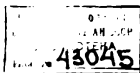


Ответственный редактор  
профессор В. И. Лукьяненко

Члены редакционной коллегии  
д. б. н. Л. П. Брагинский, к. б. н. А. Н. Крайнюкова,  
к. б. н. Л. А. Лесников, к. б. н. Г. В. Попова,  
к. б. н. Б. А. Флеров, Ю. П. Чалов



## ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ, ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

При определении задач и направлений в разработке системы биотестирования необходимо прежде всего четко ограничить круг проблем, охватываемых термином биотестирование. В широком смысле этого слова сюда можно отнести все приемы работ, когда о тех или иных параметрах и изменениях среды мы судим по наличию, состоянию или поведению животных организмов. Однако с целью конкретизации целесообразно исключить из понятия «биотестирование» те случаи, когда мы используем природные популяции и биоценозы (современные или вымершие), поскольку их использование правильнее относить к области индикаторной биологии. К последней, очевидно, наряду с использованием таких приемов, как диатомовый и пыльцевой анализ при поиске полезных ископаемых, геоботанические наблюдения при картировании типов почв, и других, следует отнести из области санитарно-технической гидробиологии применение систем сапробиости при оценке степени загрязненности водоемов разлагающимися органическими веществами и качества работы очистных сооружений. Мы считаем нецелесообразным их отнесение к проблеме биотестирования, хотя провести четкую границу между индикаторной биологией и биотестированием очень трудно.

В узком понимании задачи биотестирования — это использование организмов и их реакций, образно говоря, вместо приемов аналитической химии, т. е. когда мы оцениваем действие на тест-организмы (в нашем случае — гидросферы) образцов воды, грунта, либо помещая тест-организм непосредственно в анализируемую природную среду. Мы считаем, что обсуждать проблему целесообразно именно в этом, узком смысле слова. Выбор тест-организмов и приемов анализа при этом может быть самым широким и не должен связываться никакими условиями, кроме пользы дела. В принципе, в случае определенных удобств, тест-организмами могут быть и не гидробионты. Все работы по разработке ПДК, включающие исследования влияния конкретных загрязняющих веществ или сточных вод (т. е. смесей веществ)

на основные звенья круговорота веществ в водоемах и на качество воды в них, не следует включать в проблему «биотестирования», поскольку задачи их прямо противоположны.

Основной предмет биотестирования — оценка с помощью тест-организмов и тест-процедур качества природных и сточных вод не определенного химико-аналитическими приемами состава, либо когда часть ингредиентов определена, а часть — нет, и по анализу состава нельзя оценить токсичность данной воды или грунта водоема. Биотестационные процедуры могут быть необходимыми при установлении ПДК сточных вод, например, при оценке колебания состава и токсичности отдельных проб сточной воды.

Немного истории данного вопроса. Собственно, прием биотестирования не является новым. Безусловно, к числу приемов биотестирования следует отнести такие процедуры, как «тест на стабильность воды с метиленовым голубым», БПК, поскольку оба анализа основаны на оценке окислительной активности микроорганизмов. Анализ БПК, согласно Л. Клейну [6], был впервые описан в Англии в 1913 г. Мак-Гоуэном, Фри и Кершау в восьмом докладе «Королевской комиссии по ликвидации загрязнений». По описанию Л. Клейна, БПК может применяться не только в качестве показателя содержания окисляемых за счет биохимических процессов органических (сапробных) веществ, но также и токсических для бактерий веществ. Для этого проводится определение БПК в серии разбавлений анализируемой воды. С того разбавления, где снимается бактерицидное действие образца воды, резко возрастает значение БПК.

Все органолептические процедуры по определению привкусов и запахов воды и образцов мяса рыб и других промысловых гидробионтов, безусловно, относятся к проблеме биотестирования.

В эту же группу анализов следует отнести разработанный Кнеппом [5] AZ-тест. Метод заключается в том, что параллельно с определением БПК в несколько модифицированном виде, с внесением стандартной культуры микроорганизмов, ставится аналогичная склянка на свету с внесением культуры водорослей. О наличии токсичных компонентов в воде судят по соотношению процесса фотосинтеза (по динамике кислорода) и процесса потребления кислорода микроорганизмами. Обычно фотосинтез подавляется первым. В нашей лаборатории исследования по применению AZ-теста (Т. К. Мосисенко, Л. П. Бикунова, Л. В. Глухова), проведенные на рр. Белой, Волге, ряде рек Ленинградской, Псковской и Новгородской областей, а также на Ладожском озере и в Невской губе, показали полезность этого приема исследований. Он успешно использован нами и при анализе воды в рыбоводных садках.

