

**О.А. Ляшенко,  
М.А. Кустикова, Л.А. Конопелько,  
Е.А. Быковская, И.В. Тимофеева,  
А.В. Василевская, А.С. Маюрова**

## **ЭКОЛОГИЯ**

# **БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ В ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**



**Санкт-Петербург**

**2019**

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**О.А. Ляшенко,  
М.А. Кустикова, Л.А. Конопелько,  
Е.А. Быковская, И.В. Тимофеева,  
А.В. Василевская, А.С. Маюрова**

**ЭКОЛОГИЯ**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ В ОЦЕНКЕ  
СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

**Учебно-методическое пособие**

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлениям подготовки

12.03.02 Оптотехника, 12.03.03 Фотоника и оптоинформатика,

12.03.05 Лазерная техника и лазерные технологии,

16.03.01. Техническая физика

в качестве учебно-методического пособия для реализации основных  
профессиональных образовательных программ высшего образования  
бакалавриата

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Санкт-Петербург  
2019**

Ляшенко О.А., Кустикова М.А., Конопелько Л.А., Быковская Е.А., Тимофеева И.В., Василевская А.В., Маюрова А.С., Экология. Биологические системы в оценке состояния окружающей среды. Учебно-методическое пособие. – СПб: Университет ИТМО, 2019. – 51 с.

**Рецензент:** Кустиков Ю.А., к.т.н., доцент факультета низкотемпературной энергетики Университет ИТМО

Дисциплина «Экология» относится к дисциплинам общепрофессионального модуля учебного плана бакалаврской программы. При освоении дисциплины значительное внимание уделяется лабораторному практикуму, который знакомит студентов с методами оценки состояния природной среды с использованием биологических систем. Настоящее учебно-методическое пособие включает теоретические сведения и методические указания к самостоятельной работе студента, предназначенные для выполнения лабораторных работ по оценке последствий антропогенного воздействия на окружающую среду методом биологической индикации.



**Университет ИТМО** - ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО - участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО - становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2019

© Ляшенко О.А., Кустикова М.А., Конопелько Л.А., Быковская Е.А., Тимофеева И.В., Василевская А.В., Маюрова А.С., 2019

## Содержание

Введение .....	4
Лабораторная работа № 1 Определение уровня загрязнения воздуха по состоянию сообщества эпифитных лишайников .....	6
Лабораторная работа № 2 Характеристика свойств почвы с помощью растений- индикаторов .....	12
Лабораторная работа № 3 Оценка загрязнения водных объектов органическим веществом с использованием индикаторов сапробности .....	17
Лабораторная работа № 4 Оценка уровня загрязнения водных объектов органическим веществом методами крупных таксонов.....	22
Лабораторная работа № 5 Определение острой токсичности воды и донных отложений по результатам биотестирования .....	27
Лабораторная работа № 6 Оценка хронической токсичности воды и донных отложений по результатам биотестирования .....	34
Лабораторная работа № 7 Определение класса опасности отходов по результатам биотестирования .....	39
Лабораторная работа № 8 Определение LC50 и IC50 по результатам биотестирования .....	43
Список использованной литературы.....	50

## Введение

Оценка последствий антропогенного воздействия на окружающую среду, наряду с физическими и химическими методами, включает применение биологических методов, которые позволяют получить информацию о реакции организмов на стрессовые воздействия, обусловленные различными видами хозяйственной деятельности человека или природными факторами.

Определение биологически значимых воздействий по реакции на них живых организмов осуществляется на основе выделения биологических систем различного уровня (от молекулярного до экосистемного), которые наилучшим образом позволяют оценить степень отрицательного воздействия на компоненты природной среды. Подобный подход получил название биоиндикации, в нём выделяются два основных направления: пассивная и активная.

Пассивная биоиндикация – определение у биологических систем повреждений и отклонений от нормы, позволяющих сделать выводы о неблагоприятных воздействиях компонентов природной среды, в которой они обитают.

Активная индикация, которую чаще называют биотестированием – определение отрицательного воздействия определённого фактора или комплекса факторов на специально выращиваемые для этих целей организмы - тест-объекты, осуществляемое, в большинстве случаев, на основании опытов в лабораторных условиях,

Преимуществом биологических методов является интегральный характер реакций биологических систем на внешние отрицательные воздействия, позволяющий дать наиболее объективную оценку степени антропогенного изменения компонентов среды их обитания. Биологические методы позволяют выявить как наличие в природной среде комплекса неблагоприятных факторов, вызывающих её деградацию, так и интенсивность их воздействия. В условиях хронической антропогенной нагрузки они могут демонстрировать отрицательный эффект слабых воздействий ввиду их аккумуляции. Использование биологических методов в отдельных случаях позволяет избежать применения дорогостоящих и трудоёмких физических и химических методов оценки, а также может выявить источники поступления и места концентрации вредных воздействий на природную среду.

К преимуществам биологических методов можно отнести также реакцию живых организмов на кратковременные залповые выбросы токсикантов, которые не регистрируются стандартными методами контроля с периодическим отбором проб для анализа.

Анализ результатов исследований с использованием биологических методов (в комплексе с физическими и химическими) позволяет нормировать допустимую антропогенную нагрузку на экосистемы, которая может существенно различаться при одном и том же объёме воздействий в зависимости от их широтного расположения, состава биоты и других факторов.

В предлагаемом пособии представлен цикл лабораторных работ, выполняемых в рамках курса «Экология» для основных профессиональных образовательных программ высшего образования бакалавриата по направлениям подготовки 12.03.02 Оптотехника, 12.03.03 Фотоника и оптоинформатика, 12.03.05 Лазерная техника и лазерные технологии, 16.03.01. Техническая физика. Для работы с пособием необходимо изучение теоретического материала в рамках тем программы данной дисциплины.

В методические указания включено описание восьми лабораторных работ. Основная цель выполнения лабораторных работ – помочь студентам овладеть практическими навыками определения состояния окружающей среды с помощью методов биоиндикации. Вводная часть в каждой работе помогает наряду с лекционным материалом подготовиться к предстоящей работе. Студенты выполняют лабораторные работы самостоятельно или в группах. Полученные при этом результаты оформляются в отчеты, подлежащие защите в течение семестра, но не позднее зачетной недели. Распределение трудозатрат студентов в аудитории и в процессе СРС представлено в соответствии с программой изучаемой дисциплины.

## Лабораторная работа № 1 Определение уровня загрязнения воздуха по состоянию сообщества эпифитных лишайников

**Цель работы:** оценка уровня загрязнения воздуха, ориентировочная оценка концентрации  $SO_2$  по составу и количественным показателям развития сообщества эпифитных лишайников

**Объект исследования:** видовой состав сообщества эпифитных лишайников, показатели их устойчивости к загрязнению воздуха, проективное покрытие индикаторных видов лишайников, входящих в состав сообщества.

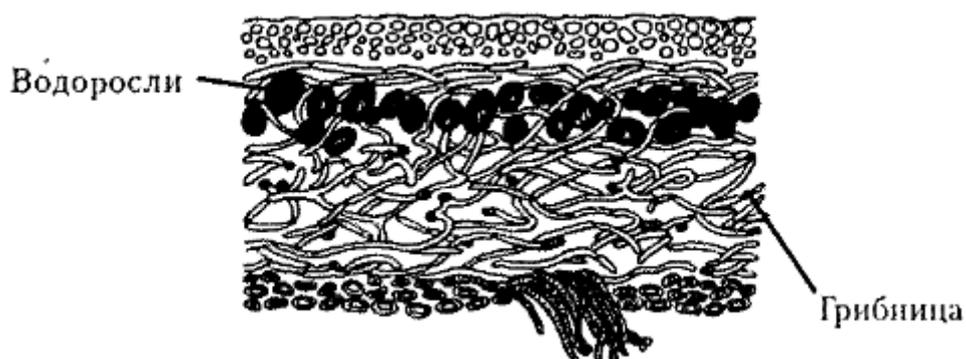
**Задачи, решаемые в работе:**

1. Ознакомление с методикой оценки загрязнения воздуха по видовому составу индикаторных лишайников.

2. Ознакомление с методикой расчёта индекса толерантности на основании состава индикаторных видов лишайников и их проективного покрытия

### *Теоретические сведения*

Лишайники – это симбиотические организмы. Слоевище лишайника (таллом) состоит из двух частей: мицелия гриба (микобионт) и водоросли (фитобионт) (рисунок 1). Водоросли и грибы, входящие в симбиоз, могут отличаться по своей систематической принадлежности. Большинство грибов, формирующих лишайники, относятся к сумчатым. Водоросли, входящие в состав лишайника, в основном зеленые и синезеленые (цианобактерии). Основная функция водорослей – это обеспечение гриба растворенными органическими веществами. А гриб, в свою очередь, дает им минеральные вещества и воду. В лишайнике могут присутствовать водоросли одного вида или двух (синезелёная водоросль (цианобактерия) и зелёная). Грибы, формирующие лишайники, не могут существовать без водорослей, тогда как входящие в состав лишайников водоросли могут развиваться самостоятельно.



*Рисунок 1 – Строение лишайника*

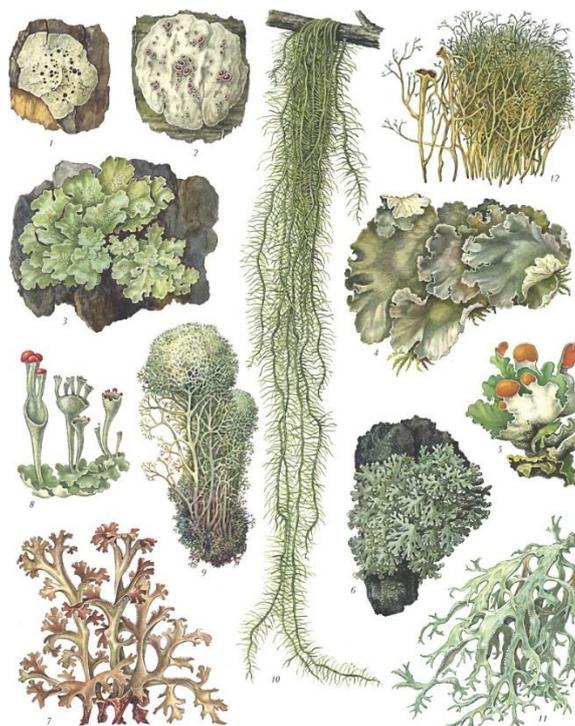
Лишайники могут получать питание из воздуха, атмосферных осадков, влаги росы, частиц пыли, нуждаются в освещении, поскольку содержат фотосинтезирующий компонент. Они устойчивы к экстремальным условиям,

переносят значительные колебания температур и влажности, но чувствительны к загрязнению воздуха, поскольку, ввиду своего строения, не имеют структур, препятствующих проникновению токсичных веществ. Среди биологических методов оценки загрязнения воздуха существует отдельное направление, называемое лишеноиндикацией. Лишайники особенно чувствительны к содержанию оксидов серы и азота, фторо-и хлороводорода, а также тяжелых металлов.

Лишайники можно классифицировать по внешнему виду слоевища (рисунок 2):

- накипные (напоминают корку, плотно срастаются с субстратом, иногда могут развиваться внутри него);
- листоватые (имеют таллом в виде пластинок, который прикреплен к поверхности толстой короткой ножкой);
- кустистые (слоевище образует множество округлых или плоских веточек).

Чувствительность лишайника к загрязнению воздуха в значительной степени зависит от удельной площади его поверхности, поэтому устойчивость лишайников к загрязнению повышается в ряду: кустистые - листоватые - накипные.



*Рисунок 2 – Различные типы лишайников*

Для оценки загрязнения воздуха определяется видовой состав индикаторных видов лишайников на участке леса или парка. Между деревьями отмеряют расстояние 5–10 м, для исследования берется 10 деревьев одного вида. Исследуются неповрежденные деревья, схожего размера и возраста. Чтобы оценить площадь проекции лишайника на поверхности дерева, к стволу дерева

на высоте 0,3–1,3 м прикладывается прозрачная сетка (палетка), расчерченная на квадраты. Параллельно с подсчётом количества квадратов, занимаемых каждым лишайником, производится определение их видового состава.

### **Материал для выполнения работы**

Карточка с результатами исследования сообщества лишайников: видовой состав, площадь проективного покрытия. Таблицы рабочей шкалы для определения биотического индекса и для определения классов полеотолерантности.

### **Порядок выполнения работы**

Уровень загрязнения воздуха определяется двумя методами: по видовому составу сообщества (биотический индекс) и видовому составу с учётом площади проективного покрытия каждого индикаторного вида.

1. По рабочей шкале (таблица 1) определяется величина биотического индекса. После нахождения в первом столбце ячейки с названием лишайника, отмеченного по результатам проведённых исследований, выбирают строку «> 1 вида» или «1 вид» и на пересечении с столбцом, в интервал значений которого входит количество обнаруженных индикаторных видов, находят ячейку с величиной биотического индекса. По таблице 2 определяют соответствующие ему класс качества и уровень загрязнения атмосферного воздуха.

