за период опыта.

Оценка достоверности различий биопараметров в хроническом опыте проводилась с использованием критерия Стьюдента.

По результатам исследования в 2004 г. проб воды реки Обь в точке № 1, 500 м выше сброса устья протоки р. Б.Рязанка, данные представлены в таблице 10. В первом квартале обнаружена хроническая токсичность, поскольку функции ТЕСТ меньше 0,05, что соответствует уровню значимости 5%. Различие уровней загрязненности для контрольной группы и опытной группы статистически достоверно, снижение плодовитости дафний в сравнении с контролем достоверно, следовательно, исследуемая вода оказывает на дафний хроническое токсическое действие. В третьем квартале значение $P < 0,05$, выявлена стимуляция плодовитости 22%, т.е. положительная тест-реакция дафний на воздействие токсикантов, следовательно, исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие. Во втором квартале отмечена незначительная 5%-ная, стимуляция плодовитости тест-объектов. Вода, отобранная в четвертом квартале, токсичной не являлась.

Таблица 10

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *D. magna* в точке № 1

Квартал	Среднее количество выметанной молоди в пересчете на одну исходную самку		Значимость	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Тестируемая вода			
2004 г.					
I	11,6	6,2	0,047401	–	+
II	9,9	10,4	0,693968	5	–
III	18,1	22,2	0,013952	22	+
IV	17,8	16,0	0,430427	–	–
2005 г.					
I	19,9	15,8	0,089366	–	–
II	16,1	20,3	0,003785	26	+
III	20,3	20,3	1	–	–
IV	19,6	13,5	0,0002	–	–
2006 г.					
I	21,7	14,1	0,008579	–	+
II	18,9	17	0,629972	–	–
III	24,6	13,2	0,002809	–	+
IV	23,3	18,4	0,185807	–	–
2007 г.					
I	21,2	17,9	0,053626	–	–
II	20,7	22,9	0,24583	10	–
III	17,9	21,4	0,007779	19	+
IV	20,1	17,3	0,182739	–	–
2008 г.					
I	19,1	19,6	0,655942	–	–
II	22,1	22,1	0,989245	–	–
III	17,6	23,1	0,030596	17	+
IV	18,7	14,7	0,134769	–	–
2009 г.					
I	18,1	19,4	0,422068	7	–
II	20,6	19,5	0,622145	–	–
III	22,3	25,8	0,040952	15	+
IV	18,4	14,3	0,004043	–	+

Таблица 11

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *D. magna* в точке № 2

Квартал	Среднее количество выметанной молоди в пересчете на одну исходную самку		Значимость	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Тестируемая вода			
2004 г.					
I	11,6	22,3	0,001137	46	+
II	9,9	16,9	0,005956	70	+
III	18,1	17,0	0,315986	–	–
IV	17,8	10,9	0,02704	–	+
2005 г.					
I	19,9	16,3	0,080377	–	–
II	16,1	20,5	0,001635	27	+
III	20,3	12,4	0,000203	–	+
IV	19,6	18,1	0,263698	–	–
2006 г.					
I	11,7	18,5	0,087958	–	–
II	8,9	22,3	0,044086	150	+
III	24,6	13,0	0,004453	–	+
IV	13,0	19,7	0,070034	–	–
2007 г.					
I	21,2	14,3	0,004114	–	+
II	20,7	23,9	0,03133	15	+
III	19,2	15,6	0,023785	–	+
IV	20,1	22,3	0,331391	9	–
2008 г.					
I	19,1	18	0,609965	–	–
II	22,1	20,2	0,198649	–	–
III	17,6	24,2	0,00134	41	+
IV	18,7	23,6	0,080887	27	–
2009 г.					
I	18,1	15,3	0,068692	–	–
II	20,6	14,7	0,04525	–	+
III	22,3	26,6	0,00905	19	+
IV	18,4	16,6	0,076135	–	–

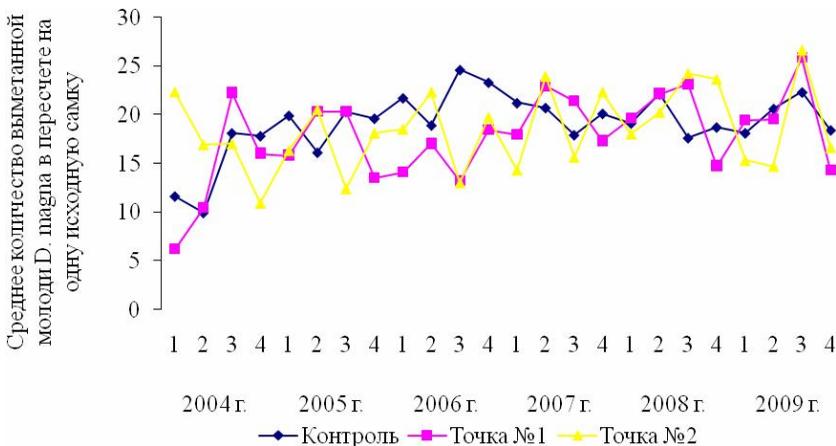


Рис. 15. Сезонная динамика токсичности вод реки Обь по критерию плодовитости *D. magna* по результатам биотестирования в хронических опытах

По результатам исследования 2005 г., в первом квартале выявленные различия в плодовитости дафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, значение $P > 0,05$, исследуемая вода не оказывает на дафний хроническое токсическое действие. Во втором квартале выявленные различия в плодовитости тест-объектов достоверны, значение $P < 0,05$, стимуляция плодовитости составила 26%, следовательно, исследуемая вода оказывала хроническое токсическое действие. В третьем и четвертом квартале токсичность воды не зарегистрирована.

По результатам исследования в 2006 г., зарегистрировано достоверное угнетение плодовитости тест-объектов в сравнении с контролем в первом и третьем квартале, в первом квартале значение $P = 0,008579$, плодовитость снизилась в 1,5 раза, в третьем — значение $P = 0,002809$, плодовитость угнеталась в 1,8 раз. Во втором квартале не отмечено ни значительного угнетения, ни превышения критерия плодовитости дафний опытной группы в сравнении с контрольной группой. В четвертом квартале вода, отобранная для пробы, токсичное действие на дафний не оказывала, так как снижение плодовитости тест-объектов не достоверно.

Анализ проб воды, отобранных в 2007 г., показал отсутствие токсичности в первом и четвертом квартале, токсичность проб

воды отмечена в третьем квартале, значение $P < 0,05$, стимуляция плодovitости 19%. Во втором квартале различия в тестируемой воде и контроле не достоверны, значение $P > 0,05$, стимуляция плодovitости $< 30\%$.

Вода, отобранная для исследования в первом, втором, четвертом кварталах 2008 г., не оказывала токсичного действия на тест-объекты. Пробы воды, отобранной для анализа в третьем квартале, оказывали стимулирующий эффект на тест-объекты, который составил 17%, результаты исследований можно считать достоверными, т.к. критерий значимости оставил 0,030596 единиц.

Первый и второй квартал 2009 г. отличался отсутствием токсического эффекта воды на тест-объекты, однако вода, отобранная для биотестирования в первом квартале, все же вызывала незначительный, 7%-ный, стимулирующий эффект на плодovitость дафний. Воды третьего и четвертого периода 2009 г. показали себя токсичными при биотестировании, причем в третьем периоде они оказывали стимулирующий эффект (плодovitость в опытной группе на 15% выше, чем в контрольной), а в четвертом — угнетающий эффект на плодovitость дафний.

По результатам исследования проб воды реки Обь в точке № 2 в районе поселка Дивный в 2004 г., в первом квартале, как видно из таблицы 11, обнаружена хроническая токсичность, результаты достоверны на уровне 95%, т.е. значение $P < 0,05$, выявлена стимуляция плодovitости 46%, т.е. положительная тест-реакция дафний на воздействие токсикантов. Во втором квартале стимуляция плодovitости составила более 30%, что говорит о присутствии токсического эффекта. Третий квартал характеризовался незначительным спадом уровня плодovitости дафний, токсический эффект в этот период не был отмечен. В четвертом квартале спад плодovitости усилился, исследуемая вода оказывает на дафний хроническое токсическое действие.

По результатам исследования 2005 г., в первом и четвертом квартале зарегистрировано незначительное снижение плодovitости тест-объектов в сравнении с контрольной группой. В третьем квартале зарегистрировано значительное, в 1,6 раз, достоверное, поскольку значение $P < 0,05$, снижение плодovitости тест-объектов в сравнении с контрольной группой. Вода, отобранная для проб во втором квартале, характеризовалась наличием стимулирующего

плодовитость эффекта, стимуляция плодовитости составила 27%, а также наличием токсического эффекта, результаты достоверны на уровне 95%, т.е. значение $P < 0,05$.

По результатам исследования в 2006 г. зарегистрировано незначительное, не достоверное, снижение плодовитости тест-объектов в сравнении с контрольной группой в первом и четвертом квартале. Второй квартал характеризовался наличием стимулирующего плодовитость эффекта, стимуляция плодовитости составила 150%, а также наличием токсического эффекта, $P < 0,05$. Пробы воды в третьем квартале оказывали на дафний токсический эффект, выражающийся в достоверном, 95%-ном, в сравнении с контролем, угнетении плодовитости, т.е. значение $P < 0,05$. В этот период плодовитость дафний в опытной группе была ниже в 1,5 раз, чем в контрольной группе.

Анализ проб воды, отобранных в 2007 г., показал отсутствие токсического эффекта лишь в четвертом квартале, в указанный период отмечен незначительный эффект стимулирования плодовитости $< 30\%$, во втором квартале указанный эффект также наблюдался и составил 15%, $P = 0,03133$, что говорит уже о наличии токсического эффекта. В первом и третьем квартале результаты достоверны на уровне 95%, т.е. значение $P < 0,05$; плодовитость дафний снижена в сравнении с контролем в 1,5 и 1,2 раза соответственно, следовательно, вода оказывает токсический эффект.

Вода, отобранная в первом и втором периоде для биотестирования в 2008 г., не вызывала ни стимуляции плодовитости, ни достоверного угнетения плодовитости дафний, в отличие от третьего периода, когда отмечен значительный, 41%-ный, стимулирующий плодовитость эффект, а следовательно, и достоверный токсический эффект. В четвертом квартале вода сохраняет свою способность стимулировать плодовитость дафний, однако токсического эффекта не производит, т.к. стимуляция плодовитости $< 30\%$, $P > 0,05$.

2009 г. характеризуется наличием токсического воздействия вод р.Обь, отобранных для биотестирования, на тест-объекты во втором и третьем квартале, причем во втором квартале отмечен достоверный угнетающий плодовитость эффект, $P < 0,05$, в третьем — достоверный стимулирующий эффект проб воды р.Обь, отобранной для тестирования.

Таблица 12

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 1

Квартал	Ср. кол-во выметанной молоди в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	7,5	7,9	2.10	-0.267	0	5.3	-
II	6,6	6,8	2.10	-0.118	0	3	-
III	8	10,5	2.10	-2.126	0	31.3	+
IV	7,8	9,4	2,02	-0,47	10	20,5	-
2005 г.							
I	9,9	10,4	2.10	-0,271	0	5	-
II	9,4	7,5	2.02	1,211	0	-	-
III	7,1	1,6	2.10	3.854	0	-	+
IV	6,7	10,3	2.02	-4,757	10	53,7	+
2006 г.							
I	9,4	7,5	2.02	1,211	0	-	-
II	9,1	13,4	2.02	-4,012	10	47,3	+
III	6,9	10,4	2.02	-4,982	10	50,7	+
IV	9,4	14,6	2.02	-3,978	10	55,3	+
2007 г.							
I	6,4	8,1	2.02	-1,734	0	26.6	-
II	10,7	12,9	2.02	-1.89	10	20,6	-
III	8,0	4,2	2.02	2,41	0	-	+
IV	10,1	17,8	2,02	-4,47	10	76,2	+
2008 г.							
I	9,2	9,7	2.02	-0,37	0	5	-
II	6,7	7,2	2.02	-0,66	0	7	-
III	8,9	12,4	2.02	-3,59	0	39	+
IV	7,3	6,0	2.02	1,47	0	-	-
2009 г.							
I	9,0	9,9	2.02	-1,39	0	10	-
II	11,1	15,0	2.02	-3,17	0	35	+
III	11,7	14	2.02	-2,10	0	20	-
IV	8,4	4,3	2.02	2.41	0	-	+