С 1956 г. в нашей лаборатории регулярно используется биотестирование качества природных вод с помощью *Daphnia mag-*

на Straus. Позднее этот метод был нами описан [2]. Эти исследования оказались очень полезными, они как минимум помогают понять причины изменений в составе и количестве природного зоопланктона на анализируемом участке водоема. Однако следует учитывать, что во всех случаях, когда мы помещаем тест-организмы в пробу воды, взятую из водоема, мы определяем «мгновенный показатель», как и в случаях гидрохимических анализов, хотя само биотестирование занимает определенное время. Для анализа сточных вод, в частности Байкальского ЦБК и Селенгинского ЦКК, этот тест был успешно использован в течение многих лет сотрудниками Петрозаводского университета [1].

Система тестирования сточных вод во время экспедиции по р. Волге была успешно применена Н. С. Строгановым и его сотрудниками [4]. В качестве тест-организмов использованы *Daphnia magna*, большой прудовик (*Limnaea stagnalis*) и гуппи (*Lebistes reticulatus*) — три вида, обладающие тремя разными, возрастающими в порядке цитирования, степенями токсикорезистентности.

За рубежом биотестирование также применяется довольно давно. Л. Клейн [6] описывает принятые в лабораториях «речных коллегий» Великобритании анализы с радужной форелью (определяется время переворачивания рыбы), иногда с дафниями — для оценки опасности сточных вод и учета выполнения условий их сброса. Для оценки токсичности стоков отдельные лаборатории широко применяли этот тест уже до 1957 г., но, как отмечает Л. Клейн, единообразной методики выработано не было. В США для этой же цели была предложена [6] как допустимая для сброса сточных вод концентрация 0,1 от ЛК<sub>50</sub> за 48 или 96 ч. Есть сведения, что рыба в качестве тест-организма используется и во Франции.

Собственно, к биотестированию следует отнести «садковые пробы», когда организмы в сетчатых садках той или иной конструкции помещаются на заданных участках водоема. Этот прием используется широко во многих странах, в том числе и в СССР.

Приведенные примеры далеко не исчерпывают случаи применения биотестирования в нашей стране и за рубежом. Мы не цитируем, в частности, работы по оценке активности ферментов, либо выделяемых в воду микроорганизмами водоема, либо вносимых специально, для оценки качества воды и грунтов водоемов. Первые, безусловно, должны быть отнесены к биотестированию, вопрос о вторых требует обсуждения. Такие приемы анализа занимают явно промежуточное положение.

Применение биотестирования уместно всегда, когда мы имеем дело с неопределенным (и многокомпонентным) составом анализируемых вод (или грунтов). Это могут быть загрязняемые природные воды или чистые, сточные воды до или после их

очистки, или стоки отдельных цехов. Биотестирование может применяться как самостоятельно, так и совместно с приемами обычной аналитической химии, или предварять такие анализы, определяя их выбор. Основные преимущества всех существующих приемов биотестирования и, вероятно, всех или большинства будущих приемов — это значительная интегральность получаемых результатов. Анализы, выполняемые лабораториями Госкомгидромета, СЭС, водных инспекций, заводских лабораторий, включают определение нескольких физических показателей (температура, прозрачность и др.) и нескольких химических ингредиентов, число которых, как правило, не превышает 10—20. В то же время любая сточная вода содержит много десятков загрязняющих веществ, причем их число и соотношение во времени и по стадиям очистки меняется. Даже в пределах одного типа производства, в зависимости от выбранных технологических схем, характера используемого сырья, типа очистных сооружений, глубины очистки и многих других причин, состав сточных вод неодинаков. Обычно проверка соответствия системы водоотведения «Правилам охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами» (1975) устанавливается по содержанию некоторых веществ, выбранных частично объективно, частично субъективно, в качестве основных компонентов. Остальные компоненты обычно не учитываются или определяются по интегральным показателям типа БПК и ХПК. Биотестирование сточных вод способно обеспечить нас интегральными показателями степени опасности сточной воды, уже по сути своей обеспечивая учет действия всех компонентов, их взаимодействия между собой, включая моменты химических реакций, синергизма и антагонизма. Особенно важно применение биотестирования, когда мы имеем дело со сбросом в один или рядом расположенные коллекторы сточных вод нескольких различных по типу производств. С этих позиций биотестирование — значительное подспорье в ограничении загрязнения водоемов к существующей системе правил и ПДК. Следует отметить, что случаи, когда химико-аналитические данные и результаты биотестирования могут различаться весьма существенно, возможно, но не обязательно, будут говорить о меньшей точности биотестирования. Когда мы имеем дело с биотестированием природных вод, все сказанное выше относится и к ним. Кроме того, при правильном выборе тест-организмов мы можем обеспечить прямое определение степени евтрофии и кормности рыбохозяйственных водоемов [2].