Таблица 1 – Рабочая шкала для определения биотического индекса по видовому разнообразию индикаторных лишайников

Лишайники	Видовое разнообразие	Общее количество обнаруженных индикаторных видов лишайников				
		0-1	2-4	5-7	8-10	> 11
Уснея ( <i>Usnea sp.</i> ), алектория	> 1 вида	—*	7	8	9	10
	1 вид	—	6	7	8	9
Эверния ( <i>Evernia sp.</i> ), анаптихия ( <i>Anaptychia ciliaris</i> ), рамалина ( <i>Ramalina farinacea</i> )	> 1 вида	—	6	7	8	9
	1 вид	—	5	6	7	8
Пармелия ( <i>Parmelia sp.</i> ), гипогимния ( <i>Hypogymnia physodes</i> )	> 1 вида	—	5	6	7	8
	1 вид	3	4	5	6	7
Ксантория ( <i>Xanthoria parietina</i> ), фисция ( <i>Physcia pulverulenta</i> )	> 1 вида	3	4	5	6	7
		2	3	4	5	6
Леканора ( <i>Lecanora sp.</i> ), графис ( <i>Graphis scripta</i> ), другие накипные лишайники	Все виды	1	2	3	—	—

\*— Ситуация, не встречающаяся в природе.

Таблица 2 – Класс качества и степень загрязнения воздуха в соответствии с значениями биотического индекса

Биотический индекс	Класс качества	Степень загрязнения
10	6	6-я зона: очень чистый воздух концентрация $SO_2 < 0,005$ мг/м <sup>3</sup>
7-9	5	5-я зона: чистый воздух концентрация $SO_2 = 0,005—0,009$ мг/м <sup>3</sup>
5-6	4	4-я зона: относительно чистый воздух концентрация $SO_2 = 0,01—0,05$ мг/м <sup>3</sup>
4	3	3-я зона: умеренное загрязнение концентрация $SO_2 = 0,05—0,1$ мг/м <sup>3</sup>
2-3	2	2-я зона: сильное загрязнение концентрация $SO_2 = 0,1—0,3$ мг/м <sup>3</sup>
0-1	1	1-я зона: очень сильное загрязнение концентрация $SO_2 = 0,3-0,5$ мг/м <sup>3</sup>

2. Для каждого индикаторного лишайника по таблице 3 определяют класс полеотолерантности.

Таблица 3 – Классы полеотолерантности и типы местообитаний эпифитных лишайников (по Х.Х. Трассу)

Классы полеотолерантности	Типы место обитаний лишайников и их встречаемость	Виды
I	Естественные, без ощутимого антропогенного воздействия	<i>Lecanora abietina</i> , <i>Parmeliella</i> , самые чувствительные виды рода <i>Usnea</i>
II	Естественные (часто) и слабо антропогенно измененные (редко)	<i>Evernia divaricata</i> , <i>Lecanora coilocarpa</i> , <i>Parmeliopsis aleurites</i> , <i>Ratnalina calicaris</i>
III	Естественные (часто) и слабо антропогенно измененные (часто)	<i>Bryoria fuscescens</i> , <i>Hypogymnia tubulosa</i> , <i>Pertusaria pertusa</i> , <i>Usnea subfloridana</i>
IV	Естественные (часто) и слабо (часто) и умеренно антропогенно измененные (редко)	<i>Cetraria pinastri</i> , <i>Graphis scripta</i> , <i>Armeliopsis ambigua</i> , <i>Usnea filipendula</i>
V	Естественные и слабо, и умеренно антропогенно измененные с равной встречаемостью	<i>Caloplaca pyracea</i> , <i>Lecanora subfuscata</i> , <i>Parmelia olivacea</i> , <i>Physcia aipolia</i>
VI	Естественные (сравнительно редко) и умеренно антропогенно измененные (часто)	<i>Evernia prunastri</i> , <i>Hypogymnia physodes</i> , <i>Lecanora allophana</i> , <i>Usnea hirta</i> , <i>Hypocenomyce scalaris</i> , <i>Pertusaria discoidea</i>
VII	Умеренно (часто) и сильно (редко) антропогенно измененные	<i>Lecanora varia</i> , <i>Parmelia sulcata</i> , <i>Pertusaria amara</i> , <i>Physcia ascendens</i>
VIII	Умеренно и сильно антропогенно измененные (с равной встречаемостью)	<i>Caloplaca cerina</i> , <i>Physconia grisea</i> , <i>Ratnalina pollinaria</i>
IX	Сильно антропогенно измененные (часто)	<i>Phacophyscia orbicularis</i> , <i>Xanthoria parietina</i>
X	Очень сильно антропогенно измененные (встречаемость и жизненность видов низкие)	<i>Lecanora conizaeoides</i> , <i>Scoliciosporum chlorococcum</i>

Индекс полеотолерантности рассчитывается по формуле:

$$ИП = \sum_{i=1}^n \frac{a_i c_i}{c_n} \quad (1)$$

Здесь  $c_n$  – общее проективное покрытие;  $a_i$  – класс полеотолерантности  $i$  – го вида, определяемый по таблице 3 для каждого индикаторного вида лишайника;  $c_i$  – проективное покрытие  $i$ -го вида.

В соответствии с таблицей 4 определяют качество воздуха и соответствующие ему концентрации диоксида серы.

Таблица 4 – Характеристика степени загрязнения воздуха на исследованном участке и среднегодовые значения  $SO_2$  в соответствии с значениями индекса полеотолерантности (ИП)

ИП	Концентрация $SO_2$ в атмосфере, мг/м <sup>3</sup>	Качество воздуха
1-2	—	Очень чистый
2-5	0,01-0,03	Чистый
5-7	0,03-0,08	Относительно чистый
7-10	0,08—0,10	Умеренно загрязненный
10	0,10-0,30	Сильно загрязненный
0	Более 0,3	Очень сильно загрязненный (лишайниковая пустыня)

Результаты определений записывают, дают оценку качеству воздуха, сравнивают характеристики, полученные по двум различным методам.

#### **Пример выполнения задания**

На основании результатов исследования видового состава лишайников и площади их проективного покрытия определяют загрязнение воздуха по биотическому индексу и индексу полеотолерантности.

#### **Карточка задания к лабораторной работе № 1**

Результат исследования эпифитных лишайников на участке леса

Название лишайника	Проективное покрытие, см <sup>2</sup> /%
<i>Graphis scripta</i>	57/5,7
<i>Cetraria pinastrii</i>	125/12,5
<i>Lecanora coilocarpa</i>	68/6,8
<i>Evernia prunastri</i>	86/8,6
<i>Parmelia olivaceae</i>	35/3,5
<i>Hypogymnia physodes</i>	23/2,3
<i>Usnea filipendula.</i>	42/4,2
Суммарная площадь поверхности стволов деревьев	1000

1. Определение класса качества воздуха и степени его загрязнения по величине биотического индекса.

По таблице 1 определяют величину биотического индекса. Выбирают строку, в первой графе которой находится *Usnea sp.* (в данном случае – любой вид рода *Usnea*), далее подстроку 1 вид. На пересечении со столбцом 5–7 (общее количество обнаруженных индикаторных видов лишайников) определяют величину биотического индекса – 7. По таблице 2 определяем класс качества воздуха и степень его загрязнения: биотический индекс в диапазоне 7–9, класс качества – 5, 5-я зона: чистый воздух, концентрация  $SO_2 = 0,005—0,009$  мг/м<sup>3</sup>.

2. Определение качества воздуха и концентрации  $SO_2$  в атмосфере по результатам расчёта индекса полеотолерантности.

На основании данных о проективном покрытии (%) каждого лишайника, полученных по проективному покрытию в см<sup>2</sup>, определённого с помощью палетки и суммарной площади исследованной поверхности стволов деревьев, а также с учетом индекса полеотолерантности (из таблицы 3) каждого индикаторного лишайника рассчитывают индекс полеотолерантности по формуле (1).

$$ИП = \frac{(5.7*4+12.5*4+6.8*2+8.6*6+3.5*5+2.3*6+4.2*4)}{(5.7+12.5+6.8+8.6+3.5+2.3+4.2)} = 4,3$$

что по таблице 4 соответствует качеству воздуха «чистый», концентрация  $SO_2$  в атмосфере – 0,01–0,03 мг/м<sup>3</sup>.

В данном случае оценка качества воздуха как «чистого» по двум использованным методам совпадает.

***Вопросы к работе***

1. Каковы особенности строения лишайников и почему они являются хорошими индикаторами загрязнения воздуха?
2. Какие типы лишайников выделяют в зависимости от строения слоевища и как они различаются по устойчивости к загрязнению воздуха?
3. Опишите использованные методы оценки загрязнения воздуха с помощью индикаторных лишайников.

## Лабораторная работа № 2 Характеристика свойств почвы с помощью растений-индикаторов

**Цель работы:** характеристика кислотности почвы по составу индикаторных растений и частоте их встречаемости.

**Объект исследования:** видовой состав индикаторных растений, частота их встречаемости, индикаторная значимость.

### **Задачи, решаемые в работе:**

Знакомство с экологическими группами растений, используемых в индикаторных целях, понятие о прямых и косвенных индикаторах. Оценка кислотности почвы с помощью растений-индикаторов.

### **Теоретические сведения**

В экологии растений накоплена большая информация о связи отдельных видов с определенными условиями местообитаний. Знания о предпочтении теми или иными видами определённых условий среды позволили выделить экологические группы растений, которые можно использовать в индикационных целях. Фитоиндикаторы – это растения, их сообщества или особенности, которые указывают на определённые свойства среды. Выделяют индикаторы по отношению к влажности: ксерофиты (обитатели сухих почв) — гидрофиты (водные растения); кислотности: ацидофилы (обитатели кислых субстратов) — базифилы (щелочные почвы); солёности: галофиты (растения засоленных почв) — гликофиты (растения незасоленных почв); механическому составу почвы: пелитофиты (растения каменистых почв) — псаммофиты (растения песчаных почв) — алеврофиты (растения глинистых почв), содержанию питательных веществ: эвтрофы, предпочитающие плодородные почвы; олиготрофы, произрастающие на почвах с низким содержанием биогенных веществ. Между основными группами индикаторов существуют промежуточные, отражающие переходные уровни изменения различных свойств почвы. Некоторые растения позволяют выявить повышенное содержание металлов (медь, молибден, свинец, цинк и др.).

Индикаторы делятся на 2 вида:

- прямые (связаны с объектом индикации - определённым условием среды);
- косвенные (не имеют непосредственной связи с объектом индикации, но связаны с объектами, которые, в свою очередь, тесно связаны с объектами индикации).

Так, на урановых месторождениях часто можно встретить различные виды астрагала. Астрагал накапливает Se и тем самым служит его прямым индикатором. Однако относительно урана астрагалы – косвенные индикаторы, так как селен встречается на его месторождениях.

Индикаторы могут быть разделены по степени географической устойчивости индикационных связей:

- локальные;

- региональные;
- панареальные.

На всем ареале панареального индикатора его связь с индикатором единообразна. Например, для повышенной влажности субстрата панареальным индикатором будет тростник. Такие индикаторы немногочисленны и обычно относятся к прямым. Чаще встречаются региональные и локальные индикаторы. В основном они относятся косвенным индикаторам.

Чтобы индикатор мог рассматриваться как таковой, он должен встречаться чаще при наличии индиката, чем без него. Количественным выражением сопряженности индикатора и индиката является достоверность индикатора, которая определяется на основании анализа проб почв и состава растительности на пробных площадках, количество которых должно обеспечить статистическую достоверность полученных данных. Абсолютно достоверный индикатор – тот, которому в 100 % случаев соответствует объект индикации.

Однако практическая значимость индикатора не определяется полностью его достоверностью. *Значимость индикатора* – это частота встречаемости индикатора в пределах площади, на которой присутствует индикат.

Для оценки кислотности почвы на определённом участке территории определяют видовой состав растительности и частоту встречаемости каждого вида. Частоту встречаемости определяют по девятибалльной шестиступенчатой шкале со следующими значениями: 1 — очень редко, 2 — редко, 3 — нередко, 5 — часто, 7 — очень часто, 9 — массовое развитие.

#### ***Материал для выполнения работы***

Карточка с результатами определения видового состава растительности и частоты встречаемости каждого вида. Таблица видов – индикаторов кислотности с индикаторной значимостью.

#### ***Порядок выполнения работы***

По таблице 5 определяют величину индикаторной значимости каждого индикаторного вида.