Таблица 13

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 2

Квартал	Ср. кол-во выметанной молоди в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	7,5	7,0	2.10	0.329	0	–	–
II	6,6	6,9	2.10	–0.328	0	4,5	–
III	8	11,7	2.10	–3.126	0	46.3	+
IV	7,8	8,0	2,02	–0,19	0	2,56	–
2005 г.							
I	9,9	8,7	2.10	0,497	0	–	–
II	9,4	10,6	2.02	–0,723	0	12,8	–
III	7,1	2,4	2.10	3,112	10	–	+
IV	6,7	10,5	2.02	–4.230	10	56,7	+
2006 г.							
I	9,4	10,6	2.02	–0.736	10	12,8	–
II	9,1	13,4	2.02	–3.451	0	47,3	+
III	6,9	8,9	2.02	–3.755	0	30,0	+
IV	9,4	16,3	2.02	–4.848	10	73,4	+
2007 г.							
I	6,4	8,7	2.02	–2,746	0	35,9	+
II	10,7	12,5	2.02	–1,46	0	16,8	–
III	8,0	7,6	2.02	0,28	0	–	–
IV	10,1	15,8	2,02	–2,97	0	56,4	+
2008 г.							
I	9,2	8,6	2.02	0,49	10	7	–
II	6,7	7,8	2.02	–1,32	0	16	–
III	8,9	15,1	2.02	–5,88	10	70	+
IV	7,3	8,6	2.02	–1,43	0	18	–
2009 г.							
I	9,0	9,6	2.02	–0,97	10	7	–
II	11,1	15,5	2.02	–4,79	0	40	+
III	11,7	9,6	2.02	1,67	0	–	–
IV	8,4	16,6	2.02	–4.148	10	80	+

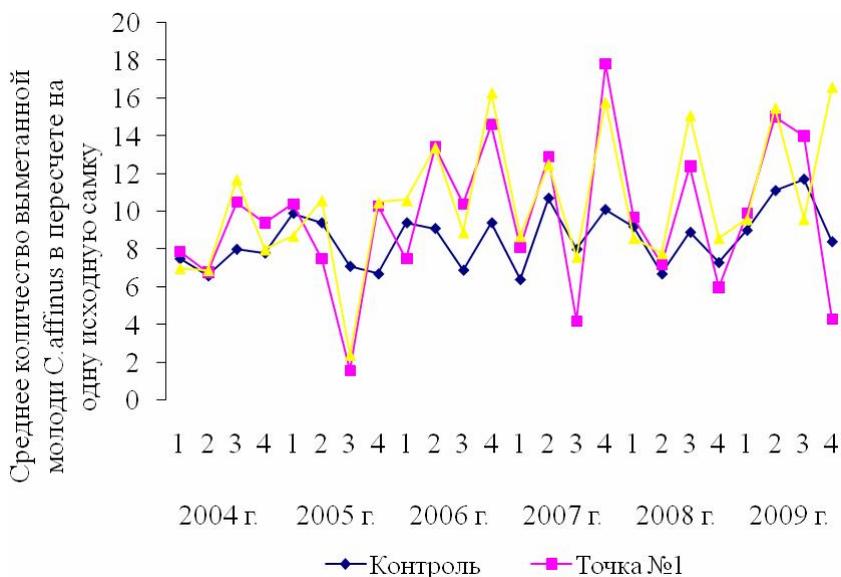


Рис. 16. Сезонная динамика токсичности вод реки Обь по критерию плодовитости *Ceriodaphnia affinis* по результатам биотестирования в хронических опытах

Определение хронической токсичности для тест-объекта *C. affinis* проводилось по двум критериям: гибель 20 и более процентов, достоверное отклонение плодовитости от контроля (норма <30%). Продолжительность опыта 7 дней.

По результатам исследования 2004 г. в первом квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ (-0.267 ; $0.329 < 2.10$) в точке исследования № 1 и № 2 соответственно, стимуляция плодовитости < 30%, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. Во втором квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ (-0.118 ; $-0.328 < 2.10$), стимуляция плодовитости < 30%, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. В третьем квартале $T_g < T_{st}$ (-2.126 ; $-3.126 < 2.10$), выявлена стимуляция плодовитости 46,3%, т.е. положительная тест-реакция цериодафний на воздействие токсикантов, следовательно, исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие.

В четвертом квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ ($-0,470; -0,190 < 2,02$), стимуляция плодовитости $< 30\%$, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие.

По результатам исследования 2005 г. в первом квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ ($-0,271; 0,497 < 2,10$), стимуляция плодовитости $< 30\%$, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. Во втором квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ ($1,211; -0,723 < 2,02$), стимуляция плодовитости $< 30\%$, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. В третьем квартале, как видно из рисунка 16, обнаружена хроническая токсичность, поскольку критерий достоверности больше, чем критерий Стьюдента, $T_g > T_{st}$ ($3,854, 3,112 > 2,10$), снижение плодовитости цериодафний в сравнении с контролем достоверно, следовательно, исследуемая вода оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. В четвертом квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ ($-4,757; -4,230 < 2,02$), выявлена стимуляция плодовитости $53,7\%$ и $56,7\%$, следовательно, исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие на цериодафний.

По данным 2006 г. в первом квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ ($1,211; -0,736 < 2,02$) в точке исследования № 1 и № 2 соответственно, стимуляция плодовитости $< 30\%$, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. Как видно из графика, во втором, третьем и четвертом кварталах исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие на цериодафний, выявлена стимуляция плодовитости более 30% .

По результатам исследования 2007 г. в первом квартале выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$ ($-4,47; -2,97 < 2,02$); выявлена $35,9\%$ -ная (норма 30%) стимуляция плодовитости в точке

исследования № 2 в районе поселка Дивный, ниже по течению реки Обь относительно города Нижневартовска, следовательно, исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие на цериодафний. Во втором квартале в точке исследования № 1 выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле не достоверны, $T_g < T_{st}$, стимуляция плодовитости $< 30\%$, следовательно, исследуемая вода не оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. В третьем квартале в точке исследования № 2 выявленные различия в плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле достоверны, $T_g > T_{st}$, следовательно, исследуемая вода оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. В четвертом квартале исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие на цериодафний, выявлена стимуляция плодовитости 76,2% и 56,4%.

Вода, отобранная в первом и втором периоде, для биотестирования в 2008 г., как в точке исследования № 1, так и в точке исследования № 2 вызвала стимуляции плодовитости цериодафний, однако данный эффект не превысил 30%. В отличие от третьего периода, когда стимулирующий плодовитость эффект составил 39% в первой точке исследования и 70% во второй точке исследования, что говорит о наличии достоверного токсического воздействия. В четвертом квартале вода сохраняет свою способность стимулировать плодовитость дафний в точке исследования № 2, однако токсического эффекта не производит, т.к. стимуляция плодовитости $< 30\%$, $T_g < T_{st}$ (1,47; $-1,43 < 2,02$), в точке исследования № 1 не отмечен ни стимулирующий, ни угнетающий эффект.

2009 г. характеризуется наличием токсического воздействия вод р. Обь, отобранных для биотестирования, на тест-объект — *C. affinis* во втором квартале и четвертом квартале. Достоверный стимулирующий эффект проб воды р. Обь, отобранной для тестирования, составил 35% и 40%, $T_g < T_{st}$ ($-3,17$; $-4,79 < 2,02$) в точке исследования № 1 и № 2 соответственно, в четвертом квартале в точке № 2 — 80%, $T_g < T_{st}$ ($-4,148 < 2,02$). В четвертом квартале в точке исследования № 1 выявлено достоверное угнетение плодовитости цериодафний в тестируемой воде и контроле, $T_g > T_{st}$, следовательно, исследуемая вода оказывает на цериодафний хроническое токсическое действие. В другие периоды 2009 г. токсический эффект не отмечался, хотя можно заметить, что в точке

исследования № 1 в первом, втором, третьем периодах, в точке исследования № 2 в первом, во втором, в четвертом кварталах плодовитость *C. affinis* стимулируется.

Определение хронической токсичности по результатам исследования экспериментов с 2004 по 2009 гг. было проведено по достоверному отклонению от контроля и стимуляции плодовитости (норма < 30%). В исследуемой воде хроническую токсичность вызывают токсичные вещества антропогенного и природного происхождения. Эти вещества вызывают как угнетение тест-объектов, так и положительную тест-реакцию, вызывающую стимулирование плодовитости.

Эффект стимулирования плодовитости в опытах с тест-объектами *D. magna* наблюдался в 28% случаев, в опытах с тест-объектами *C. affinis* — в 61% случаев. Результаты экспериментов с использованием *D. magna* в 33% случаев подтверждают результаты экспериментов с использованием *C. affinis*, что доказывает необходимость проведения токсикологических экспериментов на нескольких тест-объектах. В точке исследования № 1, 500 м выше сброса устья протоки р. Б.Рязанка, зарегистрировано 15% проб, обладающих токсичностью по показателю плодовитости для тест-объекта *D. magna*, в точке исследования № 2, 500 м ниже сброса устья протоки Б.Рязанка, 22% проб обладали токсичностью. Для тест-объекта *C. affinis* динамика токсичности аналогична в точке исследования № 1 и № 2, выше и ниже сброса устья протоки р. Б.Рязанка отмечено 18% токсичных проб. Данные исследования позволяют сделать вывод о незначительном вкладе городских сточных вод в загрязнение реки Обь, а также об эффективности работы канализационных очистных сооружений г. Нижневартовска.

За период исследования показатель выживаемости не опускался ниже 90%.

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 3, 1000 м выше устья р. Вах, показали следующее: во все периоды 2004 г., в четвертом квартале 2007 г., в третьем квартале 2009 г. отмечен стимулирующий эффект проб воды на плодовитость тест-объектов, плодовитость опытной группы не превышала плодовитости контрольной группы более чем на 21,7%. Токсический эффект воды

зарегистрирован в первом квартале 2004 г. по критерию выживаемости, гибель цериодафний составила 20%; во втором квартале 2005 г. — по показателю плодовитости.

В точке исследования № 4, 1000 м ниже устья р. Вах, в 2004 г. со 2-го по 4 квартал зарегистрирован стимулирующий и токсический эффект, так как плодовитость опытной группы превышала 30%, кроме того, 4 квартал 2004 г. характеризуется токсичностью воды по показателю выживаемости. Токсический эффект воды зарегистрирован также в четвертом квартале 2006 г., в третьем квартале 2007 г. стимулирующего эффекта не отмечено. Во втором квартале 2006 г. и первом квартале 2008 г. отмечена токсичность по показателю выживаемости. В четвертом квартале 2007 г., в первом квартале 2008 г., третьем квартале 2009 г. отмечен незначительный, менее 30%, эффект стимулирования плодовитости тест-объектов.

В точке № 5, 500 м ниже устья протоки Мулка, в 2004 г. отмечена стимуляция плодовитости во всех периодах исследования, во 2, 3, 4-м квартале отмечена токсичность воды, в третьем квартале 2006, 2007 гг. плодовитость тест-объектов достоверно угнеталась. В 54% экспериментов отмечался эффект стимулирования плодовитости.

В точке исследования № 6, в районе Речпорта, в первом квартале 2004 г., так же как в 2005 и 2008 гг., вода была токсичной для цериодафний по критерию выживаемости. В 2004 г. в 2, 3, 4-м квартале отмечен токсический эффект воды, проявляющийся в стимуляции плодовитости тест-объектов, схожая динамика токсичности воды отмечена в 2007 г., отличием является то, что во втором квартале стимуляция плодовитости превышала 30%. Во втором квартале 2005 г. плодовитость цериодафний достоверно угнеталась. Пробы воды, отобранной в третьем квартале 2009 г., оказывали достоверный, угнетающий плодовитость цериодафний, эффект. В 41% экспериментов отмечался эффект стимулирования плодовитости (табл. 14—19).