Возможность дифференцированных ответов при применении биотестирования сточных вод разного состава, по-видимому, довольно ограничена. Мы пока получили известные дифференцированные показатели при использовании *Daphnia magna* [2]. Аналогичные попытки в исследованиях на рыбах не дали результатов. Очевидно, чем выше организация организмов, тем

лучше взаимодействие его систем и тем более единообразно он реагирует на действия факторов разного типа.

Как мы уже указывали, под биотестирование не следует вводить системы разработки ПДК загрязняющих веществ и аналогичные им по характеру процедуры длительных экспериментов. Ввиду непостоянства сточных вод мы измеряем их концентрации либо в единицах содержания какого-то компонента, принятого за основной, либо в единицах условного разбавления, при котором снимается отрицательное действие. Комплексную оценку сточных вод по методам и принципам определения ПДК (важная задача при разработке условий водоотведения) не следует путать с их биотестированием, т. е. текущим надзором за качеством этих вод.

В отличие от разработки ПДК, биотестирование совсем не обязательно должно включать все или несколько звеньев круговорота веществ. Биотестирование должно представлять собой удобный рабочий механизм для проведения массовых анализов и поэтому должно быть сводимо к минимально необходимому набору приемов, по возможности воспроизводимых в лабораториях разной степени оснащенности и квалификации специалистов. Особенно это важно, когда биотестирование будут проводить инженеры, которые не обязательно должны быть высококвалифицированными биологами.

Если при определении ПДК мы стремимся отдавать приоритет тем организмам, которые наиболее представительны для определенных звеньев круговорота веществ, то при биотестировании допустимо применение любых удобных тест-организмов. Если при разработке ПДК мы стараемся отдавать приоритет тем показателям действия изучаемого вещества на организмы, экологическая и хозяйственная значимость которых очевидна (в первую очередь это выживаемость, размножение, темп роста, качество промысловых водных организмов), то при биотестировании допустимо и целесообразно применение любых удобных показателей действия.

В. И. Лукьяненко [3] предлагает термин «чувствительность» организмов рассматривать не в противоположном токсикорезистентности смысле, как это делают почти все водные токсикологи и в нашей стране и за рубежом — ввиду того, что такой противоположный термин нужен, а как способность организма реагировать и выявлять тем свое отношение к тому или иному загрязняющему веществу. Учитывая, что гибель организмов — это довольно грубая реакция (на сравнительно высокие концентрации загрязняющих веществ), при биотестировании необходимы и удобны именно такие реакции, и организмы с повышенной чувствительностью в смысле, предложенном В. И. Лукьяненко, которые вполне могут быть высокотоксикорезистентными (по выживаемости) и быть очень удобным тест-организмом для биотестирования.

Одним из лимитирующих условий биотестирования являются сроки процедуры. Это очень сложный вопрос, в котором мы сталкиваемся с двумя противоположными моментами: поскольку, чем длительнее воздействие вещества на организм, тем более низких концентраций влияние мы выявляем, ввиду чего желательно, чтобы сроки биотестационной процедуры были достаточно велики; с другой стороны, увеличение длительности экспозиции отдалает сроки получения заключения о качестве образца воды. Кроме того, мы знаем, что после взятия пробы из природного водоема в ней начинают протекать микробиологические процессы. Вспышка размножения бактерий обычно проходит в течение первых 4 сут., после чего их численность устанавливается на новом, не свойственном для данного водоема уровне. Это снижает качество анализа при увеличении сроков опыта. Видимо, аналогичные явления будут и с большинством сточных вод.