Таблица 5 – Индикаторные растения, характеризующие кислотность почв и их индикаторная значимость

Вид	Индикаторная значимость
<b>Крайние ацидофилы (pH 3,0–4,0)</b>	
Марьянник луговой	1
Осока волосистоплодная ( <i>Carex lasiocarpa</i> )	1
Плаун булавовидный ( <i>Lycopodium clavatum</i> )	1
Росянка круглолистная ( <i>Drosera rotundifolia</i> )	1
Черника ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	1

<b>Умеренные ацидофилы (pH 4,5–6,0)</b>	
Багульник болотный ( <i>Ledum palustre</i> )	2
Вейник незамеченный ( <i>Calamagrostis neglecta</i> )	2
Грушанка малая ( <i>Pyrola minor</i> )	2
Калужница болотная ( <i>Catifa palustris</i> )	2
Лютик едкий ( <i>Ranunculus acris</i> )	2
Осока двурядная ( <i>Carex disticha</i> )	2
Осока ложносытевидная ( <i>Carex pseudocyperus</i> )	2
Подмаренник трехнадрезанный ( <i>Galium</i>	2
Седмичник европейский ( <i>Trintaüs europaea</i> )	2
<b>Слабые ацидофилы (pH 5,0–6,7)</b>	
Белокрыльник болотный ( <i>Calla palustris</i> )	3
Ветреница лютичная ( <i>Anemone ranunculoides</i> )	3
Горец змеиный ( <i>Bistorta officinalis</i> )	3
Звездчатка дубравная ( <i>Stellaria nemorum</i> )	3
Кипрей мелкоцветковый ( <i>Epilobium</i>	3
Медуница неясная ( <i>Pulmonaria obscura</i> )	3
Осока желтая ( <i>Carex flavella</i> )	3
Сабельник болотный ( <i>Comarum palustre</i> )	3
Ситник скученный ( <i>Juncus conglomerate</i> )	3
Скерда болотная ( <i>Crepis paludosa</i> )	3
<b>Ацидофилнейтральные (pH 4,5–7,0)</b>	
Вейник наземный ( <i>Calamagrostis epigeios</i> )	4
Иван-чай узколистный ( <i>Chamaenerion</i>	4
Крапива жгучая ( <i>Urtica urens</i> )	4
Ландыш майский ( <i>Convallaria majalis</i> )	4
Марь красная ( <i>Chenopodium rubrum</i> )	4
Мятлик расставленный ( <i>Poa remota</i> )	4
Овсяница луговая ( <i>Festuca pratensis</i> )	4
Хмель вьющийся ( <i>Humulus lupulus</i> )	4
Ястребинка луговая ( <i>Hieracium pratense</i> )	4
<b>Околонеutralные (pH 6,0–7,3)</b>	
Василисник малый ( <i>Thalictrum minus</i> )	5
Клевер горный ( <i>Trifolium montanum</i> )	5
Мыльнянка лекарственная ( <i>Saponaria</i>	5
Очиток едкий ( <i>Sedum acre</i> )	5
Полынь шелковистая ( <i>Artemisia sericea</i> )	5

Полынь широколистная ( <i>A. latifolia</i> )	5
Смолевка поникшая ( <i>Silène acaulis</i> )	5
Таволга обыкновенная ( <i>Filipendula vulgaris</i> )	5
Чертополох поникший ( <i>Carduus nutans</i> )	5
<b>Нейтрально-базифильные (рН 6,7–7,8)</b>	
Василек русский ( <i>Centaurea ruthenica</i> )	6
Грушанка зеленоцветковая ( <i>Pyrola chbrantha</i> )	6
Кизильник среднерусский ( <i>Cotoneaster</i> )	6
Люцерна серповидная ( <i>Medicago fakata</i> )	6
Мать-и-мачеха ( <i>Tussilago farfara</i> )	6
Молочай тонкий ( <i>Euphorbia subtilis</i> )	6
Фиалка скальная ( <i>Viola rupestris</i> )	6
Ястребинка зонтиковидная ( <i>Hieracium</i> )	6
<b>Базифильные (рН 6,7–8,5)</b>	
Астра солончаковая ( <i>Aster tripolium</i> )	7
Болотница пятицветковая ( <i>Eleocharis</i> )	7
Лапчатка белая ( <i>Potentilla alba</i> )	7
Лен многолетний ( <i>Linum perenne</i> )	7
Меч-трава обыкновенная ( <i>Cladium mariscus</i> )	7
Многоножка обыкновенная ( <i>Polypodium</i> )	7
Плевел трансильванский ( <i>Lotium transsilvanica</i> )	7
Пузырник ломкий ( <i>Cystopteris fragilis</i> )	7

Индикаторный показатель исследуемого участка определяют по формуле:

$$\sum_{i=1}^n \frac{I_i f_i}{f} \quad (2)$$

Здесь  $I$  – индикаторная значимость  $i$ -го вида,  $f_i$  – частота встречаемости  $i$ -го вида,  $f$  – сумма частот встречаемости всех индикаторных видов.

По рассчитанному значению средневзвешенной индикаторной значимости и таблице 5 даётся характеристика почвы исследованного участка. Соответственно, величины, близкие или равные 1, будут соответствовать почвам с указанным в таблице диапазоном рН 3,0–4,0 и т.д.

#### **Пример выполнения работы**

По результатам исследования видового состава растений на опытном участке составляют список обнаруженных видов с их частотой встречаемости. Виды, которые не являются индикаторами кислотности, в дальнейшем расчёте не учитываются.

### **Карточка задания к лабораторной работе № 2**

Вид растения	Частота встречаемости
Плаун булавовидный	2
Черника	2
Осока двурядная	4
Лютик едкий	3
Калужница болотная	5
Марьянник луговой	3
Горец змеиный	5
Сабельник болотный	3
Медуница неясная	2
Осока вздутая	2
Иван-чай узколистый	1
Таволга обыкновенная	2
Ситник скученный	3
Герань болотная	3
Осока жёлтая	1
Скерда болотная	3
Вахта трёхлистная	2

По формуле (5) вычисляем индикаторный показатель (ИП) исследованного участка

$$\text{ИП} = \frac{(2 \cdot 1 + 2 \cdot 1 + 4 \cdot 2 + 3 \cdot 2 + 5 \cdot 2 + 3 \cdot 1 + 5 \cdot 3 + 3 \cdot 3 + 2 \cdot 3 + 1 \cdot 4 + 2 \cdot 5 + 3 \cdot 3 + 3 \cdot 1 + 1 \cdot 3 + 3 \cdot 3)}{(1 + 2 + 4 + 3 + 5 + 3 + 5 + 3 + 2 + 1 + 2 + 3 + 3 + 1 + 3)} = 2,3$$

По таблице 5 ориентировочно оцениваем, что рН почвы находится в интервале 4,5–6,0.

#### **Вопросы к работе**

1. Назовите основные свойства почвы, которые определяют с помощью растений-индикаторов, и как называются растения – индикаторы этих свойств.
2. Чем отличаются прямые и косвенные индикаторы?
3. Как различаются индикаторы по масштабам территории, на которой они могут быть использованы?
4. Что такое достоверность индикатора?

## Лабораторная работа № 3 Оценка загрязнения водных объектов органическим веществом с использованием индикаторов сапробности

**Цель работы:** определение уровня органического загрязнения акватории с использованием организмов-индикаторов сапробности.

**Объект исследования:** видовой состав сообщества индикаторных гидробионтов, их численность и биомасса, индикаторная значимость

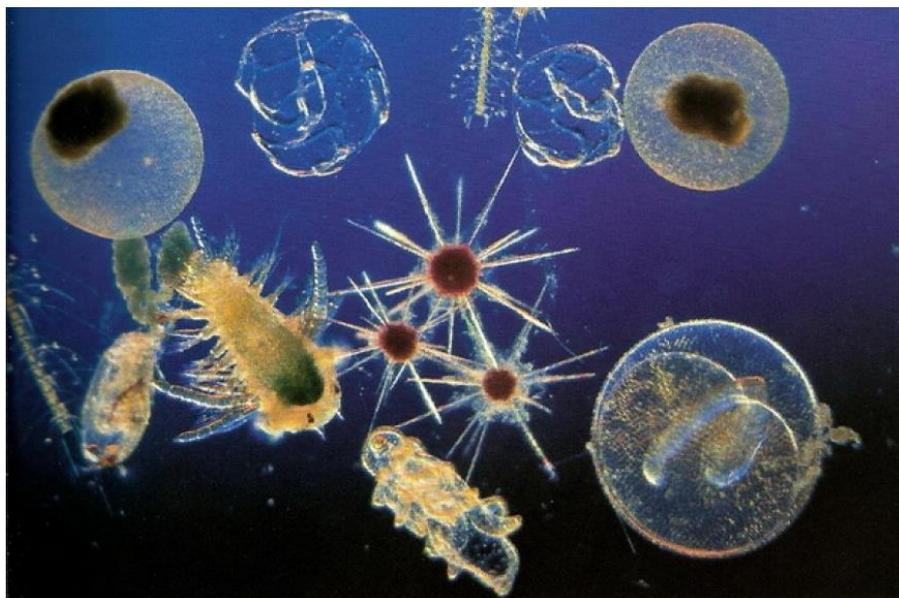
**Задачи, решаемые в работе:**

Знакомство с основными экотопическими группами гидробионтов, системой сапробности, характеристиками основных зон сапробности. Определение зоны сапробности по индикаторной значимости видов-индикаторов, их численности и биомассе.

### **Теоретические сведения**

#### Основные экотопические группы гидробионтов.

**Планктон** – совокупность организмов, населяющих водную толщу, не способных к активным передвижениям и к противостоянию течениям. В нём выделяют: фитопланктон – водоросли (диатомовые, зелёные, динофитовые и др.), зоопланктон (мелкие ракообразные, гребневики, некоторые моллюски, черви и др.), протозоопланктон (простейшие), ихтиопланктон (личинки, икра и молодь рыб), бактериопланктон (бактерии) и др. (рисунок 3).



*Рисунок 3 – Планктон*

**Нектон** – активно передвигающиеся крупные животные, способные преодолевать большие расстояния и сильные течения: рыбы, крупные головоногие моллюски, ластоногие, китообразные. В пресных водоемах к нектону относятся также земноводные и некоторые насекомые.

**Перифитон** – преимущественно прикрепленные организмы, обитающие на границе раздела вода - твердые субстраты. Обрастатели водных растений, животных, скал, погруженных в воду конструкций. В зависимости от систематической принадлежности также разделяются на фитоперифитон, зооперифитон, бактериоперифитон и др.

**Бентос** – гидробионты, обитающие на дне. Прикрепленные или медленно передвигающиеся организмы: бактериобентос, фитобентос (водоросли и высшие водные растения), зообентос (рыбы, ракообразные, губки, кишечнополостные, черви, моллюски, личинки насекомых, и др.). Фитобентос развивается только на мелководье, поскольку его присутствие ограничено проникновением света, необходимого для фотосинтеза.



*Рисунок 4 – Бентос*

**Нейстон** – гидробионы, располагающие под или над поверхностной пленкой воды (то есть либо на границе сред вода-воздух (эпинейстон), либо прикрепляющиеся к поверхностной плёнке, либо обитающие непосредственно под её поверхностью (гипонейстон). Преимущественно микроскопические организмы: водоросли, простейшие, бактерии, икра рыб и др.

**Плейстон** – гидробионты, обитающие одновременно в водной и воздушной среде (некоторые моллюски, сифонофора, саргассовые водоросли, ряска и др.

**Система сапробности** основана на различной реакции живых организмов на концентрацию органических веществ, её возникновение связано с интенсивным антропогенным их поступлением в водные объекты и необходимостью объективной оценки уровня этого вида загрязнения.

В природе концентрация органических веществ в водных объектах существенно различается вследствие различных условий их формирования, и наблюдения за их экосистемами позволили оценить потребности различных организмов в органическом питании и устойчивости к возникающим при разложении органических соединений веществам:  $H_2S$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ , органическим кислотам и др. Сапробность организма – это его способность обитать при определённом содержании органических веществ. Другой аспект понятия «сапробность» применительно к водному объекту или его отдельной акватории состоит в том, что при увеличении уровня органического загрязнения в воде и донных отложениях возрастает количество органического вещества, подвергающегося деструкции с потреблением кислорода, что приводит к уменьшению его концентрации. Повышение сапробности угнетает одни организмы (из-за недостатка кислорода), но может способствовать увеличению численности других (потребляющих большое количество органики и устойчивых к пониженным концентрациям кислорода), в результате чего происходит изменение состава водных сообществ. В целом сапробность отражает органико-кислородный баланс акватории или водного объекта в целом. Сапробность организма и гидрохимические показатели водоема не имеют строгого соответствия. Зоны сапробности классифицируются следующим образом:

- *ксеносапробная зона* – предельно чистые воды, органические вещества практически отсутствуют, минимальное количество минеральных соединений;

- *олигосапробная зона* – чистые воды, незначительная концентрация углекислоты, отсутствует сероводород, встречаются соединения азота в форме нитратов, высокая концентрация кислорода;

-  *$\beta$ -мезосапробная зона* – умеренно-загрязненные воды, в небольшом количестве встречается сероводород, достаточное количество кислорода, однако  $O_2$  может быть в дефиците в ночные часы или у дна, когда нет фотосинтеза, встречаются соединения азота в форме солей аммония, нитратов и нитритов;

-  *$\alpha$ -мезосапробная зона* – существенно загрязненные воды, есть сероводород, кислород в незначительных концентрациях, частично анаэробные условия;

- *полисапробная зона* – очень загрязненные воды, высокие концентрации сероводорода, много органических веществ, включая неразложившиеся белки, анаэробные условия преобладают.