Таблица 14

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 3

Год, квартал	Среднее кол-во выметанной молоди в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	2,8	3,6	2,1	-0,41	0	20,1	-
II	7,9	8,8	2,1	-0,72	0	12,5	-
III	8,1	9,6	2,1	-0,76	0	13,0	-
IV	9,9	12,4	2,1	-2,04	20	33	+
2005 г.							
I	-	-	-	-		-	-
II	11,2	6,5	2,1	3,02	0	-	+
III	9,8	5,7	2,1	1,23	10	-	-
IV	-	-	-	-		-	-
2006 г.							
I	-	-	-	-		-	-
II	7	6,7	2,1	0,59	0	-	-
III	9,5	9,6	2,1	0,1	0	-	-
IV	-	-	-	-		-	-
2007 г.							
I	-	-	-	-		-	-
II	9	7,8	2,1	0,88	0	-	-
III	8,9	6,4	2,1	1,84	0	-	-
IV	7,4	9,5	2,1	-0,44	0	20	-
2008 г.							
I	-	-	-	-		-	-
II	7,2	7,5	2,1	0,13	0	-	-
III	6,2	6,9	2,1	0,67	10	-	-
IV	-	-	-	-		-	-
2009 г.							
I	7,6	7,1	2,1	0,304	10	-	-
II	7,0	5,8	2,1	0,8	0	-	-
III	7,9	10,1	2,1	-1,891	0	21,7	-
IV	7,5	7,1	2,1	0,30	10	-	-

Таблица 15

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 4

Год, квартал	Среднее кол-во выметанной молоди в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	–	–	–	–	–	–	–
II	7,6	10,1	2,1	–2,96	0	32,3	+
III	9,4	14,6	2,1	–4,286	0	55,6	+
IV	7,0	11,3	2,1	–3,56	20	61,4	+
2005 г.							
I	–	–	–	–		–	–
II	7,0	5,8	2,1	0,49	0	–	–
III	6,9	6,4	2,1	0,33	0	–	–
IV	–	–	–	–		–	–
2006 г.							
I	–	–	–	–		–	–
II	3,4	5,9	2,1	2,01	20	–	+
III	7,2	7	2,1	0,23	0	–	–
IV	9,4	5,6	2,1	4,28	0	–	+
2007 г.							
I	–	–	–	–		–	–
II	8,8	8,4	2,1	0,3	0	–	–
III	9,7	3,1	2,1	7,01	0	–	+
IV	8,8	10	2,1	–0,75	0	12	–
2008 г.							
I	8,1	9,3	2,1	–0,7	20	12,2	+
II	7,4	5,7	2,1	1,69	0	–	–
III	–	–	–	–		–	–
IV	–	–	–	–		–	–
2009 г.							
I	–	–	–	–		–	–
II	–	–	–	–		–	–
III	9,2	9,4	2,1	–0,196	0	2,56	–
IV	6,1	5	2,1	1,067	10	–	–

Таблица 16

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 5

Год, квартал	Среднее кол-во выметанной молоди в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	3,2	3,4	2,12	-0,130	10	5,8	-
II	7,1	10,7	2,11	-4,769	10	50,7	+
III	12,1	16,9	2,12	-5,33	10	39	+
IV	8,8	11,5	2,1	-2,98	0	30	+
2005 г.							
I	6,9	5	2,13	1,23	10	-	-
II	9,1	7,9	2,1	0,8	0	-	-
III	5,6	5	2,1	0,43	0	-	-
IV	4,8	5,9	2,11	-1,28	10	22,9	-
2006 г.							
I	6,8	5,6	2,1	0,74	0	12,8	-
II	7,2	8,9	2,1	-1,72	0	19	-
III	9,7	4,7	2,11	5,58	10	-	+
IV	-	-	-	-	-	-	-
2007 г.							
I	-	-	-	-	-	-	-
II	8,5	10,2	2,1	-1,44	0	16,8	-
III	8,1	4,3	2,1	5,14	0	-	+
IV	8,9	9,5	2,1	-0,36	0	6,3	-
2008 г.							
I	7,7	8,9	2,11	-0,49	10	13,4	-
II	8,0	6,8	2,1	0,74	0	-	-
III	8,7	7,7	2,1	0,472	10	-	-
IV	11,1	13,1	2,1	-2,609	0	18	-
2009 г.							
I	7,4	7,8	2,1	-0,255	0	5	-
II	6,4	5,8	2,1	0,92	0	-	-
III	9	9,7	2,1	-0,97	0	7	-
IV	6,1	5,2	2,1	1,01	0	-	-

Таблица 17

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 6

Год, квартал	Среднее кол-во выметанной молодежи в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	5,8	2,3	2,13	1,41	20	–	+
II	6,4	10,1	2,1	–2,49	0	57,1	+
III	7,7	12,4	2,1	–3,072	0	61	+
IV	9,9	17,1	2,11	–6,81	10	72	+
2005 г.							
I	8,4	4,9	2,12	1,4	20	–	+
II	11,4	6,2	2,1	4,06	0	–	+
III	6,9	5,2	2,1	1,57	0	–	–
IV	5,1	5,3	2,1	–0,18	0	3	–
2006 г.							
I	7,0	6,9	2,1	0,11	10	–	–
II	7,0	8,2	2,1	–0,92	0	17	–
III	9,5	8,9	2,1	0,63	0	–	–
IV	–	–	–	–	–	–	–
2007 г.							
I	–	–	–	–		–	–
II	4,8	7,46	2,1	–4,6		54,6	+
III	14,7	7,82	2,1	6,41		–	+
IV	14,7	7,7	2,1	7,95		–	+
2008 г.							
I	7,8	7,9	2,12	–0,04	20	–	+
II	8,6	6,4	2,1	1,34	0	–	–
III	–	–	–	–		–	–
IV	–	–	–	–		–	–
2009 г.							
I	7,7	7,9	2,1	–0,267		2	–
II	6,7	6,8	2,1	–0,118		1	–
III	7,4	10,5	2,1	–2,125		41	+
IV	7,2	7,4	2,1	–0,23		2	–

Таблица 18

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 7

Год, квартал	Среднее кол-во выметанной молодежи в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	3,3	2,6	2,13	0,921	20	–	+
II	7,4	10	2,1	-1,898	0	35	–
III	8,6	13,6	2,1	-3,646	0	58	+
IV	10,6	13,1	2,1	-2,92	10	23,5	+
2005 г.							
I	6,0	4,9	2,1	1,33	10	–	–
II	9,3	6,8	2,1	2,91	10	–	+
III	6,7	5,7	2,1	1,02	0	–	–
IV	6,3	4	2,1	2,06	10	–	–
2006 г.							
I	8,4	6,1	2,11	2,06	10	–	–
II	7,1	8,2	2,11	-1,04	0	15,4	–
III	9,9	7,6	2,11	2,07	0	–	–
IV	–	–	–	–	–	–	–
2007 г.							
I	8,2	3,2	2,1	5,056	0	–	+
II	8,5	9,3	2,1	-0,58	0	9	–
III	8,6	6,9	2,1	1,14	0	–	–
IV	8,8	9	2,1	-0,12	0	2	–
2008 г.							
I	7,7	7,6	2,1	0,09	0	–	–
II	8,0	8,3	2,1	-0,35	0	4,3	–
III	4,9	3,8	2,1	1,336	0	–	–
IV	10,6	11,2	2,1	-0,74	0	6	–
2009 г.							
I	8,4	9,3	2,1	-1,19	0	10,7	–
II	6,7	7,0	2,1	-0,423	0	4	–
III	8,6	10	2,1	-1,52	0	16,2	–
IV	7,9	8,5	2,1	-0,821	0	7	–

Таблица 19

Результаты биотестирования хронического токсического действия исследуемой воды на *C. affinis* в точке № 8

Год, квартал	Среднее кол-во выметанной молодежи в пересчете на одну исходную самку		Tst	Tg	Гибель, %	Стимулирование плодовитости, %	Оценка тестируемой воды
	Контроль	Опыт					
2004 г.							
I	3,6	4,4	2,1	-1,38	10	10	-
II	8,0	9,2	2,1	-1,21	10	15	-
III	9,4	16,3	2,1	-6,357	10	79,7	+
IV	8,8	13,6	2,12	-5,24	20	54	+
2005 г.							
I	6,9	5,1	2,1	1,19	0	-	-
II	10,4	6,5	2,1	3,18	0	-	+
III	6,6	4,4	2,1	2,17	10	-	+
IV	5,3	9,5	2,1	-4,94	0	56,3	+
2006 г.							
I	14,2	10,6	2,1	-5,66	0	33,9	+
II	7,3	6,6	2,1	0,7	0	-	-
III	10,2	6,2	2,1	3,39	0	-	+
IV	6,7	5,1	2,1	1,76	20	-	+
2007 г.							
I	8,7	5,1	2,1	4,8	0	-	+
II	8,8	8,6	2,1	0,1	0	-	-
III	7,8	4,1	2,1	5,04	0	-	+
IV	9,8	10,4	2,1	-0,88	0	6	-
2008 г.							
I	6,2	4,9	2,11	1,41	10	-	-
II	8,2	8	2,11	-0,12	10	2	-
III	-	-	-	-	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	-	-
2009 г.							
I	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	-	-	-
IV	-	-	-	-	-	-	-

В точке исследования № 7, стрелка Чехломей—Нижевартовск, в 2004 г. в первом квартале отмечена токсичность воды по показателю выживаемости, т.к. гибель цериодафний составила 20%, в 3 и 4 квартале стимулирование плодовитости тест-объектов превышало 30% в сравнении с контрольной группой. Во втором квартале 2005 г. и первом квартале 2007 г. плодовитость цериодафний достоверно угнеталась по сравнению с контрольной группой. В 50% экспериментов зарегистрирован эффект стимуляции плодовитости тест-объектов в опытной группе.

В 2004 г. в точке исследования № 8, устье протоки р. Б.Рязанка, во всех периодах отмечена стимуляция плодовитости, но лишь в 3 и 4 кварталах показатель плодовитости в опытном варианте превышает 30% и составляет 74,7% и 54% соответственно, кроме того, в четвертом квартале гибель тест-объектов составила 20%. В 2005 г. во втором и третьем кварталах плодовитость цериодафний достоверно угнеталась, в четвертом — достоверно стимулировалась. Первый квартал 2006 г. характеризуется увеличением количества молоди тест-объектов на 33,9% в сравнении с контрольной группой, третий квартал характеризуется угнетением плодовитости опытной группы, в четвертом квартале зарегистрирована токсичность воды по показателю выживаемости. 2007 г. характеризуется достоверным угнетением плодовитости в первом и третьем квартале.

Анализ токсичности воды в восьми точках исследования показал, что в 39% исследований отмечена токсичность воды в период с июля по сентябрь, в период с января по июнь вода оказывала токсичное действие на тест-объекты в 22% опытов, в осенне-зимний период с октября по декабрь отмечена токсичность в 15% опытов.

Для точной оценки экспериментального материала, получаемого на лабораторной культуре дафний в разное время года, было проведено наблюдение за изменчивостью биологических показателей, таких как выживаемость, плодовитость, при постоянных параметрах температуры, света, корма, плотности посадки, изменяющимся фактором оставалось лишь время года. Результаты четырехгодичных исследований на последовательных партеногенетических поколениях позволили выявить определенную взаимосвязь выбранных показателей с изменяющимися факторами. Длительность

наблюдений за каждым поколением составляла 25—30 суток, что связано с биологическим циклом дафний, а также с продолжительностью токсикологических опытов.

Выживаемость — наиболее стабильный показатель у лабораторной культуры дафний. Показатель выживаемости колебался от 100 до 82%, лишь однажды выживаемость рачков за 25—30 суток снизилась до отметки 81%.

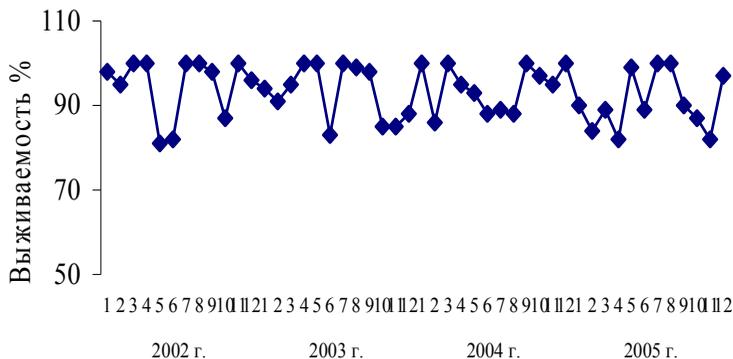


Рис. 17. Выживаемость лабораторной культуры *D. magna* в течение месяца, за период исследования 2002—2005 гг.

Плодовитость — более изменчивый показатель во времени, чем выживаемость. Она изменяется от поколения к поколению. Однако тенденция колебаний имеет определенную направленность. По результатам исследований можно отследить чередования повышения и понижения плодовитости лабораторной культуры *D. magna*. Отметим, что полученные результаты могут не соответствовать закономерностям, происходящим в природной среде, где действуют биотические и абиотические факторы, где происходит коррекция уровня плодовитости в зависимости от емкости среды. Токсикологические эксперименты мы ставим на лабораторной культуре, в лабораторных условиях, а не в естественной среде, следовательно, интерпретировать результаты опытов должны соответственно.

Четкая закономерность спада и повышения плодовитости лабораторной культуры *D. magna* в разные периоды года отсутствует, показатели каждого года отличаются своими особенностями.

В 2002 г. количество выметанной молоди планомерно повышалось от января до мая, вслед за чем последовал незначительный спад в июне, подъем и планомерное падение плодовитости до октября; максимум плодовитости был отмечен в ноябре. В 2003 г. первый пик плодовитости мы наблюдаем в феврале, второй, более значительный пик плодовитости, наступил в июне, количество выметанной молоди составило 138 особей. Затем последовал незначительный пик в августе — 92 особи и ноябре — 99 особей молоди, в пересчете на одну партеногенетическую самку. С ноября 2003 г. по март 2004 г. происходило снижение показателей плодовитости *D. magna*, вслед за чем начался ее подъем до мая, спад, максимальный пик в сентябре, незначительный подъем в декабре и опять спад до февраля 2005 г. Показатели плодовитости *D. magna* в 2005 г. не отличались такой планомерностью как в 2004 г.: здесь, напротив, можно наблюдать скачки количества молоди в марте, в июне, августе, сентябре, где показатели практически равны 90, 88, 98 особей соответственно; в июле и октябре плодовитость тест-объектов была невысокой, наибольшее количество молоди было произведено в декабре.

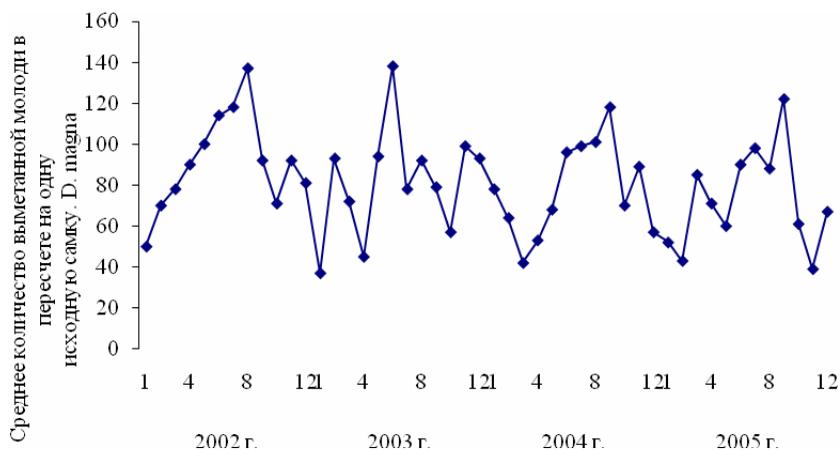


Рис. 18. Среднее количество выметанной молоди в пересчете на одну исходную лабораторную самку *D. magna* в течение месяца, за период исследования 2002—2005 гг.

Наименьший показатель плодовитости отмечен в зимний период года, он составил 37 особей, наибольший — 138 особей молодежи в пересчете на одну партеногенетическую самку — отмечен в летний период. Наивысшие пики плодовитости приходятся на июнь, сентябрь, декабрь, пики значительного снижения показателя — январь, март, февраль, июль. Следовательно, колебания плодовитости у дафний могут быть обусловлены как генетическими факторами, так и токсическим воздействием тестируемых вод. Полученную динамику мы связываем с реакцией тест-объектов на изменение солнечной активности в течение года (рис. 18).

Исследование среднего количества выметанной молодежи *C. affinis* проводилось поквартально; в отличие от дафний, учитывалась не среднемесячная плодовитость, а плодовитость за 7—10 дней, что оговорено в стандартной методике. Четкой закономерности динамики плодовитости цериодафний по сезонам не прослеживается, однако нужно отметить, что исследовалась лабораторная культура, динамика плодовитости которой корректируется условиями лаборатории. Можно отметить, что пики плодовитости приходятся на 3 и 4 кварталы в 2002, 2007, 2008, 2009 гг., что соответствует литературным данным (Методическое руководство..., 1991), говорящим о пиках плодовитости естественных популяций цериодафний в осенний период. Пики значительного снижения плодовитости приходятся на 1—2 квартал 2002, 2005, 2008 гг.

Интерпретация результатов биотестирования на цериодафниях сложна, в связи с чем предлагается введение «идеального» показателя уровня плодовитости для контрольных и экспериментальных самок. Минимальное количество молодежи у экспериментальных самок — 1,6, максимальное количество выметанной молодежи — 17,1, среднее количество выметанной молодежи — 7,5. Минимальное количество молодежи у контрольных самок — 2,8, максимальное количество выметанной молодежи — 14,7, среднее количество выметанной молодежи в пересчете на одну исходную самку — 7,4. В среднем показатели плодовитости контрольных самок цериодафний более стабильны, нежели показатели плодовитости экспериментальных, однако предел вариаций очень широк, следовательно, предлагается сравнивать экспериментальные показатели не только с контрольным, но и с «идеальным» (средним показателем плодовитости контрольных самок), равным 7,4.

Анализ токсикологических опытов по определению токсичности природной воды реки Обь, озера Самотлор, проведенных в период с 2002 по 2007 гг., с использованием показателя плодovitости в разные периоды года показал следующие закономерности спадов и подъемов плодovitости. Наиболее значительно повышается плодovitость дафний в летний период в июле, что связано, вероятнее всего, с благоприятным климатом; в период с августа по сентябрь плодovitость также повышается, что связано с благоприятным микроклиматом, а также с интенсификацией процессов самоочистения в водном объекте. Незначительное повышение плодovitости отмечается в начале года в мае, несмотря на большое количество талых и сточных вод, несущих в себе «законсервированные» загрязняющие вещества, попадающие во время таяния снега в реки и озера; плодovitость тест-объектов по сравнению с зимними пробами повышается, вероятнее всего, это связано с тем, что таяние льда и снега вызывает разбавление воды, и концентрации токсикантов снижаются. Снижение плодovitости отмечено в конце года с декабря по январь, что объясняется зимним замором, отмечающимся в регионе ежегодно. Пики повышения и понижения плодovitости также связаны с климатическими условиями в районе исследования. Нижневартовский район характеризуется ярко выраженным умеренно-континентальным климатом с продолжительной холодной зимой, коротким сравнительно теплым летом, поздними весенними и ранними осенними заморозками. Ледостав на озере Самотлор наблюдается в октябре, вскрытие озер и рек происходит во второй декаде мая.

Вышеизложенное дает основание утверждать, что такой показатель, как плодovitость имеет зависимость от времени года и степени токсичности воды, выживаемость же от времени года не зависит, а имеет прямую связь с качеством воды.

3.3. Зависимость токсичности природных вод от химического состава

В период исследования 2002—2004 гг. превышение ПДК в течение года отмечалось по таким показателям: нефтепродукты, аммоний, медь, железо, фенолы. Для данных веществ характерен

не только антропогенный путь поступления в окружающую среду, но и естественная циркуляция в водах района исследования. Оценка взаимосвязи токсичности озерных и речных вод с их химическим составом проводилась с использованием корреляционного анализа, данный анализ позволил также определить группу приоритетных загрязнителей: нефтепродукты, медь, аммоний, железо, фенолы (рис. 19—22).

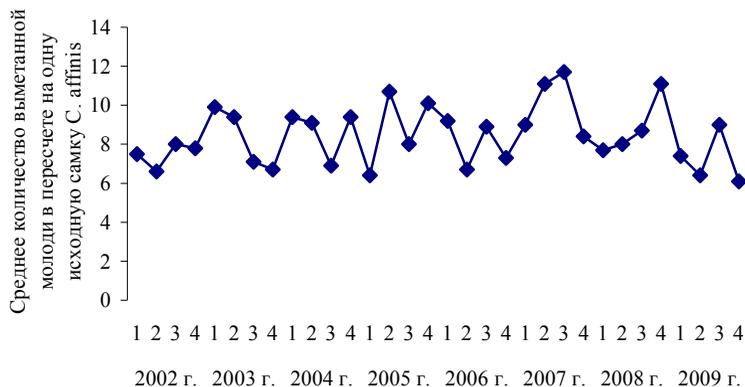


Рис. 19. Среднее количество выметанной молоди в пересчете на одну исходную лабораторную самку *C. affinis* за период исследования 2002—2009 гг.

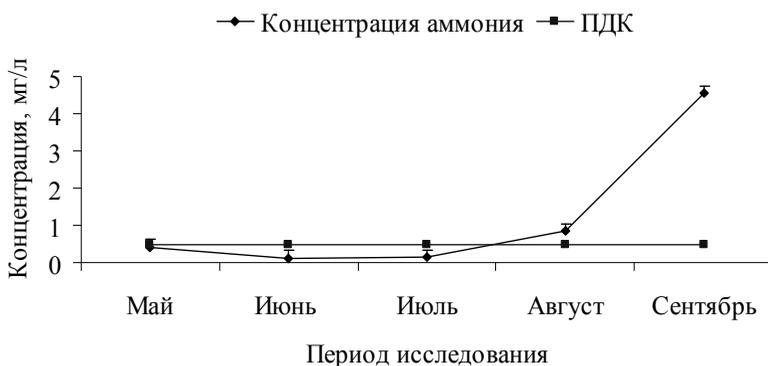


Рис. 20. Концентрация аммония в природных водах в периоды исследования 2002—2004 гг. по результатам химического анализа

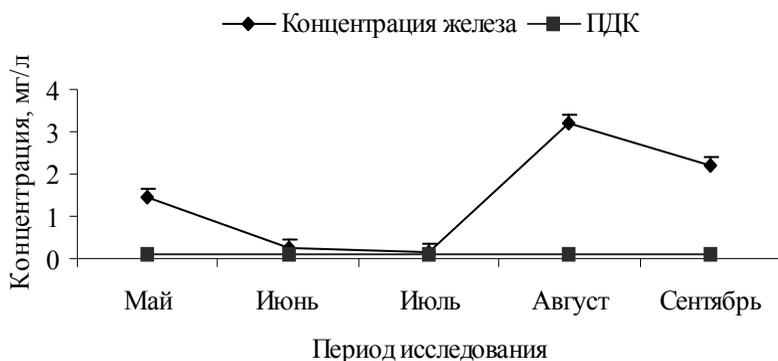


Рис. 21. Концентрация железа в природных водах в период исследования 2002—2004 гг. по результатам химического анализа

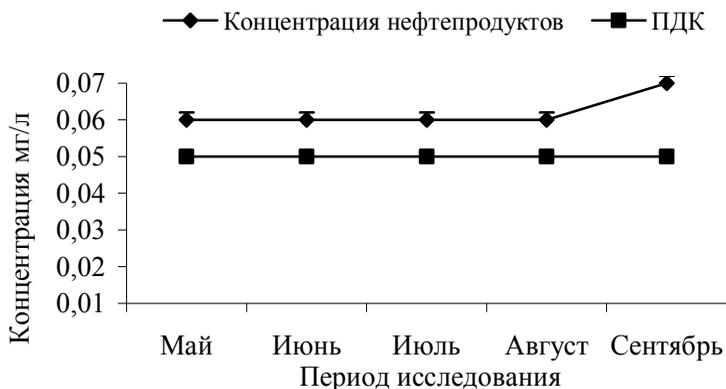


Рис. 22. Концентрация нефтепродуктов в природных водах в период исследования 2002—2004 гг. по результатам химического анализа

Корреляционная зависимость токсичности по критериям выживаемости, проб воды озера Самотлорской группы и реки Обь с результатами химических анализов составила: железо ($r = 0,09$), марганец ($r = 0,29$), аммоний ($r = 0,11$), медь ($r = 0,07$), нефтепродукты ($r = 0,02$), фенолы ($r = 0,06$), цинк ($r = 0,02$), хлориды ($r = 0,1$), нитраты ($r = 0,01$), нитриты ($r = 0,09$). Показатели положительно коррелируют с результатами биотестирования. Отрицательная корреляция отмечена лишь с фосфатами ($r = -0,03$).

Корреляционная зависимость хронической токсичности, по критериям плодovitости, проб воды озера Самотлорской группы и реки Обь с результатами химических анализов составила: железо ($r = -0,2$), марганец ($r = 0,2$), аммоний ($r = -0,1$), медь ($r = -0,07$), нефтепродукты ($r = -0,07$), фенолы ($r = 0,03$), цинк ($r = 0,01$), нитраты ($r = 0,04$), нитриты ($r = -0,07$), фосфаты ($r = 0,04$), хлориды ($r = 0,01$). Кроме того, рассчитывалась множественная коррелятивная зависимость токсичности проб воды по показателю плодovitости с такими химическими веществами как марганец и цинк. Показатель множественной корреляции составил $r=0,4$, показатель достоверен, так как полученный коэффициент больше максимального из парных или частных коэффициентов корреляции $0,4 > 0,01; 0,2; -0,06$.

Связь между показателями биотестирования и химического анализа воды может быть отрицательной и положительной: когда значения одной переменной убывают, значения другой возрастают, это показывает отрицательный коэффициент корреляции, при положительной корреляции при увеличении одного параметра второй тоже увеличивается.

Химический анализ пробы воды, отобранной в мае, показал превышение допустимых концентраций по следующим показателям: медь — в 4 раза, содержание железа общего составило 1,43 мг/л, показатели БПК — 3,90, рН — 5,66, концентрации других веществ не превышали допустимых норм.