В природе водные объекты имеют разный естественный уровень сапробности и адаптированную к нему биоту. Горные ручьи, воды тающих ледников ксеносапробны, большие озёра на севере олигосапробны, большинство равнинных рек и озер мезосапробны. Малые стоячие водоемы (пруды и болота) часто полисапробны. Отмечается, что организмы с высокими значениями сапробной валентности обычно лучше переносят химические загрязнения, а также повышенную температуру и минерализацию воды, то есть, в ряду ксеносапробы – олигосапробы – мезосапробы – полисапробы возрастает не

только устойчивость к повышенному содержанию органических веществ и дефициту кислорода, но и устойчивость к высокой концентрации токсичных веществ. Это позволяет использовать индекс сапробности для ориентировочной оценки общего уровня загрязнения водоемов, включая загрязнение стоками промышленных предприятий.

В системе Росгидромета для оценки сапробности воды применяют метод индикаторных организмов Пантле и Букка в модификации Сладечека. Он учитывает уровень количественного развития (частоту встречаемости, численность, биомассу) гидробионтов (h) и их индикаторную значимость (s, сапробную валентность). Индикаторную значимость s и зону сапробности определяют для каждого вида по спискам сапробных организмов. Они составлены для различных сообществ гидробионтов: водорослей, мхов, беспозвоночных зоопланктона и зообентоса и других групп организмов.

Индекс сапробности рассчитывается по формуле:

$$S = \frac{\sum s_i h_i}{\sum h_i} \quad (3)$$

Индекс сапробности – это среднее значение сапробности всех найденных индикаторных видов с учетом их количественного развития. Для того чтобы достоверно оценить достоверной сапробность акватории, необходимо, чтобы в пробе было обнаружено не менее 12 индикаторных организмов.

Индекс сапробности указывают с точностью до 0,01. Для ксеносапробной зоны он находится в интервале 0–0,5, олигосапробной зоны – 0,51–1,50; β-мезосапробной – 1,51–2,50; α-мезосапробной – 2,51–3,50; полисапробной – 3,51–4,00.

### ***Материал для выполнения работы***

Карточка с результатами определения видового состава макрозообентоса, численностью и биомассой каждого вида. Таблицы видов – индикаторов сапробности с указанием их сапробной валентности.

### ***Порядок выполнения работы***

По представленным материалам и таблицам сапробности выявляют виды-индикаторы сапробности, определяют их сапробную валентность (s) по спискам видов-индикаторов сапробности.

Рассчитывают значения индекса сапробности по численности и биомассе, определяют соответствующую им зону сапробности, сравнивают полученные результаты.

### ***Пример выполнения работы***

Систематические группы, виды	Численность, экз/м <sup>2</sup>	S
<b>Отряд Ephemeroptera (подёнки)</b>		
<i>Ephemera vulgata</i>	5	1,4
<b>Кл. Oligochaeta (олигохеты)</b>		
<i>Limnodrillus hoffmeisteri</i>	787	
<i>Limnodrillus udekemianus</i>	40	

<i>Tubifex newaensis</i>	102	
<i>Tubifex tubifex</i>	10	3,8
<i>Chaetogaster diaphanus</i>	15	
<i>Chaetogaster limnaei</i>	10	1,95
<b>Кл. Polychaeta (полихеты)</b>		
<i>Manayunkia aestuarina</i>	412	
<b>Класс Hirudinea (пиявки)</b>		
<i>Hemiclepsis marginata</i>	13	
<i>Piscicola geometra</i>	12	2,0
<b>Сем. Chironomidae</b>		
<i>Procladius ferrugineus</i>	13	
<i>Chironomus plumosus</i>	9	3,8
<i>Thalassomyia fraunfeldi</i>	27	
<i>Polypedilum convictum</i>	40	
<i>Eukiefferiella longicalcar</i>	13	
<i>Trissoladius potamophilus</i>	13	
<b>Отр Diptera (двукрылые)</b>		
<i>Chaoborus sp.</i>	15	2,25
<b>Семейство Ceratopogonidae</b>		
<i>Leucoruhinia caudalis</i>	13	
<i>Gomphus vulgatissimus</i>	13	
<b>Кл. Gastropoda (моллюски)</b>		
<i>Valvata ambigua</i>	67	
<i>Valvata piscinalis</i>	15	1,7
<i>Euglessa acuminata</i>	13	
<i>Viviparus viviparus</i>	6	1,8
<i>Lymnaea stagnalis</i>	14	1,85
<i>Bythinia tentaculata</i>	5	2,15
<b>Кл. Bivalvia (моллюски)</b>		
<i>Anodonta minima</i>	13	
<i>Unio pictorum</i>	12	1,75
<i>Dreissena polymorpha</i>	5	1,4
<i>Pisidium obtusale</i>	13	1,2

$$S = \frac{(5 \cdot 1,4 + 10 \cdot 3,8 + 10 \cdot 1,95 + 12 \cdot 2 + 9 \cdot 3,8 + 15 \cdot 2,25 + 15 \cdot 1,7 + 6 \cdot 1,8 + 14 \cdot 1,85 + 5 \cdot 1,4 + 13 \cdot 1,2)}{(5 + 10 + 10 + 12 + 9 + 15 + 15 + 6 + 14 + 5 + 12 + 13)} = 2,08$$

Значение индекса сапробности соответствует  $\beta$ -мезосапробной зоне – умеренно-загрязненные воды.

### **Вопросы к работе**

1. Назовите основные экотопические группы гидробионтов и их особенности.
2. На чем основана система сапробности и что отражает сапробность гидробионта и сапробность акватории или водного объекта?
3. Назовите основные зоны сапробности и их характерные признаки.

## Лабораторная работа № 4 Оценка уровня загрязнения водных объектов органическим веществом методами крупных таксонов

**Цель работы:** оценка органического загрязнения акватории водного объекта по результатам исследования сообщества организмов макрозообентоса с использованием легко идентифицируемых систематических групп.

**Объект исследования:** Состав сообщества макрозообентоса, показатели количественного развития отдельных видов.

### **Задачи, решаемые в работе:**

Знакомство с основными методами оценки уровня загрязнения водного объекта с использованием крупных таксонов. Оценка загрязнения по показателям олигохетного индекса, индекса Вудивисса.

### **Теоретические сведения**

Методы оценки, не требующие специальных знаний в области таксономии отдельных групп организмов, повсеместно применяются в системе экологического мониторинга. Как правило, они используют широко распространённые в водоёмах с разным уровнем загрязнения организмы и просты в вычислении, поэтому доступны широкому кругу исследователей.

Для оценки загрязнения водных объектов наиболее показательны бентос и перифитон, поскольку они являются прикрепленными сообществами, наиболее объективно отражающими качество среды их обитания.

**Олигохетный индекс Гуднайта-Уитлея** равен доле (%) малощетинок червей (олигохет) в численности всего макрозообентоса.

Чем сильнее загрязнен органическими веществами водоем и его дно, тем больше доля олигохет. Это связано с тем, что органические вещества – это основа питания этих червей, которые довольно хорошо адаптированы к минимальным концентрациям кислорода.

Индекс удовлетворительно работает только для проб, взятых с грунтов, в которых олигохеты могут обитать (илы и пески),

Индекс рассчитывается как отношение численности олигохет к общей численности организмов макрозообентоса в пробе:

$$D_1 = N_o / N_b \cdot 100\% \quad (4)$$

где  $N_o$  – численность олигохет;

$N_b$  – численность макрозообентоса.

Уровень загрязнения водного объекта оценивается по таблице 6.

Таблица 6 – Оценка загрязнения водного объекта по величине индекса Гуднайта-Уитлея

Значение индекса, %	Степень загрязнения воды	Класс качества
Менее 30	Отсутствие загрязнения	1–2
30–60	Незначительное	2–3
60–70	Умеренное	3–4
70–80	Значительно	4–5
Более 80	Сильное	5–6

На основе исследований макрозообентоса английской реки Трент был разработан метод оценки загрязнения с помощью **биотического индекса Вудивисса**. Данный метод может быть использован для исследования рек умеренного пояса, но не подходит для озер и прудов. Качество воды этим методом определяется по структурным характеристикам сообщества организмов.

Индекс Вудивисса оценивает всю совокупность донных беспозвоночных, населяющих водоем, а также наличие индикаторных групп. Определение величины индекса и последующая оценка загрязнения основана на том, что по мере увеличения уровня загрязнения из состава бентофауны сначала выпадают наиболее чувствительные организмы – преимущественно личинки насекомых, наиболее требовательные к содержанию растворённого кислорода (веснянки, поденки, ручейники). При сильном загрязнении в бентосе сохраняются только олигохеты и личинки хирономид, исчезающие только в случае крайне высокой его степени.

Уровни загрязнения включают 10 классов, которые определяются при помощи специальной таблицы по наличию или отсутствию отдельных видов гидробионтов (так называемых групп Вудивисса) с учетом общего количества таких групп на изучаемом участке.

К индикаторам относятся: трубочники, личинки поденок, веснянок, ручейников, личинки хирономид, равноногие раки (в частности, водяные ослики), рачки бокоплав.

Группы составляют следующие организмы:

- Каждый вид плоских червей;
- Класс олигохет (кроме рода *Nais*);
- род *Nais*;
- Каждый вид моллюсков, пиявок, ракообразных;
- Каждый вид веснянок, подёнок (кроме *Baetis rodani*), жуков и их личинок, клопов, личинок двукрылок (кроме хирономид и мошек), вислоккрылок;

- Личинка поденки вида *Baetis rhodani*
- Каждое семейство ручейников;
- Семейства мошек, хирономид (кроме *Chironomus plumosus*);
- *Chironomus plumosus*.

Таблица 7 – Определительная таблица расчета индекса Вудивисса

Индикаторные группы	Количество видов-индикаторов	Общее количество групп					
		0-1	2-5	6-10	11-15	16-20	>20
Рескоптера Личинки веснянок	> 1 Вида 1 Вид	- -	7 6	8 7	9 8	10 9	11 10
Ефемероптера Личинки поденок	> 1 Вида 1 Вид	- -	6 5	7 6	8 7	9 8	10 9
Трихоптера Личинки ручейников	> 1 Вида 1 Вид	- 4	5 4	6 5	7 6	8 7	9 8
<i>Gammarus</i> Бокоплавы		3	4	5	6	7	8
Водяной ослик ( <i>Asellus aquaticus</i> )		2	3	4	5	6	7
Олигохеты и (или) личинки комаров-звонцов (Chironomidae)		1	2	3	4	5	6
Все данные группы отсутствуют		0	1	2	-	-	-

Чтобы оценить состояние реки по методу Вудивисса, нужно:

1. Оценить общее разнообразие донных беспозвоночных.
2. Определить, какие индикаторные (показательные) организмы имеются в составе макрозообентоса.
3. Рассчитать количество «групп» бентосных организмов в пробе.
4. Найти значение индекса Вудивисса по таблице 7 на пересечении столбца, включающего подсчитанное количество групп, и строки, содержащей первую из отмеченных в пробе индикаторных групп, начиная сверху.

Степень загрязнения водоема в соответствии с ГОСТ 17.1.3.07-82 Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков определяют по следующей классификации:

Оценка качества воды по величине индекса Вудивисса:

- 0–1 – очень грязная;
- 2–3 – грязная;
- 4 – загрязненная;
- 5–6 – умеренно загрязненная;
- 7–9 – чистая;
- 10 – очень чистая.

### **Материал для выполнения работы**

Карточка с результатами определения видового состава макрозообентоса реки и численности каждого вида.

### **Порядок выполнения работы**

1. Определяют численность входящих в обследованное сообщество олигохет и общую численность макрозообентоса, вычисляют индекс Гуднайта-Уитлея, оценивают загрязнение обследованной акватории по таблице 6.
2. На основании видового состава макрозообентоса подсчитывают число групп для таблицы 7 и определяют биотический индекс Вудивисса, а по его величине - качество воды.
3. Сравнивают оценки загрязнения, полученные различными методами.

### **Пример выполнения работы**

Для выполнения работы предлагаются результаты исследований макрозообентоса реки.