В июле концентрация меди превысила ПДК в 2 раза, концентрация железа общего — в 2,5 раза, содержание других веществ не превышало нормы.

В июле количество меди превысило норму в 4 раза, содержание железа составило 1,5 мг/л.

Август характеризовался превышением нормативов по таким показателям, как аммоний, медь, содержание железа достигло наивысшей отметки за период исследования — 3,22 мг/л, фенолы превысили ПДК в 2 раза, показатель БПК составил 4,66, рН — 6,99.

Сентябрь, по результатам биотестирования и данным химического анализа, можно охарактеризовать как самый загрязненный период в сравнении с другими месяцами исследования. В данный период отмечены значительные превышения ПДК аммония, меди, железа, фенолов; нефтепродукты превышали ПДК незначительно,

концентрация составила 0,06 мг/л. В период с мая по август концентрация нефтепродуктов не изменялась и составляла 0,05 мг/л. Среднегодовые показатели по исследуемым веществам также превышают допустимые концентрации. В период исследования превышение нормативов по другим веществам не отмечено.

В целом можно отметить, что химический состав природных вод коррелирует с показателями биотестирования. Динамика содержания химических веществ в пробах природной воды в исследованные периоды подтверждает сезонную динамику токсичности природных вод по итогам биотестирования.

В течение всего периода исследования 2004—2007 гг. превышение ПДК отмечалось по таким показателям: нефтепродукты, аммоний, медь, железо, фенолы, а также по таким показателям как ХПК, АПАВ (рис. 23—26).

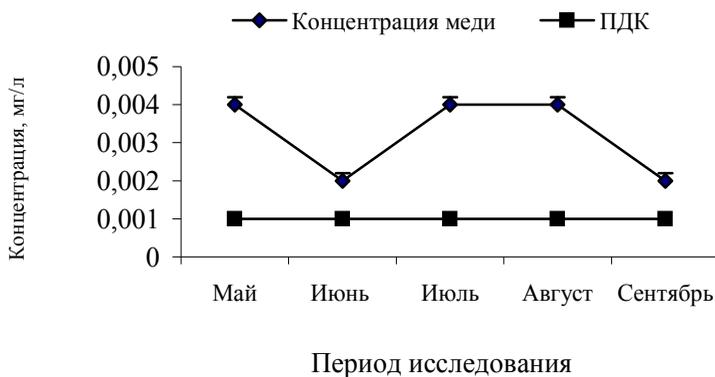


Рис. 23. Концентрация меди в природных водах в период исследования 2002—2004 гг. по результатам химического анализа

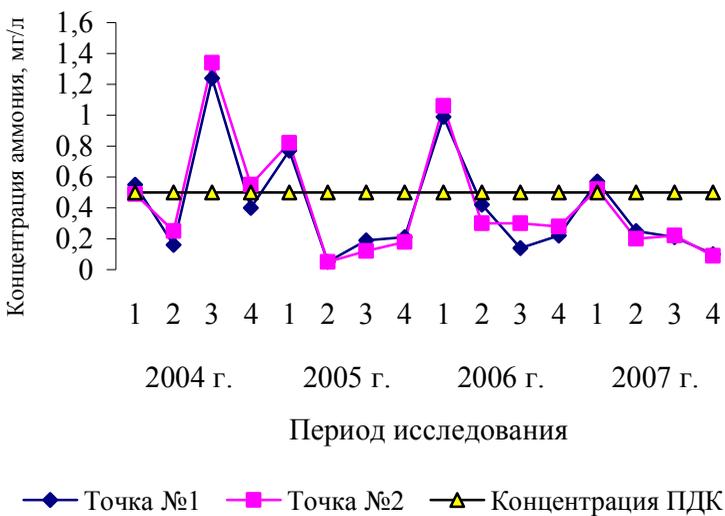


Рис. 24. Концентрация аммония в водах реки Обь в период исследования 2004—2007 гг. по результатам химического анализа

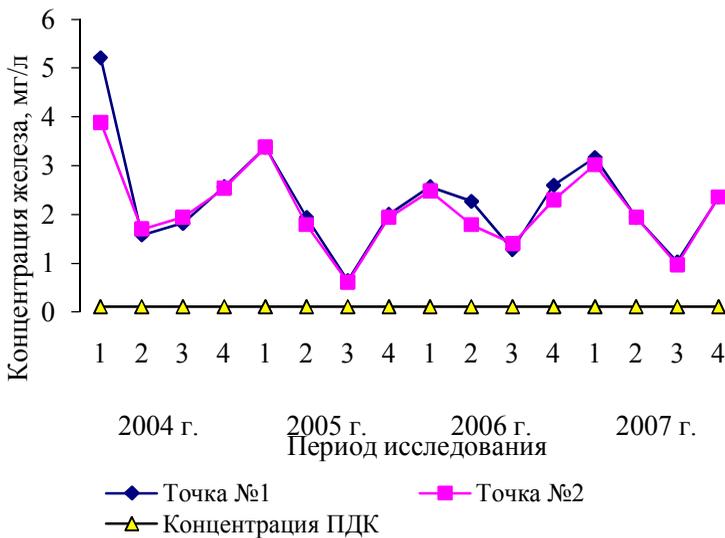
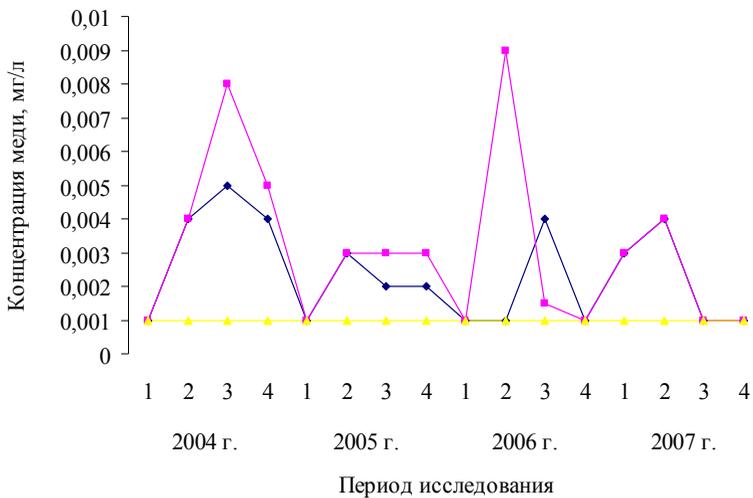
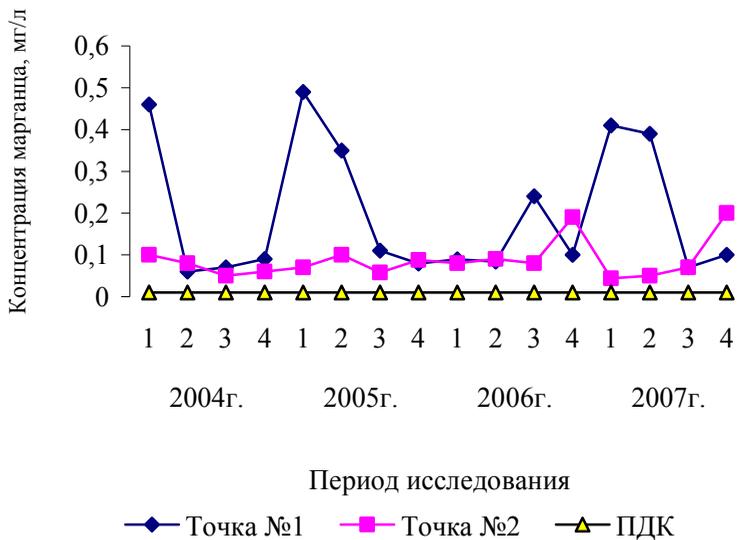


Рис. 25. Концентрация железа в водах реки Обь в период исследования 2004—2007 гг. по результатам химического анализа



—◆— Точка №1 —■— Точка №2 —▲— Концентрация ПДК
Рис. 26. Концентрация меди в водах реки Обь в период исследования 2004—2007 гг. по результатам химического анализа



—◆— Точка №1 —■— Точка №2 —▲— ПДК
Рис. 27. Концентрация марганца в водах реки Обь в период исследования 2004—2007 гг. по результатам химического анализа

Нефтепродукты выше нормативов ПДК определялись редко в 20% отобранных проб, превышение норм было незначительным 0,006—0,007 мг/л. Коррелятивной зависимости токсичности воды для *S. affinis* с количеством нефтепродуктов в данный период исследования не отмечено. Превышение нормативов ПДК по аммоний-иону отмечено в 42% случаев. В 62% проб меди определялось от 0,002 до 0,005 мг/л, аналогичное превышение уровней ПДК регистрировалось по содержанию количества фенолов от 0,002 до 0,004 мг/л, однако корреляционной зависимости степени токсичности вод с количеством фенолов не отмечено. Количество железа в тестируемой воде в 100% случаев превышало допустимые пределы. Превышение нормативов ПДК по марганцу отмечено в 100% случаев за исследованный период, резкие скачки количества марганца в водах реки Обь преимущественно отмечаются в зимний период, в первых кварталах года.

Результаты анализов и расчетов дают основания утверждать, что железо, аммоний, медь, нефтепродукты, нитриты отрицательно коррелируют с показателями биотестирования тест-объектов, т.е. при повышении количества данных веществ в пробах воды плодovitость угнетается. Марганец, цинк, фенолы, нитраты, фосфаты при повышении концентрации, наоборот, способны вызывать стимулирующий эффект.

3.4. Статистическая обработка результатов экспериментов

При обработке данных исследования токсичности вод по критерию выживаемости использовалась математическая модель повторяющихся независимых экспериментов с двумя исходами (модель Бернулли). Каждая особь на протяжении 96 часов имеет вероятность выживания p и вероятность гибели $q = 1 - p$ независимо от других особей. Значение вероятности p зависит от свойств окружающей среды и приблизительно равно 1, если водная среда нетоксична. В случае, когда вода токсична, значение p будет значительно меньше 1.

Для оценки вероятности p применяется формула:

$$p = \frac{\text{количество выживших дафний}}{\text{исходное количество дафний}} \quad (10)$$

При этом суммировали данные по каждой повторности.

Кроме того, необходимо произвести тест на статистическую однородность для каждой повторности с использованием значения параметра p , вычисленного ранее, с целью отсутствия ошибок при проведении эксперимента в каждой повторности. Для этого проверяли, лежит ли количество выживших дафний для каждой повторности в пределах, рассчитанных по критерию Стьюдента: от $np - t_{0,05;n-1} \sqrt{np(1-p)}$ до $np + t_{0,05;n-1} \sqrt{np(1-p)}$, где $n = 10$ — количество особей в повторности, значение p вычислено ранее, а $t_{0,05;n-1} = 2,262$ находится из таблицы распределения Стьюдента для $n - 1 = 9$ степеней свободы и уровня значимости 5%. При этом верхняя и нижняя границы округляются до ближайшего целого числа (значения меньше 0 и больше 10 заменяются на 0 и 10 соответственно). Проба считается токсичной, если значение параметра P ниже 0,5.

Для обработки данных исследования токсичности вод по критерию плодovitости использовали функцию ТТЕСТ программы Excel из пакета Microsoft Office. Эта функция возвращает вероятность, соответствующую критерию Стьюдента, и используется, чтобы определить, насколько вероятно, что две выборки взяты из генеральных совокупностей, которые имеют одно и то же среднее.

В качестве первой выборки используются данные, полученные в контрольной группе. Вторую выборку составляют данные из опытной группы. В качестве дополнительных параметров задаем: хвосты = 2 (используется двустороннее распределение) и тип теста = 3 (двухвыборочный тест с неравными дисперсиями).

Если результат вычисления функции ТТЕСТ меньше 0,05, что соответствует уровню значимости 5%, то различие уровней загрязненности для контрольной группы и опытной группы статистически достоверно. Если значение больше 0,05, то это означает, что различие между контрольной группой и опытной группой мало и может появиться в силу случайных причин.

Для оценки токсичности пробы сравниваются показатели средней плодovitости самки для контрольной и опытной группы. Считается, что проба оказывает токсичное действие, если показатель отличается в два и более раз.

В качестве основных статистических характеристик выбраны среднее значение и стандартное отклонение (вычисляемые с помощью функций СРЗНАЧ и СТАНДОТКЛОН программы Excel). Если значения стандартного отклонения в опытной группе значительно больше, чем в контрольной группе, это свидетельствует о том, что имеются причины, объясняющие существенную вариацию в данных по опытной группе. Для проверки этого явления вычислим 95% — доверительные интервалы для среднеквадратического отклонения в контрольных группах по формуле:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{0,025;n-1}^2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_{0,975;n-1}^2}}.$$

Здесь $n = 4$ — количество опытов (поколений), s^2 — квадрат стандартного отклонения, оцененного по выборке, $\chi_{0,025;n-1}^2 = 9,348$, $\chi_{0,975;n-1}^2 = 0,216$ — значения квантилей распределения хи-квадрат, найденные по таблицам, σ — истинное значение среднеквадратического отклонения (для генеральной совокупности).

Оценка зависимости токсичности природных вод от химического состава проводилась с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel методом корреляционного анализа.

Расчеты токсикологических экспериментов для дафний и цериодафний проводятся по «Методике определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости» (ФР. 1. 39. 2001. 00286; ПНД Ф Т 14.1: 2: 3: 4: 6-2000)

Оценка достоверности различий биопараметров в хроническом опыте с использованием тест-объектов *D. magna* и *C. affinis* при проведении анализов вод реки Обь в период 2004—2007 гг. проводилась с использованием критерия Стьюдента. Первоначально рассчитывался показатель достоверности (T_g), который впоследствии сравнивался с критерием Стьюдента. Если рассчитанное $T_g \geq T_{st}$, то изменения в плодовитости тест-объектов достоверны, а не случайны. В этом случае принимали, что исследуемая вода оказывает хроническое токсическое действие. Если $T_g \leq T_{st}$, то выявленные различия в плодовитости тест-объектов в тестируемой воде и контроле недостоверны, следовательно, исследуемая вода не оказывает хронического токсического действия.

Корреляционную зависимость количества молодежи тест-объектов с количеством химических веществ в исследуемых пробах проводили с использованием функции КОРРЕЛ программы Excel. Связь между показателями биотестирования и химического анализа воды может быть отрицательной и положительной: когда значения одной переменной убывают, значения другой возрастают, это показывает отрицательный коэффициент корреляции; при положительной корреляции при увеличении одного параметра второй тоже увеличивается. Достоверность коррелятивной зависимости определяли, рассчитывая t-критерий и сравнивая его с табличным (t_{st}) значением. При $t > t_{st}$ для данной доверительной вероятности наличие корреляции можно считать статистически достоверным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокие концентрации в воде водоемов Нижневартовского района гуминовых кислот, ионов аммония, железа и марганца, а также части фенолов, образующихся при разложении растительных остатков, не зависят от антропогенной нагрузки и вызваны влиянием природных факторов, в частности, условиями формирования водотоков на территории района. Антропогенными загрязнениями водоемов Нижневартовского района являются: углеводороды нефти, поступающие в водоемы и на площадь водосбора при авариях нефтепроводов, при горении факелов, разливах содержимого шламовых амбаров, со сточными водами; тяжелые металлы, СПАВ, полиакриламиды и другие компоненты буровых растворов; минеральные соли, входящие в состав пластовых и подтоварных вод, а также жидкой фазы буровых растворов.

Острое токсическое действие исследуемой воды на дафний, цериодафний определяется по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Определение хронической токсичности по результатам исследования экспериментов с 2002 по 2009 гг. было проведено по достоверному отклонению от контроля и стимуляции плодовитости (норма < 30%). В исследуемой воде хроническую токсичность вызывают токсичные вещества антропогенного и природного происхождения. Эти вещества вызывают как угнетение тест-объектов, так и положительную тест-реакцию, вызывающую стимулирование плодовитости.

Эффект стимулирования плодовитости в опытах с тест-объектами *D. magna* наблюдался в 28% случаев, в опытах с тест-объектами *C. affinis* — в 61% случаев. Результаты экспериментов с использованием *D. magna* в 33% случаев подтверждают результаты экспериментов с использованием *C. affinis*, что доказывает необходимость проведения токсикологических экспериментов на нескольких тест-объектах.

Анализ токсичности воды показал, что в 39% исследований отмечена токсичность воды в период с июля по сентябрь, в период с января по июнь вода оказывала токсичное действие на тест-объекты в 22% опытов, в осенне-зимний период с октября по декабрь

отмечена токсичность в 15% опытов. За период исследования показатель выживаемости не опускался ниже 80%.

Интерпретация результатов токсикологических опытов довольно сложна, т.к. стандартными методами гидрохимического анализа не учитывается характер комбинированного взаимодействия веществ в пробах, не все химические вещества определяются. Биотестирование проходит в лабораторных «идеальных» условиях, которые не соответствуют природным условиям существования популяций, не учитываются температурный фактор, сезонная динамика, результаты оцениваются относительно лабораторной популяции организмов. При тестировании по критериям выживаемости тест-объектов контрольные повторности, по сути, служат для того, чтобы удостовериться в том, что опыт поставлен правильно; если выживаемость в контрольной группе ниже 90% результаты опыта недействительны. Плодовитость же оценивается относительно контрольной группы, причем никаких ограничений нет, в связи с чем предлагается введение «идеального» показателя уровня плодовитости для контрольных и экспериментальных самок. В среднем показатели плодовитости контрольных самок более стабильны, нежели показатели плодовитости экспериментальных, однако предел вариаций очень широк в обеих группах, следовательно, предлагается сравнивать экспериментальные показатели не только с контрольным, но и с «идеальным» показателем плодовитости (средним показателем плодовитости контрольных самок). Исследователями замечено, что плодовитость *D. magna* в ряду поколений не является постоянной величиной (Альмова, 1975; Исакова, Строганов, 1975). В природных условиях сезонные изменения численности планктонных ракообразных обусловлены как изменениями факторов среды (температура, свет, обеспеченность пищей) в течение года, так и внутрипопуляционными взаимодействиями. Исследования на лабораторной культуре в разные сезоны года дают основание утверждать, что такой показатель, как плодовитость имеет зависимость от времени года и степени токсичности воды, выживаемость же от времени года не зависит, а имеет прямую связь с качеством воды.

Полученные результаты биотестирования трудно соотнести с силой воздействия какого-либо конкретного фактора, частично данный вопрос возможно разрешить методами математического

анализа, в частности, корреляционного. Результаты анализов и расчетов корреляционной зависимости дают основания утверждать, что железо, аммоний, медь, нефтепродукты, нитриты отрицательно коррелируют с показателями биотестирования тест-объектов, т.е. при повышении количества данных веществ в пробах воды плодovitость угнетается. Марганец, цинк, фенолы, нитраты, фосфаты при повышении концентрации, наоборот, способны вызывать стимулирующий эффект.

Длительное время химический анализ был единственным методом оценки качества окружающей природной среды. Однако химический анализ — это лишь констатация факта существования или отсутствия каких-либо химических элементов в пробе, он не отражает «поведение» химических элементов в природной среде, влияния на живые объекты, как прямое, так и косвенное. В связи с чем в настоящее время очевидна необходимость биологического тестирования, отражающего реакцию живых объектов на антропогенное воздействие. В целом, для более точного определения качества окружающей природной среды необходимо: введение биологического тестирования наряду с химическими анализами, как на предприятиях, так и в лабораториях, осуществляющих контроль качества окружающей природной среды; разработка нормативов ПДК с учетом климатических особенностей региона и фоновых концентраций веществ; разработка методики полевого биотестирования.

Таковы, по нашему мнению, основные проблемы, которые комплексно должны решаться в ближайшем будущем в области научно-теоретических и практических исследований с целью повышения качества окружающей природной среды, сохранения естественных экологических систем.

Некоторые из отмеченных вопросов не вошли в данную работу, так как являются предметом специального анализа, другая часть вопросов найдет свое разрешение в последующих исследованиях, основой для которых послужат полученные результаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Авакян З.А. Сравнительная токсичность тяжелых металлов для некоторых микроорганизмов // Микробиология. 1967. № 3. С. 805—807.

Аверьянов А.Г. К вопросу об оценке воздушной среды при наличии нескольких вредных компонентов // Гигиена и санитария. 1957. № 8. С. 64—67.

Алимарин И.П., Ушаков Н.Н. Справочные таблицы по аналитической химии. М., 1960. С. 104.

Алымова Т.П. Влияние хронического фенольного отравления на биологию дафний // Формирование и контроль качества поверхностных вод. Киев, 1975. Вып. 1. С. 34—39.

Базиневич Н.И., Гребенщиков О.С., Тишков А.А. Географические закономерности структуры и функционирования природных экологических систем. М., 1986. С. 296.

Баканов А.И., Гапеева М.В., Томилина И.И. Оценка качества донных отложений водохранилищ Верхней Волги с использованием элементов триадного подхода // Биология внутренних вод. 2000. № 1. С. 102—109.

Бархатова О.А. Сравнительная токсикорезистентность *Epischura basalensis* и *Daphnia magna* в присутствии и отсутствии пищи: Дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2000. С. 156.

Безрукова Н.В. Взаимосвязь химического состава промышленных возвратных вод и их токсичность для гидробионтов (на примере г. Нижнего Новгорода): Дис. ... канд. биол. наук. Нижний Новгород, 2000. С. 182.

Бейко О.А., Головки А.К., Горбунова Л.В. Химический состав нефтей Западной Сибири. Новосибирск, 1988. С. 288.

Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963. С. 152.

Блохина Н.П., Помазкова Г.И., Стом Д.И. О влиянии полифенолов на креветок. Гидробиологические и ихтиологические исследования в Восточной Сибири. Иркутск, 1978. Вып. 2. С. 193—198.

Ботаника с основами экологии: Учеб. пособие для студ. пед. ин-тов / Л.В.Кудряшов, М.А.Гуленкова, В.Н.Козлова, Г.Б.Родионова. М., 1979. С. 320.

Брагинский Л.П. Биологические тесты как метод индикации токсичности водной среды // Проблемы аналитической химии. М., 1977. Т. 5. С. 27—3.

Брагинский Л.П., Щербань Э.П. Острая токсичность тяжелых металлов для водных беспозвоночных при различных температурных условиях // Гидробиология. 1978. № 6. С. 86—92.

Брагинский Л.П., Береза В.Д., Биргер Т.И., Комаровский Ф.Я., Маляревская А.Я., Щербань Э.П. Экспериментальное тестирование токсичности водной среды и повышение чувствительности биологических тестов // Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л., 1979. С. 324—336.

Брагинский Л.Л., Буртная И.Л., Щербань Э.П. Токсичность синтетических моющих средств для массовых форм пресноводных беспозвоночных // Экспериментальные исследования влияния загрязнений на водные организмы. Апатиты: Кольск. фил. АН СССР, 1979. С. 24—30.

Брагинский Л.П. Оценка качества вод природных водоемов по токсикологическим показателям // Научные основы контроля качества поверхностных вод по гидробиологическим показателям. Л., 1981. С. 201—206.

Брагинский Л.П. Теоретические аспекты проблемы «нормы и патологии» в водной экотоксикологии // Теоретические вопросы водной токсикологии. Л., 1981. С. 29—40.

Брагинский Л.П., Щербань Э.П. Биологическое тестирование токсичности Килийского рукава Дуная // Гидробиология Дуная и лиманов Северо-Западного Причерноморья. Киев, 1986. С. 140.

Брагинский Л.П., Комаровский Ф.Я., Щербань Э.П., Линник П.Н. и др. Эколого-токсикологическая ситуация в водной среде // Гидробиологический журнал. 1989. Т. 25. Вып. 6. С. 91—101.

Быков М.И. Об учете комбинированного действия веществ в сточных водах // Токсикологический вестник. 1996. № 2. С. 23—24.

Волков И.В., Заличева И.Н. Эколого-токсикологические принципы регионального лимитирования содержания металлов в поверхностных водах // Гидробиологический журнал. 1993. Т. 29. Вып. 1. С. 52—58.

Волцит О.В., Черняковский М.Е. Природа России: жизнь животных. Беспозвоночные. М., 1999. С. 768.

Гелашвили Д.Б., Лукичев Ю.Ф., Безруков М.Е., Лисенкова Н.В., Силкин А.А., Логинов В.В. Итоги и перспективы применения методов биотестирования для оценки токсичности возвратных вод: Нижегородский опыт // Экология и промышленность России. 1998. Октябрь. С. 30—36.

Гелашвили Д.Б., Туманов А.А., Безруков М.Е., Лисенкова Н.В., Барина О.К., Крестьянинов Н.П. Методологические проблемы применения биологических тест-объектов в экоаналитике // Аналитическая химия. М., 1999. Т. 54. С. 909—917.

Голубев А.А., Люблина Е.И., Толоконцев Н.А., Филлов В.А. Количественная токсикология. Л., 1973. С. 287.

Григорьев Ю.С. Методические рекомендации по проведению практических работ по экологии на базе учебно-экологической лаборатории. Красноярск, 1999. С. 30.

Гроздов А.О., Ибрагим А.М., Патин С.А., Соколова С.А. Сравнительная оценка токсического действия загрязняющих веществ на некоторые виды зоопланктонных организмов // Экспериментальные исследования влияния загрязнений на водные организмы. Апатиты, 1979. С. 15—18.