### **Карточка для выполнения задания к лабораторной работе №4**

Организмы макрозообентоса	Численность, экз/м <sup>2</sup>
<b>Кл. Oligochaeta (олигохеты)</b>	
<i>Limnodrillus hoffmeisteri</i>	40
<i>Limnodrillus udekemianus</i>	32
<i>Tubifex newaensis</i>	98
<i>Tubifex tubifex</i>	12
<b>Сем. Chironomidae (хируномиды)</b>	
<i>Cryptochironomus vulneratus</i>	13
<i>Microchironomus tener</i>	27
<i>Cladotanytarsus mancus</i>	13
<i>Microtendipes chloris</i>	440
<i>Procladius ferrugineus</i>	120
<i>Glyptotendipes glaucus</i>	200
<i>Eukiefferiella tshernovskii</i>	640
<b>Отр. Trichoptera (ручейники)</b>	
<i>Ecnomus tenellus</i>	480
<b>Отр. Ephemeroptera (подёнки)</b>	
<i>Caenis macrura</i>	13

<b>Кл. Gastropoda (моллюски)</b>	
<i>Viviparus viviparus</i>	40
<i>Acroloxus lacustris</i>	40
<i>Bithynia tentaculata</i>	40
<b>Кл. Bivalvia (моллюски)</b>	
<i>Dreissena polymorpha</i>	360
<i>Euglessa acuminata</i>	40

1 Расчёт индекса Гуднайта-Уитлея и оценка качества воды

По формуле (4) вычисляем значение индекса

$$D = 182 / 2648 \cdot 100\% = 6,8$$

По таблице 6 определяем класс качества воды – 1–2, отсутствие загрязнения.

2 Расчёт индекса Вудивисса и оценка качества воды

Рассчитываем количество групп: класс олигохет – 1, каждый вид моллюсков, пиявок, ракообразных – 5, каждый вид веснянок, подёнок... – 1, каждое семейство ручейников – 1, семейства мошек, хириноид – 1. Всего 9 групп. Далее в таблице 7 в первом столбце находим строку «личинки подёнок, 1 вид», на пересечении со столбцом «общее количество групп 6–10» получаем величину индекса = 6. Оценка качества воды – «умеренно загрязнённая».

Оценка качества воды реки по макрозообентосу по 2-м методам оценки различается незначительно.

### ***Вопросы к работе***

1. В чем преимущества и недостатки методов крупных таксонов?
2. На каких особенностях биологии олигохет основан расчёт индекса Гуднайта-Уитлея?
3. Какие параметры необходимо рассчитать для определения биотического индекса Вудивисса и по какому принципу производится его определение?
4. Чем можно объяснить различия в оценке загрязнения водного объекта органическим веществом различными методами?

## Лабораторная работа № 5 Определение острой токсичности воды и донных отложений по результатам биотестирования

**Цель работы:** определить токсичность воды и донных отложений методом биотестирования по результатам острого опыта.

**Объект исследования:** пробы воды и водные вытяжки донных отложений, ракообразное *Daphnia magna*.

### **Задачи, решаемые в работе:**

Знакомство с теоретическими основами метода биотестирования и основными тест-объектами и тест-функциями, а также процедурой биотестирования и критериями оценки результатов. Оценка токсичности воды и донных отложений по результатам острого опыта.

### **Теоретические сведения**

Традиционные методы химического и физико-химического анализа не позволяют полноценно оценить качество воды как среды обитания живых организмов, в связи с чем особую значимость приобретают методы, позволяющие прогнозировать последствия загрязнения водной среды по показателям жизнедеятельности гидробионтов, в частности, биотестирование.

Биотестирование – обязательный элемент контроля качества поверхностных вод. Результаты биотестирования включены в перечень характеристик, используемых для выявления зон чрезвычайной экологической ситуации и зон экологического бедствия, они являются обязательной составной частью экологического мониторинга. На основании результатов биотестирования определяются ПДК (предельно допустимые концентрации) веществ или препаратов.

В основе биотестирования лежит регистрация изменений биологически значимых показателей (тест-функций) исследуемых организмов (тест-объектов) с последующей оценкой их состояния в соответствии с выбранным критерием токсичности.

Токсичность – свойство химических веществ или их комплекса проявлять повреждающее или летальное действие на живые организмы.

Токсикант – это вещество, оказывающее токсическое действие.

Токсикация – это процесс воздействия токсиканта на организм.

Токсификация – это процесс воздействия токсиканта на экосистему.

Токсичность водной среды - токсичность воды и донных отложений для гидробионтов, возникающая вследствие появления в ней токсических веществ природного или антропогенного происхождения (ксенобиотиков), загрязнения сточными водами, атмосферными осадками и пр. При возникновении токсичности водной среды она из среды, поддерживающей жизнь, становится средой, губительной для жизни.

Организмы, используемые при биотестировании, культивируются в стандартных условиях. В процессе биотестирования тест-объекты подвергаются воздействию токсичных элементов в тестируемой среде. Таким образом, изменяя

условия среды и внутреннее состояние организмов, мы можем наблюдать реакции гидробионтов на это. Любой показатель такой реакции можно считать тест-функцией. Проявляющееся воздействие регистрируется и оценивается в результате опыта.

Тест-функции делятся на 2 типа:

- биологические (выживаемость, плодовитость, качество потомства);
- физиологические (дыхание, показатели состава крови, метаболическая деятельность, активность питания).

В качестве тест-объектов используются организмы различных систематических групп: водоросли, простейшие, ракообразные, моллюски и др.

Оптимальные из них должны соответствовать определённым требованиям.

Организмы (особи) должны быть генетически однородными, чтобы все их ответные реакции на воздействие токсикантов были схожими. Это необходимо для обеспечения воспроизводимости результатов тестирования на высоком уровне.

Сезонная цикличность должна оказывать минимальное воздействие на функциональную активность тест-организма.

Тест-организмы должны иметь высокий уровень метаболической активности, что обеспечить оперативность возникновения тест-реакций, а также стрессоустойчивы для минимизации воздействия на результаты биотестирования условий проведения опыта.

При любой процедуре биотестирования наряду с опытами с тестируемой средой в аналогичных условиях наблюдают тест-организмы, не подверженные влиянию тестируемого фактора (контроль), и полученные результаты оценивают в сравнении с результатами контроля.

Выбор тест-функций определяется особенностью используемых тест-объектов, тестируемой среды, а также временем, за которое необходимо получить результат биотестирования. Для оперативного получения данных используют экспресс-методы биотестирования, регистрирующие преимущественно поведенческие и физиологические тест-функции. Кратковременные (острые опыты), в основном, оценивают гибель подопытных организмов. В тех случаях, когда в качестве тест-объектов используются микроорганизмы (водоросли, простейшие) и результаты опытов позволяют оценивать только кратность прироста численности культуры, определяют ингибирование прироста тестируемой средой.

Отбор проб для биотестирования должен быть осуществлен таким способом, включая транспортировку, хранение и подготовку, который позволит сохранить состав пробы неизменным до момента проведения анализа. Пробы воды из природных водных объектов отбирают на определённых станциях и глубинах, выбор которых определяется целями проведения биотестирования. Пробы донных отложений после отбора высушивают и делают водную вытяжку, при биотестировании в обоих случаях используют планктонные организмы.

**Тест-объекты, используемые для биотестирования в материалах, представленных в лабораторных работах**

*Scenedesmus quadricauda* относится к классу Chlorophyceae (зелёные водоросли). Вид встречается в разнообразных биотопах, в основном, в планктоне пресных водоемов.

Водоросль образует ценобии 2-, 4-, реже 8-, 16-клеточные, в виде плоских пластинок (рисунок 5).

Размеры клеток 8–25 на 3,5–6 мкм.

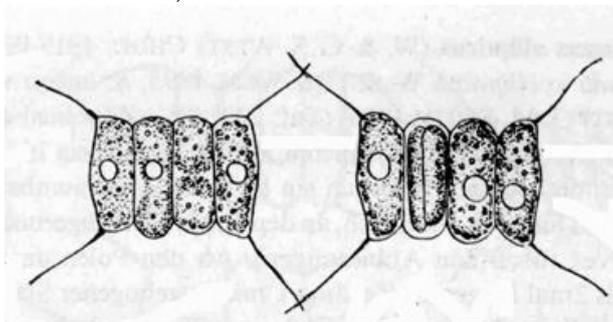


Рисунок 5 – Зелёная водоросль *Scenedesmus quadricauda*

Клетки - удлинённо-овальные, с закругленными концами, краевые клетки имеют два шипа.

Биотестирование проводится в климатостате при 24-часовом освещении лампами дневного света.

Для биотестирования используется альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda*, находящаяся в экспоненциальной стадии роста.

В колбы объемом 250 см<sup>3</sup> в двукратной повторности добавляют по 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды (контроль), а также тестируемой воды, водной вытяжки донных отложений, отхода или раствор тестируемого вещества. Затем в каждую колбу пипеткой добавляют концентрированные растворы солей, необходимых для развития водорослей, а также равные объёмы суспензии водорослей. После добавления водорослей и перемешивания производят подсчет клеток водорослей во всех контрольных и испытуемых пробах.

При определении острого токсического воздействия на водоросли устанавливают:

1) токсичность или ингибирующее действие тестируемой среды, в случае вытяжки из отходов или сточных вод – в различных кратностях разбавления. При снижении численности клеток водорослей на  $\geq 50$  % по сравнению с контролем за 72 часа экспозиции токсичность оценивается как острая;

2) безвредное действие тестируемой среды (кратности разбавления сточных вод или водной вытяжки отхода), которое ведет к уменьшению количества клеток водорослей не более чем на 20 % по сравнению с контролем за 72 часа.

Численность водорослей в контроле должна возрасти в 10 или более раз за 72 часа, при меньшей кратности увеличения результаты опытов не

учитываются. При биотестировании на водорослях тестируемая среда может оказать стимулирующее воздействие на водоросли и их численность по результатам опыта может превышать численность в контроле, такая среда также считается безвредной. При превышении прироста клеток в опыте более чем на 20% по сравнению с контролем говорят об эвтрофирующем воздействии тестируемой среды.

*Daphnia magna* – широко распространённое планктонное ракообразное (1,5–5 мм), обитающее в планктоне стоячих и слабопроточных пресноводных водоемов.

Питается микроорганизмами, находящимися в воде (бактерии, водоросли, простейшие и др.), по типу питания – фильтратор. Под панцирем дафний довольно просто можно разглядеть кишечник, сердце и выводковую камеру, которая находится в спинной части туловища. В последней протекает эмбриональное развитие дафний. Размножаются дафнии партеногенетически, то есть рождаются только самки. В природных условиях это происходит летом, а при оптимальных условиях в лаборатории это может происходить непрерывно.

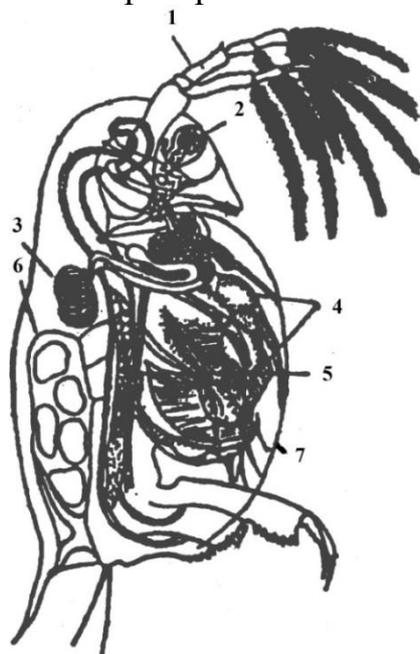


Рисунок 6 – Самка *Daphnia magna*

1 – антенна; 2 – глаз; 3 – сердце; 4 – грудные ножки; 5 – матка; 6 – выводковая камера; 7 – створки панциря

Культуру дафний выращивают в климатостате при заданных условиях, кормление производят специально выращиваемыми для этой цели культурами водорослей и дрожжей, биотестирование проводят только на синхронизированной культуре дафний (одновозрастная культура, полученная от одной самки путем партеногенеза в третьем поколении).

Биотестирование проводят в химических стаканах вместимостью 150–200 см<sup>3</sup>, которые заполняют 100 см<sup>3</sup> исследуемой среды, в них помещают по десять дафний не старше 24 ч. Каждая серия тестируется в 3-х повторностях. Учет

смертности дафний в опыте и контроле проводят через каждый час до конца первого дня опыта, а затем 2 раза в сутки до 96 часов. В каждом стакане проводят измерения рН, температуры, содержания растворенного кислорода в начале и конце опыта.

Острые опыты (кратковременное биотестирование) позволяют оценить токсичность представленной пробы через 96 часов, по выживаемости (гибели) тест-организмов. Показатель гибели – среднее количество дафний, погибших в тестируемой пробе за определенное время. Критерием острой токсичности является гибель  $\geq 50\%$  дафний за период времени до 96 часов в тестируемой пробе по сравнению с контролем при условии, что в контрольном опыте гибель дафний не превышает 10%.