Гудкова Н.С. Чувствительность к пестицидам некоторых высших ракообразных Волгоградского водохранилища и прилежащих водоемов // Тр. комплексной экспедиции Сарат. ун-та по изучению Волгоградского и Саратовского водохранилищ. 1979. № 8. С. 71—75.

Дивавин И.А. Влияние нефти и фенола на некоторые свойства нуклеиновых кислот черноморских креветок // Биология моря. 1975. № 3. С. 62.

Дивавин И.А., Ерохин В.Е. Изменение биохимических показателей некоторых прибрежных гидробионтов Баренцева моря при экспериментальной нефтяной интоксикации // Гидробиологический журнал. 1978. Т. 14. № 5. С. 73—77.

Докучаев В.В. Учение о зонах природы. М., 1948. С. 64.

Ермаков Н.В. Медицинские свойства различных пленкообразователей и их смесей // Медицинская паразитология. 1943. № 3. С. 42—54.

Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. М., 1997. С. 117.

Жмур Н.С. Токсикологический мониторинг источников загрязнения водных объектов // Токсикологический вестник. 1999. № 3. С. 7—13.

Злочевская И.В. Токсическое действие комплексного соединения свинца с DL-цистеином на *Aspergillus niger* // Микробиология. 1968. № 5. С. 848—854.

Золотев Ю.А. Методология экоаналитического контроля // Журнал аналитической химии. 1999. Т. 54. № 3. С. 229.

Ивлева И.В. Биологические основы и методы массового культивирования беспозвоночных. М., 1969. С. 170.

Исакова Е.Ф., Строганов Н.С. Влияние триэтилоловохлорида, трипропилолово хлорида и трибутилоловохлорида на низших ракообразных // Оловоорганические соединения и жизненные процессы гидробионтов. М., 1975. С. 104—122.

Исакова Е.Ф. Сезонные изменения фактической плодовитости *Daphnia magna* в лабораторной культуре // Гидробиологический журнал. 1980. Т. 16. Вып. 4. С. 86—89.

Исакова Е.Ф. Реагирование некоторых низших ракообразных на химическое загрязнение воды: Дис. канд. биол. наук. М., 1982. С. 150.

Каган Ю.С., Леоненко О.Б., Сасинович Л.М., Авраменко В.Г. Комбинированное действие синтетических пиретроидов и фосфорорганических соединений // Токсикологический вестник. 1993. № 3. С. 15—16.

Каган Ю.С., Штабский Б.М. Проблема изучения и оценки комбинированного действия ксенобиотиков // Токсикологический вестник. 1996. № 5. С. 2—9.

Камшилов М.М. Буферность живой системы // Журнал общей биологии. 1973. Т. 34. Вып. 2. С. 174—194.

Камшилов М.М. Экологические аспекты загрязнения водных объектов и принципиальные пути борьбы с ними // Гидробиологический журнал. 1979. Т. 15. Вып. 1. С. 7—10.

Караваева Н.А. О процессах прогрессивного заболачивания в почвенном покрове тайги Западной Сибири. М., 1969. С. 69—81.

Кацнельсон Б.А., Новиков С.М. Методические подходы к изучению комбинированного действия промышленных вредных веществ // Гигиена и санитария. 1986. № 8. С. 59—63.

Квасников Е.И., Ключникова Т.М. Микроорганизмы — деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев, 1981. С. 132.

Кербабаев Э.Б., Мальцман Т.С. Сравнительная оценка действия некоторых фосфорорганических пестицидов на водных животных // Вопросы водной токсикологии. М., 1970. С. 116—121.

Ковалева Г.И., Бахашвили Т.Р. и др. Действие растворенных нефтепродуктов на некоторые виды черноморских рыб в онтогенезе // Мат-лы Всесоюзного симпозиума по изучению Черного и Средиземного морей, использованию и охране их ресурсов. Киев, 1973. Ч. 4. С. 51—56.

Ковалева Г.И. Некоторые физиолого-биохимические особенности реакции рыб на действие малых концентраций растворенных нефтепродуктов // Экологическая физиология рыб. 1976. С. 54—65.

Колосова Л.В., Строганов Н.С. Анализ механизма действия некоторых пестицидов на дафний по биологическим показателям // Экспериментальная водная токсикология. 1973. С. 134—145.

Копанев В.А. О расчете ожидаемого аддитивного эффекта комбинированного или комплексного действия ядов // Гигиена и санитария. 1990. № 6. С. 59—61.

Коскова Л.А., Козловская В.И. Токсичность синтетических поверхностно-активных и моющих средств для водных животных (Обзор) // Гидробиологический журнал. 1979. № 1. С. 77—84.

Котов А.М. Изменение некоторых показатели углеводного обмена в крови у смариды и морского языка при экспериментальном отравлении растворенными нефтепродуктами // Гидробиологический журнал. 1976. № 6. С. 84—88.

Кравченко М.Е. Исследование влияния дисперсантов нефти и нефтепродуктов на сине-зеленые водоросли: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1977. С. 150.

Крестьянинов П.А. Токсические комбинированные эффекты тяжелых металлов при их определении биологическим методом анализа на бактериях: Дис. ... канд. биол. наук. Н.Новгород, 2002. С. 150.

Куликов М.А., Малашенко Ю.Р. Упрощенный способ оценки точности проведения теоретической кривой летальности // Фармакология и токсикология. 1966. Т. 29. № 5. С. 621—624.

Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1980. С. 293.

Лазарев Н.В. Общие основы промышленной токсикологии. М.; Л., 1938. С. 338.

Лазарева Л.П. Изменения биологических параметров при хроническом воздействии низких концентраций меди и никеля на *Daphnia magna* Straus // Гидробиологический журнал. 1985. Т. 21. Вып. 5. С. 53—56.

Лезин В.А., Тюлькова Л.А. Озера Среднего Приобья // Комплексная характеристика. Тюмень, 1994. С. 146.

Лесников Л.А. О типах действия сточных вод на водоемы и водные организмы // Вопросы рыбного хозяйства на внутренних водоемах СССР. Л., 1969. С. 265—276.

Лесников Л.А. Сравнение различных методик проведения водно-токсикологических экспериментов // Изв. НИОРХ. 1976. С. 3—7.

Лесников Л.А. Основные задачи, возможности и ограничения биотестирования // Теоретические вопросы биотестирования / Под ред. В.И. Лукьяненко. Волгоград. 1983. С. 3—12.

Лившиц П.З. О вычислении средней смертельной дозы // Фармакология и токсикология. 1966. Т. 29. № 1. С. 113—118.

Линник П.Н. Формы миграции тяжелых металлов и их действие на гидробионтов // Экспериментальная водная токсикология. Рига, 1986. Вып. 2. С. 144—154.

Мазманиди Н.Д. О симптоматологии отравления гидробионтов нефтью // Рыбное хозяйство. 1974. № 9. С. 28—32.

Макрушин А.В. Опыт использования в биотестировании разных видов ветвистоусых ракообразных // Влияние биологически активных веществ на гидробионтов: Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. Л., 1988. Вып. 287. С. 92—95.

Максимов В.Н. Специфические проблемы изучения комбинированного действия загрязнителей на биологические системы // Гидробиологический журнал. 1977. Т. 13. № 4. С. 34—45.

Мерц В. Современные обобщенные показатели при мониторинге природных и сточных вод // Журнал аналитической химии. 1994. Т. 49. № 6. С. 557—566.

Методическое руководство по биотестированию воды. РД-118-02-90. М., 1991. С. 71.

Мошковский Ш.Д. Функциональные кривые и типы экспериментов количественной химиотерапии // Медицинская паразитология. 1941. № 10. С. 204—216.

Невмержецкий Н.С. Структурный анализ // Токсикологический вестник. 1996. № 1. С. 15—19.

Никаноров А.М. Гидрохимия. Л., 1989. С. 352.

Никаноров А.М., Жулидов А.В. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. Л., 1991. С. 311—312.

Орлова В.В. Западная Сибирь. Л., 1962. С. 360.

Осипова Н.И. Определение малых количеств вещества с помощью некоторых биологических объектов: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Горький, 1969. С. 136.

Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб водных объектов для анализа на загрязненность. ГОСТ 17.1.5.04-81. М., 1981. С. 12.

Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды, водоемов и водотоков. ГОСТ 17.1.3.07-82. М., 1982. С. 12.

Петин В.Г., Сынзыныс Б.И. Комбинированное воздействие факторов окружающей среды на биологические системы: Учеб. пособие для студ. спец. 013100 «Экология». Обнинск, 1998. С. 74.

Пиковский Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. М., 1993. С. 206.

Плотников В.В. Экология Ханты-Мансийского автономного округа. Тюмень, 1997. С. 288.

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.3-99. Токсикологические методы контроля. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний. М., 1999. С. 31.

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.4-99. Токсикологические методы контроля. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости цериодафний. М., 1999. С. 31.

Пожаров А.В., Рахманин Ю.А., Шелематов С.А., Михайлова Р.И. Прикладные аспекты аппаратурного биотестирования воды // Гигиена и санитария. 1994. Вып. 8. С. 18—21.

Прозоровский В.Б. О выборе показателя выносливости при токсикологических исследованиях // Фармакология и токсикология. 1967. Т. 30. № 2. С. 240—243.

Протасов В.Ф., Матвеев А.С. Экология: Термины и понятия. Стандарты, сертификация. Нормативы и показатели: Учеб. и справ. пособие. М., 2001. С. 208.

Ривьер И.К., Флеров Б.А. Действие полихлорпинена на некоторые биологические показатели и структуру популяции // Экспериментальная водная токсикология. 1973. № 5. С. 117—133.

Рыбак Е.И., Лисункин Ю.И., Калинин О.М. Нахождение 50% и других доз методом стохастической аппроксимации // Фармакология и токсикология. 1966. Т. 29. № 3. С. 368—370.

Сапрыкина Е.А. Влияние температурного режима и некоторых антропогенных факторов водной среды на жизнедеятельность дафний: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Борок, 2000. С. 21—22.

Сафонова Т.А. Накопление ртути и других тяжелых металлов водорослями и водными растениями. Поведение ртути и других тяжелых металлов в экосистемах. Новосибирск, 1989. С. 64—87.

Седых А.С., Попов П.В., Абеленцева Г.М. и др. Чувствительность биологического и тонкослойно-хроматографического методов определения остатков пестицидов // Проблемы аналитической химии. Т. 2. Методы анализа пестицидов. М., 1972. С. 130—135.

Солнцева Н.П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. М., 1998. С. 376.

Состояние окружающей среды Ханты-Мансийского автономно-го округа в 2000 г. Обзор. Ханты-Мансийск, 2001. С. 314.

Состояние окружающей природной среды и природных ресурсов в Нижневартовском районе в 2000—2002 гг.: Обзор. Вып. 5. Нижневартовск, 2003. С. 126.

Старков В.Д., Тюлькова Л.А. Геология и геоморфология. Тюмень, 1996. С. 378.

Степанов А.М. Концепция ПДК: за и против // Биологические науки. 1989. № 9. С. 61—67.

Строганов Н.С. Методика быстрого определения токсичности водной среды // Вест. МГУ. Сер. 3. Биология. 1968. С. 40—46.

Строганов Н.С. Методика определения токсичности водной среды // Методика биологических исследований / Под ред. В.С.Строганова. М., 1971. С. 14—60.

Строганов Н.С. Токсическое загрязнение водоемов и деградация водных экосистем // Водная токсикология. М., 1976. С. 5—47.

Строганов Н.С. Принципы оценки нормального и патологического состояния водоемов при химическом загрязнении // Теоретические вопросы водной токсикологии. Л., 1981. С. 16—29.

Строганов Н.С., Филенко О.Ф., Лебедева Г.Д. и др. Основные принципы биотестирования сточных вод и оценка качества вод природных водоемов // Теоретические вопросы биотестирования // Под ред. В.И.Лукияненко. Волгоград, 1983. С. 21—29.

Толкачева (Александрова) В.В. Оценка токсичности нефти Самотлорского месторождения методом биотестирования // Эколого-географические проблемы природопользования нефтегазовых регионов: Теория, методы, практика: Мат-лы II Международной науч.-практич. конф. (Нижевартовск, 22—24 октября 2003 г.) / Отв. ред. Ф.Н.Рянский, С.Н.Соколов. 2003. С. 452.

Толкачева (Александрова) В.В. Оценка токсичности природных вод методом биотестирования // Александр фон Гумбольдт и проблемы устойчивого развития Урало-Сибирского региона: Мат-лы российско-германской конф. Тюмень, Тобольск, 20—22 сентября 2004 г. Тюмень, 2004. С. 404.

Толкачева (Александрова) В.В. Оценка загрязненности озера Самотлор // Успехи современного естествознания. 2004. № 10. С. 81—83. URL: www.rae.ru.

Толоконцев Н.А. О некоторых методах количественной оценки токсичности химических веществ // Применение математических методов в биологии. Л., 1964. Т. 3. С. 135—164.

Трахтенберг И.М. Проблемы нормы в токсикологии. М., 1991. С. 145.

Троли П. Факториальная экология. Киев, 1989. С. 232.

Труды NDI. Пути и средства достижения сбалансированного эколого-экономического развития в нефтяных регионах Западной Сибири. Нижевартовск, 1997. Вып. 1. С. 24—25.

Трунова О.Н. Химические загрязнения и их воздействие на биологические факторы самоочищения. Биодegradация химических загрязнителей в водной среде // Биологические факторы самоочищения водоемов и сточных вод. Л., 1979. С. 81—93.

Туманов А.А., Постнов И.Е. Водные беспозвоночные как аналитические индикаторы // Гидробиологический журнал. 1983. Т. 19. № 5. С. 3—16.

Тюлькова Л.А. Озера Среднего Приобья // Гидрология и гидробиология Западной Сибири. Л., 1975. С. 98.

Федоренко В.И. Методика оценки комбинированного действия вредных веществ в токсиколого-гигиенических исследованиях // Гигиена и санитария. 1987. № 10. С. 56—58.

Федоров В.И. Оценка приоритета в ряду загрязнителей // Всесторонний анализ окружающей природной среды: Тр. III советско-американского симпозиума. Ташкент, 1977. С. 139—145.

Фелленберг Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию / Пер. с нем. М., 1997. С. 232.

Филенко О.Ф., Исакова Е.Ф. Предсказание токсического эффекта загрязняющих веществ на гидробионтов в отдаленный период на основе острых опытов // Теоретические вопросы водной токсикологии. Л., 1981. С. 121—137.

Филенко О.Ф. Водная токсикология. М., 1988. С. 156.

Филенко О.Ф., Лазарева В.В. Влияние токсических агентов на общебиологические и цитогенетические показатели у дафний // Гидробиологический журнал, 1989. Вып. 3. С. 56—60.

Флеров Б.А., Лапкина Л.Н. Избегание растворов некоторых токсических веществ медицинской пиявкой // Биология внутренних вод. Информ. бюл., 1976. № 30. С. 48—52.

Франке З., Франц П., Варнке В. Химия отравляющих веществ. Ч. 2. М., 1973. С. 40.

Хоружая Т.А. Оценка экологической опасности. Обеспечение безопасности, методы оценки рисков, мониторинг. М., 2002. С. 208.

Школьный экологический мониторинг: Учеб.-метод. пособие / Под. ред. Т.Я.Ашихминой. М., 2000. С. 468.

Щербань Э.П. Сравнительная оценка токсического действия пестицидов и тяжелых металлов на популяции ветвистоусых раков // Формирование и контроль качества поверхностных вод. Киев, 1975. Вып. 1. С. 81—89.

Щербань Э.П. Токсичность ионов некоторых тяжелых металлов для *Daphnia magna* Straüs в зависимости от температуры // Гидробиологический журнал. 1977. Т. 13. Вып. 4. С. 86—91.

Щербань Э.П. Сравнительная оценка эффективности биотестирования на различных видах Cladocera // Гидробиологический журнал. 1992. Т. 28. Вып. 4. С. 76—81.

Andelman I.B., Suess M.Y. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment // Bull. Wld. Heth. Org. 1970. № 3. P. 479—508.

Anderson B.G. The apparent thresholds of *Daphnia magna* for chlorides of various metals when added to lake Erie water // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1950. 78. P. 9.

Baldwin W.S., Milan D.L., Leblanc D.A. Physiologicol and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen decthylstilbestrol // *Environ. Toxicol. and Chem.* 1995. 14. № 6. P. 945—952.

Baudouin A.F., Scoppa P. Metodi biologici per la determinazione della gualita della acqua: influenza del pH dell acqua di diluizione // *Boll. Soc. ital. biol. Sper.* 1975. № 8. P. 30.

Bertran P.E., Hart B.A. Longevity and reproduction of *Daphnia pulex* exposed to cadmium contaminated food of water // *Environ. Pollut.* 1979. № 4. P. 295—305.

Beurskens J.E.M., Winkels H.J., J.de Wolf and Dek C.G.C. Trends of priority pollutants in the Rhine during the last years // *Water Sci. Technol.* 1994. P. 77—85.

Biesinger K.E., Christensen G.M. Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. *J.Fish. Res. Board Can.*, 1972. P. 1691—1700.

Blac J.A., Roberts R.F., Jonson D.M. et al. The significance of physicochemical variables in aquatic bioassay of heavy metals. *Bioassay Techn. and Environ. Chem. Ann Arbor*, 1973. P. 259—275.

Blokker P. Die Ausbreitung von ol auf Wasser. // “Deutsche” Gewasserkunliche Mitteilungen. 1966. № 4. S. 112—114.

Burton G.A.Jr., Stemmer B.I., Winks K.L.A. Multitrophic level evaluation of sediment toxicity in Wankegen and Indiana harbors // *Environ Toxicol. Chem.* 1989. V. 8. P. 1057—1066.

Cairns J., Heath A.G.Jr., Parker B.G. The effects of temperature upon the toxicity of chemical to aquatic organisms. *Hydrobiologia.* 1975. P. 135—171.

Carter I.W., Cameron I.L. Toxicity bioassay of heavy metals in water using *Tet-rahymena pyriformis*. *Water Res.*, 1973. P. 951—961.

Darwazch H.A., Mulla M.S. Biological activity of organophosphorus compounds and synthetic pyrethroides against immature mosquitos // *Mosquito News.* 1974. № 2. P. 151—155.

Dawson F.H., Robinson W.N. Submerged macrophytes and the hydraulic roughness of a lowland chalkstream // *Verh. Intern. Verein. Limnol.* 1994. № 22. P. 1944—1948.

Dryl S. Response of eiliate protozoa to experimental stimuli // *Acta protozool.* 1970. № 23. P. 325—352.

Frear D., Boyd J. Use of *Daphnia magna* for the microbioassay pesticides. 1. Development of standardized techniques for rearing *Daphnia* and preparation of dosage-mortality curves for pesticides // *J. Economic Entomology.* 1967. № 5. P. 1228—1236.

Gacher R., Lum-Shue-Chan, Chan I. Complexing capacity of the nutrient medium and its relation to inhibition of algae photosynthesis by copper. // *Schweiz. Z. Hydrol.* 1973. № 2. P. 252—261.

Giesy J.P., Hoke R.A. Freshwater sediment quality criteria toxicity assessment // *Sediment Chemistry and toxicity of in-place Pollutants.* Boca Raton, F J, Lewis Publister, 1996. P. 265—348.

Hansen I.C. and Bonde G.I. Microbiological determination mercury in traceamounts // *Revue internationale oceanographie medicale.* 1969. V. 15—16.

Javier R., Bluzat J.R., Rodrigues-Ruiz F.I., Seuge I. Toxicite aigue de 5 agents polluants sur 4 especes d'invertebres habitant les eaux douces.— *C. r. Acad. sci.t* 1976. № 9. P. 1089—1092.

Kawtski A., Schmulbach J.C. Toxicity of aldrin and dieldrin to the freshwater Ostra-cod *Chlamydotheca arcuata* // *J. Economic Entomol.* 1971. № 5. P. 1082—1085.

Knapek R., Lacota St. Einige Biotests zur Untersuchung der toxischen Wirkunge von Pestiziden un Wasser. // *Tagungsber. Acad. Landwirtschaftswass. DDR.* 1974. № 126. S. 105—109.

Lake P.S., Swain R., Mills B. Lethal and sublethal effects of cadmium on freshwater crustaceans // *Austral. Water Resour. Council. Techn. Pap.* 1979. № 37. P. 3—17.

Lay I.P., Schauerte W., Miller A., Klein W., Korte F. Influence of Beusene on the Phytoplankton and *Daphnia pulex* in Compartments of an Experimental Pond, *Ecotoxicol, Environ.* 1985. P. 218—227.

Leppakoski E.I., Linstrom L.S. Effects of lindane on the predator—prey interaction between // *J Fish. Res. Board. Can.* 1987. V. 35. № 5. P. 766.

Maki A.W., Bishop W.E. Acute toxicity studies of surfactants to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. // *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* 1979. № 5. P. 599—612.

Methoden zur Bestimmung der Toxizitat. In: *Ausgewahlte Methoden den Wasserun-tersuchung. Band 2. Iena, 1970. S. 206—209.*

Miura Takeni Takashi R. M. Insect developmental inhibitors. Effects of candidate mosquito control agents on monotarget aquatic organisms // *Environ. Entomol.* 1974. № 4. P. 631—636.

Muirhead-Thomson R.C. Relative susceptibility of stream macroinvertebrates to temephos and chlorpyrifos, determined in laboratory continuous flow-system // *Arch. Environ. Contam. and Toxicol.* 1979. № 2. P. 129—137.

Nakatani J. Effects of various chemicals on the behaviour of *Paramecium caudatum*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, 1970. Ser. 6, 17. № 3. P. 401—410.

Nuzzi R. Effekt of water soluble extracts of oil on phutoplancton. *Proc. Joint Conf, Prer, and Contr. Oil Spills. Washington*, 1978. P. 809—913.

Phillips D.J. Use of biological indicator organisms to quantitate organochlorine pollutants in aquatic environmental // *A review. Environ. Pollut.* 1978. № 3. P. 205—229.

Pietrowicz-Kosmynska D. The influence of definite ionic medium on the negative chemotaxic in *Stentor coeruleus* // *Acta protozool.* 1971. № 15—21. P. 305—322.

Pietrowicz-Kosmynska D. The potassium-calcium equilibrium and chemotoxic sensitivity in *Stentor coeruleus* // *Indeed.* 1972. № 22—26. P. 349—363.

Qureshi S.A., Saksena A.B., Singh V.P. Acute toxicity of some heavy metals to fish food organisms // *Int. Environ. Stud.* 1980. № 3. P. 325—327.

Schweyer P. Test de toxicite de effluents. *Circ. informs techn. // Cent. doc. sider.* 1974. № 2. P. 2619—2623.

Sleigh M.A. Some factors affecting the excitation of contraction in *Spirostomum* // *Acta protozool.* 1970. № 23—30. P. 335—352.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ГИДРОСФЕРЫ И ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЕГО УРОВНЯ.....	5
1.1. Основные группы веществ, загрязняющих водоемы, и их влияние на водные экосистемы	5
1.2. Биотестирование как современный метод оценки качества окружающей природной среды.....	9
1.3. Нормирование качества природной среды	14
Глава 2. ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ КАК АНАЛИТИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ.....	19
2.1. Живые организмы различных систематических групп, используемые в качестве аналитических индикаторов	19
2.2. Биотестирование с использованием <i>Daphnia magna</i>	25
2.3. Биотестирование с использованием <i>Ceriodaphnia affinis</i>	29
2.4. Биотестирование с использованием <i>Chlorella vulgaris</i>	37
2.5. Биотестирование с использованием <i>Elodea canadensis</i> Rich	41
2.6. Биотестирование с использованием <i>Lemna minor</i> L.	43
2.7. Биотестирование с использованием прорастающих семян растений	44
2.8. Биотестирование с использованием <i>Lumbricus terrestris</i>	45
2.9. Биотестирование с использованием <i>Poecilia reticulata</i> Peters.....	47
2.10. Биотестирование с использованием <i>Rattus</i>	49
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ ВОД МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ	51
3.1. Физико-географическая характеристика района исследования	51
3.2. Сезонная динамика хронической токсичности природных вод	55
3.3. Зависимость токсичности природных вод от химического состава	92
3.4. Статистическая обработка результатов экспериментов	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106

Научное издание

Александрова Виктория Викторовна

**БИОТЕСТИРОВАНИЕ
КАК СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ
ТОКСИЧНОСТИ ПРИРОДНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД**

Монография

Редактор *Т.А.Фридман*
Компьютерная верстка *А.З.Насибуллиной*
Художник обложки *К.В.Латыпова*

Изд. лиц. ЛР № 020742. Подписано в печать 25.12.2013
Формат 60×84/16. Бумага для множительных аппаратов
Гарнитура Times. Усл. печ. листов 7,5
Тираж 300 экз. Заказ 1491

*Отпечатано в Издательстве
Нижевартовского государственного университета
628615, Тюменская область, г.Нижевартовск, ул.Дзержинского, 11
Тел./факс: (3466) 43-75-73, E-mail: izdatelstvo@nggu.ru*