Безвредной (не вызывающей эффекта острой токсичности) считается тестируемая среда, вызывающую гибель не более 10 % тест-организмов по сравнению с контролем.

При установленной гибели тест-объектов между 10 % и 50 % делается вывод об отсутствии острой токсичности в исследуемой пробе, при этом указывается, что эти пробы нельзя признать безвредными по показателю токсичности и, если это предусмотрено задачами исследования, должна быть произведена дальнейшая оценка токсичности по результатам длительного воздействия тестируемой пробы в хронических экспериментах по двум тест-функциям – выживаемости и плодовитости.

*Poecilia reticulata* (гуппи) – один из распространенных видов аквариумных рыб. В природе они обитают в тропических водоемах, где питаются, в частности, личинками mosкитов и комаров.

Гуппи - живородящие рыбы с ярко выраженным половым диморфизмом. Самцы длиной 3–4 см, самки – до 6 см.

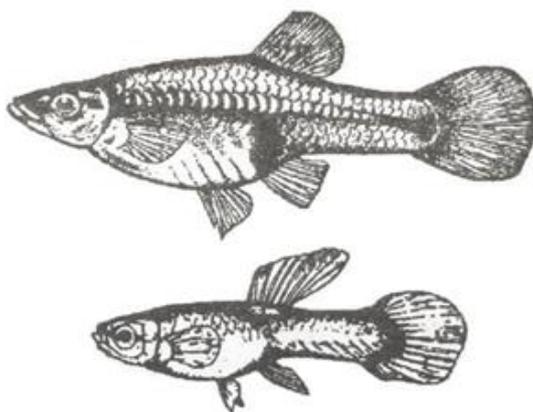


Рисунок 7 – *Poecilia reticulata* (гуппи) – самка и самец

Гуппи содержат в аквариумах, кормят сухим (дафнии, гаммарусы) или живым (хирономиды, олигохеты, дафнии) кормами. Для получения молоди отбирают половозрелых рыб в возрасте 1–2 лет. Мальки рождаются

сформированными. Кормом для них является «пыль», состоящая из инфузорий, коловраток и других мелких беспозвоночных.

Для биотестирования используют мальков возрастом 1–2 суток. В аквариумы объёмом до 200 дм<sup>3</sup> помещают по 10 мальков, каждая серия опытов и контроль тестируется в 3-х повторностях.

Время биотестирования на мальках гуппи в остром опыте – 96 часов, критерий острой токсичности – гибель  $\geq 50\%$  мальков от контроля.

Все результаты опытов по биотестированию проходят контроль приемлемости результатов измерений. Во избежание излишних расчётов в данных лабораторных работах эти вычисления не приводятся.

### **Материал для выполнения работы**

Результаты биотестирования воды и водной вытяжки донных отложений в остром опыте (96 часов) на ракообразном *Daphnia magna* по показателям тест-функции «смертность».

### **Порядок выполнения работы**

Необходимо определить смертность *Daphnia magna* при воздействии токсических веществ, которые присутствуют в исследуемой водной среде. Сравнение проводят с контрольной культурой, находящейся в пробах, где отсутствуют токсические вещества. Далее необходимо сделать заключение об острой токсичности (или её отсутствии), либо о безвредности тестируемой среды, в зависимости от полученных результатов.

Определяют среднее количество погибших экземпляров по результатам опыта в трёх повторностях. Рассчитывают долю погибших экземпляров дафний в опытных образцах относительно контроля и дают оценку токсичности исследованных проб воды и донных отложений (остро токсична, безвредна, острая токсичность отсутствует).

### **Пример выполнения работы**

Для выполнения оценки острой токсичности предлагаются результаты биотестирования воды и донных отложений озера в 96- часовом опыте.

#### **Карточка для выполнения задания к лабораторной работе №5**

Результаты определения острой токсичности (96 часов) проб воды и донных отложений (ДО) озера

1		2			3	4
Номер станции Место отбора проб		Повторности			Доля погибших особей от контроля (%)	Заключение о степени токсичности пробы
		1	2	3		
№ 42	Вода	10	10	8	3,45	Безвредна
	ДО	9	9	9	6,90	Безвредна

№15	Вода	9	8	8	13,79	Острая токсичность отсутствует.
	ДО	4	6	4	51,72	Острая токсичность
№ 9	Вода	10	10	9	0,00	Безвредна
	ДО	2	4	2	72,41	Острая токсичность.
Контроль	Вода	10	10	9		-
Контроль	ДО	10	9	10		-

В таблице результатов (столбцы 1 и 2) представлено количество выживших дафний в каждой повторности опыта. На исследованных станциях отбирали воду и донные отложения, биотестирование которых проводилось в отдельной серии опытов, для каждой представлены результаты тестируемых проб и контроля.

Определение токсичности для каждой пробы происходит по следующему алгоритму:

1. Определяют среднее количество выживших дафний для каждой тестируемой пробы и для контроля.
2. Определяют долю выживших дафний в % относительно контроля, вычитают это значение из 100%, получают долю погибших дафний (столбец 3).
3. По приведённым для тестирования с использованием *Daphnia magna* критериям оценивают токсичность каждой пробы воды и донных отложений (столбец 4).

### ***Вопросы к работе***

1. На регистрации каких параметров основана процедура биотестирования?
2. Какие тест-объекты и тест-функции используются в биотестировании?
3. Назовите основные требования к тест-объектам.
4. Охарактеризуйте основные тест-объекты, используемые в лабораторных работах.
5. Как рассчитываются результаты острого опыта и по каким критериям они оцениваются?

## Лабораторная работа № 6 Оценка хронической токсичности воды и донных отложений по результатам биотестирования

**Цель работы:** определить токсичность воды и донных отложений методом биотестирования по результатам хронического опыта на ракообразном *Daphnia magna*.

**Объект исследования:** пробы воды и водные вытяжки донных отложений, ракообразное *Daphnia magna*.

**Задачи, решаемые в работе:**

Оценка токсичности воды и донных отложений по результатам хронического опыта по двум тест-функциям – смертности и плодовитости.

### **Теоретические сведения**

Хроническое биотестирование проводят в продолжение острого опыта с пробами, для которых не установлена острая токсичность. Особенно важны его результаты для проб, которые не признаны безвредными (гибель тест-объектов – 10–50%), так как в хронических экспериментах токсичность может быть выявлена с большей долей вероятности.

Длительные (хронические) опыты позволяют получить наиболее объективную информацию о влиянии испытываемой среды на жизненные функции тест-организма, в них используются такие тест-функции, как плодовитость, качество потомства, мутагенное и канцерогенное воздействие биоаккумуляция и др.

Для определения хронического токсического действия продолжают острый опыт с теми средами, для которых не выявлено острой токсичности, или готовят новую серию тестируемых сред с учетом результатов острых опытов. Учет смертности и родившейся молодежи в опыте и контроле проводят один раз в сутки ежедневно до конца хронического опыта.

Хроническое токсическое действие тестируемой среды на дафний определяется по смертности и изменению их плодовитости за период до 24 суток в исследуемой среде по сравнению с контрольным экспериментом. Критерием хронической токсичности служит гибель 20 % и более тест-объектов и (или) достоверное отклонение в плодовитости выживших тест-организмов по сравнению с контрольным опытом.

Безвредной считается среда, не вызывающая хроническую токсичность за 24 суток экспозиции, если смертность дафний составит менее 20 % и в их плодовитости не будет установлено достоверного отклонения от контроля.

Для определения хронической токсичности воды, водной вытяжки рассчитывают:

- долю (%) погибших дафний в тестируемой воде для каждой опытной серии по сравнению с контролем;

- среднее количество родившейся молодежи на одну самку делением общего числа молодежи, родившейся за 24 дня, на число выживших самок для каждой тестируемой среды;

- достоверное отклонение в количестве родившейся молоди на одну самку из числа выживших по отношению к контролю.

Проводят расчеты для каждой испытываемой среды и контроля и сопоставляют полученные результаты. Определение среднего арифметического ( $\bar{x}$ ) показателя плодовитости в контрольной и тестируемой воде проводят по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (5)$$

где  $x_i$  - количество молоди в  $i$ -ом стакане;  $n$  - количество параллельных серий (стаканов);

- определение стандартного отклонения ( $\sigma$ ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}, \quad (6)$$

- определение ошибки среднего арифметического показателя плодовитости  $m$ :

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

- определение показателя достоверности  $t_d$  разности двух сравниваемых величин:

$$t_d = \frac{\bar{x}_k - \bar{x}_T}{\sqrt{m_k^2 + m_T^2}}, \quad (8)$$

где  $\bar{x}_k$  и  $\bar{x}_T$  - среднее арифметическое показателя плодовитости в контроле и тестируемой воде;  $m_k^2$  и  $m_T^2$  - квадраты ошибок среднего арифметического в контроле и тестируемой воде.

Рассчитанный показатель достоверности сравнивается с критерием Стьюдента, для определения которого принимается уровень значимости  $P = 0,05$  и определяется число степеней свободы  $f$  как:

$$f = n_k + n_T - 2, \quad (9)$$

где  $n_k$  и  $n_T$  - число наблюдений (число стаканов) в контроле и в тестируемой воде.

Критерий достоверности Стьюдента для уровня достоверности  $P = 0,95$  и степени свободы  $n_k + n_T - 2$  определяется по таблице 8.

Если рассчитанное  $t_d \geq t_{Ст}$ , то изменения в плодовитости дафний достоверны. В этом случае делают вывод, что исследуемая вода, водная вытяжка оказывает хроническое токсическое действие.

Если  $t_d \leq t_{Cr}$ , то выявленные различия в плодовитости дафний в тестируемой воде и контроле недостоверны, следовательно, исследуемая вода или водная вытяжка не оказывает хронического токсического действия.

Таблица 8 – Значения критерия Стьюдента ( $t_{Cr}$ )

$f$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$t_{Cr}$	12,7	4,3	3,18	2,78	2,57	2,45	2,36	2,31	2,26	2,23	2,20	2,18	2,16	2,14	2,13
$f$	29	30	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
$t_{Cr}$	2,05	2,04	2,12	2,11	2,10	2,09	2,09	2,08	2,07	2,07	2,06	2,06	2,06	2,05	2,05

По результатам работы делают вывод о хронической токсичности или безвредности исследуемых сред (воды или водной вытяжки из донных отложений).

### ***Материал для выполнения работы***

Результаты биотестирования воды и донных отложений в хроническом опыте на ракообразном *Daphnia magna* по показателям тест-функций «смертность» и «плодовитость».

### ***Порядок выполнения работы***

Работа заключается в определении смертности *Daphnia magna* при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль), и заключении, в зависимости от результатов, о хронической токсичности или безвредности тестируемой среды.

Определяют среднее количество погибших самок за время хронического опыта по результатам опытов в трёх повторностях. Рассчитывают долю погибших экземпляров дафний в опытных образцах относительно контроля и дают оценку токсичности исследованных проб воды и донных отложений (хронически токсична, безвредна).

По результатам расчётов среднего количества молоди на одну самку из числа выживших в хроническом опыте определяют достоверность различий от аналогичных величин, полученных для контроля по критерию Стьюдента. Свидетельством хронической токсичности является достоверное отличие критерия Стьюдента в соответствии с таблицей 8 в опытных средах от контроля.

### ***Пример выполнения работы***

Для выполнения оценки хронической токсичности предлагаются результаты биотестирования воды и донных отложений озера.

**Карточка для выполнения задания к лабораторной работе №6**  
**Результаты хронического биотестирования проб воды и донных отложений (ДО)**

Время, сут.	Номер и тип пробы	Контроль						Тестируемая проба						Достоверность отличий по плодовитости	Доля погибших самок от контроля, %
		Кол-во выживших самок, экз			Кол-во молоди в пересчете на одну самку, экз.			Кол-во выживших самок, экз			Кол-во молоди в пересчете на одну самку, экз				
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
20 сут	1 ДО	10	10	10	31,6	51,8	44,4	6	4	4	31,2	35,8	36,5	tд=2.00 различия не достоверны	47
20 сут	2 Вода	10	10	10	33,8	38,3	33,6	10	8	7	26,2	20,6	20,3	tд=7,4, различия достоверны	17
20 сут	2 ДО	10	10	10	31,6	51,8	44,4	10	10	8	26,0	34,3	35,3	tд=2,4, различия не достоверны	7

По данным карточки вычисляем долю погибших самок в опыте относительно контроля по результатам биотестирования в трех повторностях и делаем вывод о хронической токсичности пробы по выживаемости. Хроническую токсичность исследуемых сред по плодовитости определяем по формулам 5–9 и таблице 8.

По результатам оценки опыта делаем заключение, что:

- проба 1 ДО хронически токсична по выживаемости и безвредна по плодовитости;
- проба 2 Вода безвредна по выживаемости и токсична по плодовитости;
- проба 2 ДО безвредна по обеим тест-функциям.

Резльтирующий вывод: Пробы 1 ДО и 2 Вода хронически токсичны, проба 2 ДО безвредна.

### ***Вопросы к работе***

1. Опишите процедуру хронического биотестирования.
2. В чём преимущества хронического опыта по биотестированию по сравнению с острым?
3. По каким критериям оцениваются результаты хронического биотестирования?

## Лабораторная работа № 7 Определение класса опасности отходов по результатам биотестирования

**Цель работы:** определить класс опасности отхода по результатам биотестирования в остром опыте на двух тест-объектах из различных систематических групп.

**Объект исследования:** водная вытяжка из отхода в различных кратностях разведения, зелёная водоросль *Scenedesmus quadricauda*, ракообразное *Daphnia magna*.

### **Задачи, решаемые в работе:**

Оценка класса опасности отхода по результатам острых опытов с его водной вытяжкой в различной кратности разведения с тест-объектами *Scenedesmus quadricauda* и *Daphnia magna*.

### **Теоретические сведения**

Отходы производства и потребления – вещества или предметы, образованные в процессе производства, выполнения работ, оказания услуг или в процессе потребления, которые удаляются, предназначены для удаления или подлежат удалению. Для обращения с отходами – хранения, транспортировки, утилизации, захоронения, использования в другом производстве и др. – необходима оценка их опасности для человека и окружающей среды.

Отходы по степени воздействия на человека и окружающую среду распределяются на четыре класса опасности:

I класс – чрезвычайно опасные отходы, поступление которых в окружающую среду приводит к её необратимым нарушениям.

II класс – высокоопасные отходы, вызывающие значительное нарушение экосистемы (период восстановления – не менее 30 лет после полного устранения источника вредного воздействия).

III класс – умеренно опасные отходы, вызывающие нарушение экологической системы (период восстановления не менее 10 лет после снижения вредного воздействия от существующего источника)

IV класс – малоопасные отходы, вызывающие нарушение экологической системы (период самовосстановления – не менее трех лет.

V класс – условный, к нему относятся практически неопасные отходы, не вызывающие нарушение экологической системы.

В соответствии с Приказом Минприроды России № 536 критериями отнесения отходов к I–V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду являются:

- степень опасности отхода для окружающей среды, определяемая расчётным методом (определяется по сумме степеней опасности веществ, составляющих отход).

- кратность разведения водной вытяжки из отхода, при которой вредное воздействие на гидробионты отсутствует.

Определение кратности ( $K_p$ ) разведения водной вытяжки из отхода, при которой вредное воздействие на гидробионты отсутствует, основано на биотестировании водной вытяжки отходов - исследовании токсического действия на гидробионты водной вытяжки, полученной с использованием воды, свойства которой обозначены в применяемой методике биотестирования, при массовом соотношении отхода и воды 1:10.

При определении кратности разведения водной вытяжки из отхода, при которой вредное воздействие на гидробионты отсутствует, применяется не менее двух тест-объектов из разных систематических групп – например: дафнии и инфузории, цериодафнии и бактерии или водоросли и рыбы.

При использовании в качестве тест-объектов *Scenedesmus quadricauda* и *Daphnia magna* критерием отсутствия вредного воздействия является смертность *Daphnia magna* не более 10% от контроля за 96 часов и снижение прироста численности клеток *Scenedesmus quadricauda* не более, чем на 20% относительно контроля за 72 часа. Класс опасности определяется в соответствии с таблицей 9. За окончательный результат принимается класс опасности, выявленный на наиболее чувствительном тест-объекте.

Таблица 9 – Класс опасности отхода в соответствии с кратностью разведения водной вытяжки из него, при которой вредное воздействие на гидробионты отсутствует

Класс опасности отхода	Кратность разведения водной вытяжки
I	$K_p > 10000$
II	$1000 < K_p \leq 10000$
III	$100 < K_p \leq 1000$
IV	$1 < K_p \leq 100$
V	$K_p = 1$

На основании результатов работы делается вывод о классе опасности отхода.

### ***Материал для выполнения работы***

Результаты биотестирования в остром опыте водной вытяжки отхода в различной кратности разведения на *Scenedesmus quadricauda* (72ч) и *Daphnia magna* (96ч).

### ***Порядок выполнения работы***

Работа заключается в определении ингибирующего воздействия на прирост культуры *Scenedesmus quadricauda* за 72 часа и смертности *Daphnia magna* за 96 часов водной вытяжки из отхода в различной кратности разведения по сравнению с контролем и на основании полученных результатов заключения о классе опасности отхода.

### **Пример выполнения работы**

Для оценки класса опасности отхода используются два тест-объекта - зелёная водоросль *Scenedesmus quadricauda* и ракообразное *Daphnia magna*. Водная вытяжка отхода тестируется в различных кратностях разведения.

#### **Карточка для выполнения задания к лабораторной работе №7**

Результаты биотестирования водной вытяжки отхода на *Daphnia magna* в остром опыте (96 ч.)

1	2			3	4
Кратность разбавления водной вытяжки	Количество выживших дафний, повторности			Доля погибших, %	Заключение о наличии вредного воздействия
	1	2	3		
1	7	8	7	17%	Присутствует
1:10	9	10	9	7%	Отсутствует
1:100	10	9	10	3%	Отсутствует
1:1000	10	10	10	0	Отсутствует
Контроль	10	10	10	0	

Результаты биотестирования водной вытяжки отхода на зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda*.

Численность клеток в начале опыта – 28 тыс. кл/л.

Название пробы	Кратность разведения вытяжки	№ повторностей	Численность водорослей, тыс. кл/см <sup>3</sup>		Средние значения 2-х измерений, тыс.кл/л	Ср. значение по 2-м повторностям, тыс. кл/см <sup>3</sup>	Отклонение от контроля, %
Контроль		1	289	287	288	292,25	
		2	297	296	296,5		
Опыт	1	1	340	354	347	337,25	+15%
		2	331	324	327,5		
	1:10	1	300	312	306	304,75	+4%
		2	309	298	303,5		
	1:100	1	312	329	320,5	315,25	+7%

		2	299	321	310		
	1:1000	1	300	297	298,5	294	0
		2	291	288	289,5		

В таблице результатов биотестирования на *Daphnia magna* по данным столбцов 1 и 2 определяем долю погибших дафний относительно контроля. В столбце 3 по результатам расчётов указываем долю погибших дафний в % и в столбце 4 делаем заключение о наличии (отсутствии) вредного воздействия. По результатам тестирования на *Daphnia magna* отход можно отнести к 4-му классу опасности.

В таблице результатов биотестирования водной вытяжки отхода на *Scenedesmus quadricauda* рассчитываем среднее значение 2-х измерений (численность клеток в каждой повторности просчитывается дважды) и определяем среднее значение по 2-м повторностям. По данным результатов контроля и опытов рассчитываем отклонение численности клеток от контроля. Неразведённая вытяжка, а также кратности разведения 1:10 и 1:100 оказывают небольшое стимулирующее действие на развитие водорослей, безвредна как неразведённая вытяжка, так и различные кратности её разведения. По результатам биотестирования на *Scenedesmus quadricauda* отход можно отнести к 5 классу.

Тестируемый отход по результатам опытов на 2-х тест-объектах можно отнести к 4-му классу опасности.

### ***Вопросы к работе***

1. Дайте характеристику отходов и объясните, с какой целью производится определение их класса опасности.
2. Как классифицируются отходы по классам опасности?
3. Как происходит процедура оценки опасности отхода по результатам биотестирования и по каким критериям оценивается их класс опасности?

## Лабораторная работа № 8 Определение LC50 и IC50 по результатам биотестирования

**Цель работы:** определить LC<sub>50</sub> и IC<sub>50</sub> по результатам биотестирования в остром опыте с различными концентрациями тестируемого вещества на трёх тест-объектах из различных систематических групп.

**Объект исследования:** растворы тестируемого вещества в различных концентрациях, зелёная водоросль *Scenedesmus quadricauda*, ракообразное *Daphnia magna*, рыба *Poecilia reticulata*.

### **Задачи, решаемые в работе:**

Определение LC<sub>50</sub><sup>96</sup> тестируемого вещества для *Daphnia magna* и *Poecilia reticulata* и IC<sub>50</sub><sup>72</sup> для *Scenedesmus quadricauda*, по результатам серии острых опытов с его различными концентрациями с использованием пробит-анализа.

### **Теоретические сведения**

Характер проявления токсического воздействия определённого вещества на живые организмы зависит от свойств вещества и физиологических особенностей организма, на который он действует, однако выраженность токсичного воздействия преимущественно определяется количеством вещества. При этом доза – это количество вещества, которое действует на объект. Если речь идет о водной среде, то используют понятие – концентрация. Зависимость «доза-эффект» отмечается на всех уровнях организации живой материи. В абсолютном большинстве случаев с увеличением дозы (концентрации) повреждающее действие вещества увеличивается.

Поскольку смерть тест-объекта после действия токсиканта – реакция, реализующаяся по принципу «все или ничего», показатель смертности считается наиболее объективным для оценки токсичности веществ, его используют для определения величины среднелетальной дозы – LD<sub>50</sub> (или концентрации – LC<sub>50</sub>), под которой понимают количество токсиканта (или его концентрацию), вызывающее гибель 50 % тест-объектов при определенной продолжительности наблюдения.

LD<sub>50</sub> (LC<sub>50</sub>) - один из наиболее широко применяемых показателей, характеризующий токсичность для живых организмов веществ, материалов, препаратов и используемый, в частности, для их паспортизации.

Ввиду того, что реакции организмов различной систематической принадлежности на воздействие одной и той же дозы (концентрации) вещества могут существенно различаться, определение LC<sub>50</sub> вещества, материала, препарата и др. производится на тест-объектах разных систематических групп, для каждого устанавливается полуметальная концентрация. Биотестирование осуществляется при различных концентрациях вещества по программе острого опыта с водорослями, ракообразными и рыбами (см. лаб. работу. №5).

Если экспериментально не удалось получить точного значения концентрации, вызывающей 50% ингибирование роста культуры водорослей за 72 часа или 50%-ную гибель дафний или мальков рыб за 96 часов, то для

получения точного значения LC50 без выполнения дополнительных экспериментов используют графический метод определения.

Чтобы получить на графике линейную зависимость, используют пробит-анализ. Результаты экспериментов по установлению острого токсического действия заносят в таблицы, где указывают концентрации, с которыми проводили опыт, а также долю погибших дафний или рыб (в случае водорослей – долю прироста от контроля) в %. Значения пробитов устанавливают по таблице 10. Определяют десятичные логарифмы концентраций вещества (материала, препарата), с которыми проводились опыты по биотестированию. По значениям пробитов и десятичных логарифмов исследованных концентраций строят график. По оси абсцисс откладывают значения логарифмов процентных концентраций исследуемого вещества (материала, препарата), по оси ординат – пробиты от доли (%) погибших дафний или рыб, или доли (%) прироста от контроля водорослей.

Таблица 10 – Значения пробитов для экспериментально устанавливаемой гибели дафний (рыб), ингибирования увеличения численности водорослей от 0 до 99 %

Гибель, %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,83	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,4	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

По значениям логарифмов концентраций (ось абсцисс) и пробитов (ось ординат) строится график. Для нахождения точных значений величин логарифмов концентраций, соответствующих 50%-ной смертности (или ингибирования роста), график строят в программе Excel (пакет Microsoft Office), указывая в опции «тип диаграммы» параметр «точечная». Уравнение прямой, описывающее взаимосвязь между этими величинами, получают выбором в параметре «диаграмма» опции «добавить линию тренда». Далее в опции «тип» указывается «линейная», а в опции «линия тренда», «параметры» выбирают «уравнение на диаграмме».

Из полученного уравнения линии тренда получают значения величин  $x = \lg C$ , соответствующие величинам  $y$  (значениям пробитов).

Пробитное значение 5,0 соответствует логарифму концентрации вещества (материала, препарата), вызывающей гибель 50% тест-объекта (дафнии, рыбы) за 96 часов экспозиции или 50% ингибирование роста культуры водорослей за 72 часа экспозиции. Соответствующая этому логарифму концентрация равняется LC50<sup>96</sup> или IC 50<sup>72</sup>.

### **Материал для выполнения работы**

Результаты биотестирования в остром опыте различных концентраций исследуемого вещества (материала, препарата) на *Daphnia magna*, *Poecillia reticulata* и *Scenedesmus quadricauda*.

### **Порядок выполнения работы**

По результатам опыта оценивается доля (%) погибших особей *Daphnia magna* и *Poecillia reticulata*, а также ингибирование относительно контроля (%) прироста численности культуры *Scenedesmus quadricauda*.

По таблице 11 устанавливается значение пробитов в соответствии с долей погибших особей при каждой концентрации вещества.

По значениям логарифмов концентраций (ось абсцисс) и пробитов (ось ординат) строится график. Пробитное значение 5,0 соответствует логарифму концентрации вещества, вызывающей гибель 50% тест-объекта (дафнии, рыбы) за 96 часов экспозиции или 50% ингибирование роста культуры водорослей за 72 часа экспозиции. Соответствующая этому логарифму концентрация равняется LC50<sup>96</sup> для дафний и рыб и IC 50<sup>72</sup> для водорослей.

### **Карточка для выполнения задания к лабораторной работе № 8**

Результаты оценки токсичности различных концентраций препарата для *Scenedesmus quadricauda* в остром опыте (72 ч).

Численность клеток в начале эксперимента – 32 тыс. кл./см<sup>3</sup>.

№ пробы	Концентрация, мг/л	№ Повторностей	Численность водорослей, тыс. кл./см <sup>3</sup>		Отклонение от контроля, %
Контроль		1	542,5	529,3	
		2	517,1	586,3	
Опыт	3	1	99,8	102,6	-80
		2	123,7	108,94	
	6	1	12,3	16,3	-97
		2	20,1	16,556	

Численность клеток в начале эксперимента – 29 тыс. кл./см<sup>3</sup>.

№ пробы	Концентрация, мг/л	№ Повторностей	Численность водорослей, тыс. кл./см <sup>3</sup>		Отклонение от контроля, %
Контроль		1	495,7	547,1	
		2	563,1	552,9	

Опыт	1,5	1	246,3	216,7	-54
		2	281,2	246,7	
	0,75	1	423,4	535,8	-12
		2	437,3	369,4	
	0,375	1	537,6	561,6	-6
		2	601,3	587,8	
	0,15	1	514,3	510,3	-1
		2	556,7	550,7	

Результаты оценки токсичности различных концентраций препарата *Daphnia magna* в остром опыте (96 ч).

Концентрация растворов, мг/л	Повторности			Гибель дафний за 96 ч. %
	1	2	3	
0,06	10	10	10	0
0,125	9	9	10	3,4
0,25	9	8	9	10,3
0,5	7	7	8	20,7
1,0	5	6	5	44,8
2,0	3	2	3	72,4
4,0	1	0	0	96,6
8,0	0	0	0	100,0
Контроль	10	10	10	

Результаты оценки токсичности различных концентраций препарата для *Poecilia reticulata* в остром опыте (96 ч).

Концентрация растворов, мг/л	Повторности			Гибель рыб за 96 ч., %
	1	2	3	
0,5	10	10	10	0

1,0	9	10	9	6,7
2,0	9	8	7	20,0
4,0	4	3	4	63,0
8,0	0	0	0	100,0
16,0	0	0	0	100,0
Контроль	10	10	10	0

Используя графический метод определения IC50 для водорослей (рисунок 8), получаем  $IC50^{72}=1,41$  мг/л.

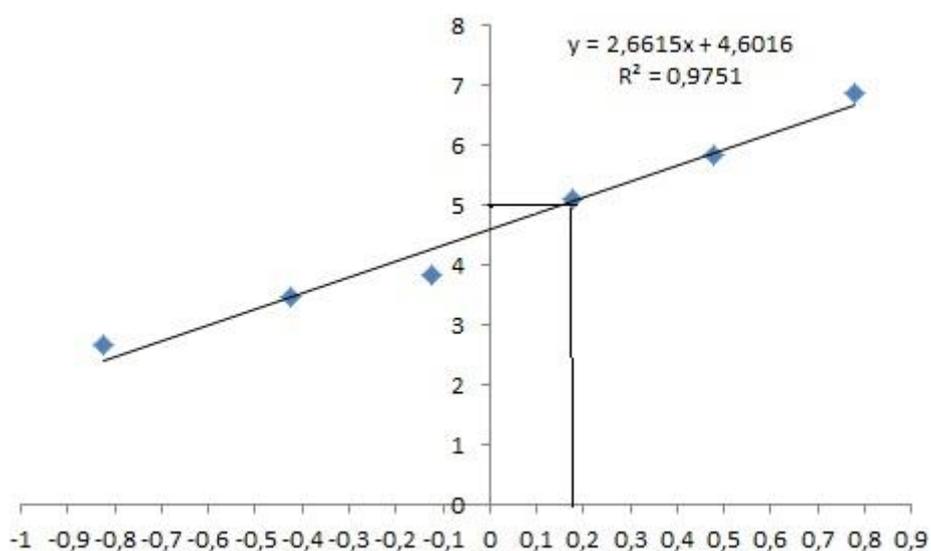


Рисунок 8 – Определение IC50 по результатам биотестирования на водоросли *Scenedesmus quadricauda* графическим методом

По результатам графического метода (рисунок 9) определения LC50<sup>96</sup> для *Daphnia magna* составила 1,06 мг/л.

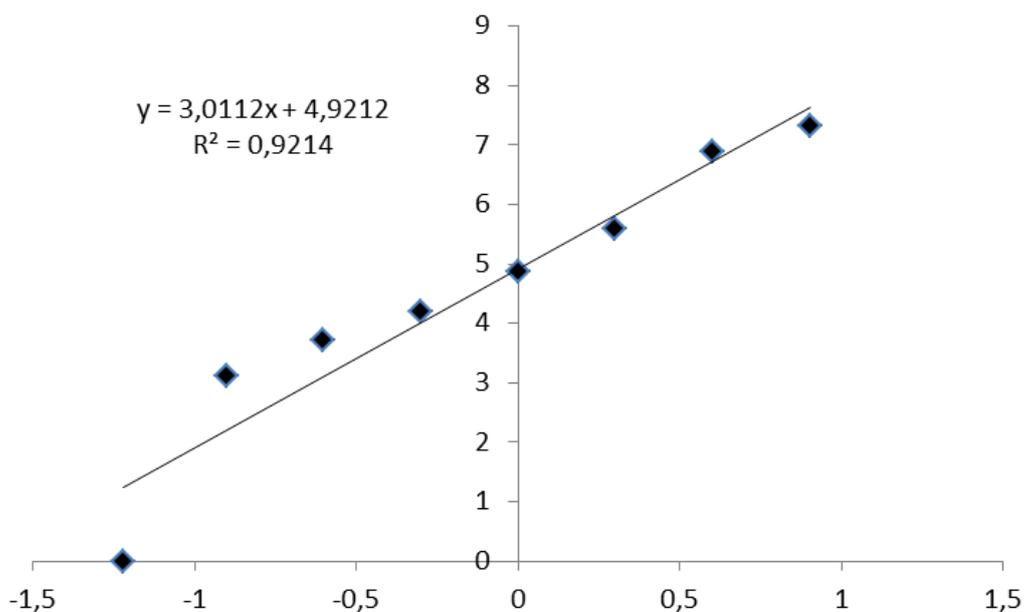


Рисунок 9 – Определение LC50<sup>96</sup> по результатам биотестирования на *Daphnia magna* в остром опыте (96 ч)

По результатам графического метода определения (рисунок 10) LC50<sup>96</sup> для *Poecilla reticulata* составила 3,42 мг/л.

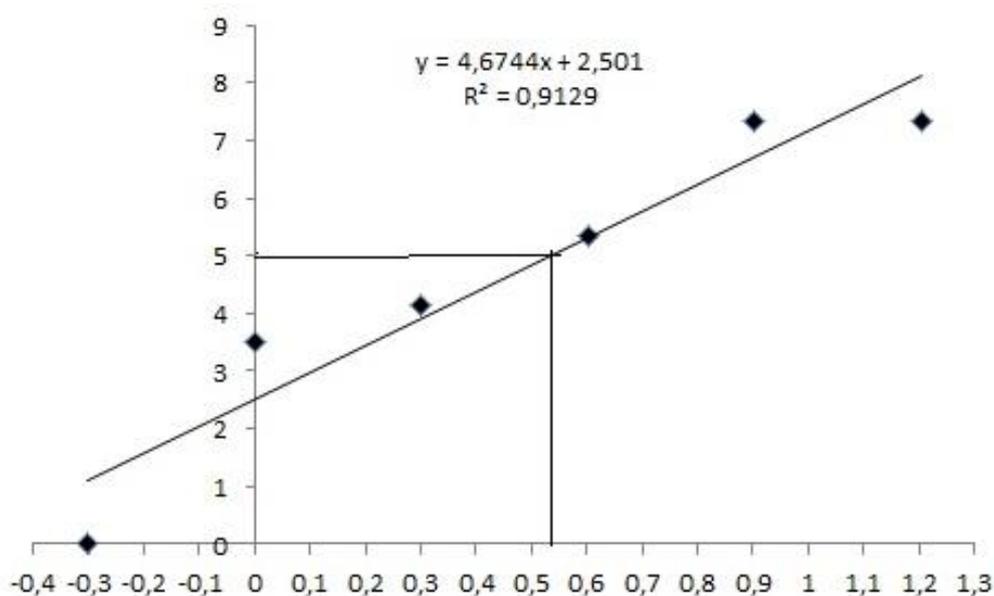


Рисунок 10 – Определение LC50<sup>96</sup> по результатам биотестирования на *Poecilla reticulata* в остром опыте (96 ч)

Таким образом, наибольшее токсичное воздействие препарат оказал на *Daphnia magna* LC50<sup>96</sup> = 1,06 мг/л. Для *Scenedesmus quadricauda* IC50<sup>72</sup>=1,41 мг/л, для *Poecilla reticulata* – 3,42 мг/л.

### ***Вопросы к работе***

1. Каким образом характеризуют токсичное воздействие вещества на живой организм, какой из показателей является наиболее применяемым и используется для паспортизации веществ (препаратов, материалов)?

2. Какие тест-объекты используются для определения среднелетальной (средней ингибирующей) концентрации и по результатам какого опыта она оценивается?

3. Как осуществляется определение среднелетальной (средней ингибирующей) концентрации графическим методом?

## Список использованной литературы

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для вузов / под ред. О.П.Мелеховой и Е.И.Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288 с.
2. Викторов С. В., Ремезова Г. Л. Индикационная геоботаника: Учеб. пособие. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. - 168 с.
3. Гальцева В.В., Дмитриев В.В. Практикум по водной экологии и мониторингу состояния водных систем. – СПб, 2007. – 364 с.
4. Дмитриев В.В., Фрумин Г.Т. Экологическое нормирование и устойчивость природных систем. – СПб.: Наука, 2004. – 294 с.
5. Левич А.П., Булгаков Н.Г. Информационно-аналитическая система «Экологический контроль природной среды по данным биологического и физико-химического мониторинга» [Электронный ресурс] // URL:<http://ecograde.bio.msu.ru/db/description/classes.html> (дата обращения: 05.11.2019).
6. Ляшенко О.А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды. Учебное пособие. СПб.: СПб ГТУРП, 2012. 67с.
7. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. ФР.1.39.2007.03222. – М.:, 2007. – 51 с.
8. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей ФР.1.39.2007.03223 - М.: 2007 – 47 с.
9. Определение класса опасности токсичных отходов производства и потребления. Санитарные правила. СП 2.1.7.1386-03
10. Основы экогеологии, биоиндикации и биотестирования / под ред. проф. В.В. Куриленко - СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004. – 448 с.
11. Приказ Минприроды России от 04.12.2014 N 536 "Об утверждении Критериев отнесения отходов к I - V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду"
12. Протасов А.А. Перифитон как экотопическая группировка гидробионтов // Journal of Siberian Federal University. Biology 1 (2010 3) P.40-56
13. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов [Электронный ресурс] // М.: РЭФИА, НИА-Природа. 2002. URL: <http://aquadgroup.ru/normdocs/6418> (дата обращения: 05.11.2019)
14. Сибатуллина А. М., Мазуркин П. М., Измерение загрязнённости речной воды (на примере малой реки Малая Кокшага) [Электронный ресурс] // изд-во: Академия Естествознания, 2009. URL: <https://www.monographies.ru/ru/book/section?id=2251> (дата обращения: 05.11.2019)

15. Трасс Х.Х. Классы полеотолерантности лишайников и экологический мониторинг // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. Л., 1985. Т.7. С.122 - 137.
16. Федеральный закон «Об отходах производства и потребления» 1998 № 89-ФЗ (с изменениями на 29 июля 2018 года)
17. Sládeček V. System of water quality from the biological point of view // Ergebnisse der Limnol. 1973. - Н. 7. - 218 S.

Ляшенко Оксана Александровна, Кустикова Марина Александровна, Конопелько  
Леонид Алексеевич, Быковская Елена Александровна, Тимофеева Ирина  
Валерьевна, Василевская Анна Васильевна, Маюрова Александра Сергеевна

## **Экология. Биологические системы в оценке состояния окружающей среды**

**Учебно-методическое пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

**Редакционно-издательский отдел  
Университета ИТМО**  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49