Кроме того, в случае биотестирования сточных вод, особенно, если оценка работы смены будет ставиться в зависимость от качества цеховых стоков, рабочие будут требовать, чтобы сроки оценки и взятия проб для такой оценки не выходили за рамки времени работы смены. Поэтому только опыты по схеме «с изъятием проб из общего стока» могут быть длительнее 8 ч, но биотестирование путем помещения организмов в поток сточной воды не может превышать сроков работы смены.

Итак, возможны два приема биотестирования:

путем помещения организмов в пробу исследуемой воды (или в пробу с изучаемым грунтом);

путем пропуска исследуемой воды через садок, аквариум или иной контейнер с тест-организмами.

Оба приема могут использоваться для анализа воды из природного водоема и сточных вод. Регистрация изменений или реакций тест-организмов может быть визуальная, путем проведения химических, биохимических или физиологических анализов, или автоматизированная. Мы о последней возможности говорить не будем, хотя она является очень важной.

В случаях использования микроорганизмов и водорослей чаще всего используются приемы химического контроля за их жизнедеятельностью, например, за изменением растворенного в воде кислорода. В случаях применения более крупных тест-организмов, очевидно, большее значение будут иметь поведенческие реакции. При обнаружении тест-организмов, обеспечивающих дифференцированные реакции на разные группы загрязняющих веществ, как в случае дафний, по-видимому, мы всегда будем иметь дело с реакциями на группы веществ. В этом случае практически всегда придется использовать визуальный контроль.

Случаи, когда биотестирование будет оказываться более чувствительной реакцией, чем химические анализы (т. е. выявлять наличие отрицательного влияния при более низких концентра-

циях, чем обнаруживаются аналитически), очевидно, будут весьма частым явлением. Например, известно, что реакция кладыер (даже острая летальная) на хлорофос немного превышает возможности его химического определения. Но при химических анализах мы можем с известной точностью определить концентрацию конкретного вещества. Такого точного ответа очень трудно ожидать от биотестирования. В лучшем случае мы сможем говорить о порядке цифр. Но биотестирование может давать прямые ответы о степени опасности данной воды, о чем на основании химических анализов мы судим лишь косвенно. Важен вопрос о чувствительности систем биотестирования с биологических позиций. Ввиду ограниченности сроков проведения биотестационных процедур они относительно легко будут выявлять случаи наличия остролетальных концентраций, труднее — хронических летальных. Сублетальные концентрации если и возможно выявить, то не путем учета выживаемости тест-организмов. В принципе, если мы выявляем угнетение, замедление роста организма, его ослабление или иные изменения, это должно быть следствием тех или иных физиологических нарушений или биохимических изменений в его жизнедеятельности. Однако до настоящего времени не выявлено тех физиологических и биохимических сдвигов, при концентрациях токсических веществ, например, вызывающих лишь замедление темпов роста гидробионтов. Поиски достаточно чувствительных изменений организмов (в смысле, используемом в аналитической химии) — это задача дальнейших исследований. Причиной этого, видимо, является все еще недостаточно хорошее и полное знание процессов, протекающих в организме гидробионтов. Кроме того, обычно для получения более быстрого и четкого ответа, физиологи предпочитают использовать в опытах сравнительно высокие концентрации токсикантов. Кроме того, между периодом начала контакта организма и вещества и временем проявления реакции организма протекает время, обычно называемое «латентным периодом» отравления. Мы еще очень мало знаем, что происходит с организмом в этот период. Какие протекают процессы в латентном периоде и могут ли они быть использованы для целей биотестирования — задача для исследования.

Для оценки аналитической чувствительности разработанных приемов биотестирования целесообразно использовать два показателя. Во-первых, на избранных загрязняющих веществах, для которых имеются разработанные приемы количественного анализа, можно экспериментально установить, до каких концентраций вещество выявляется химикоаналитическим методом и путем биотестирования. Отношение пограничной концентрации при биотестировании к пограничной концентрации, обнаруживаемой химически, может служить мерой надежности разработанного приема. Во-вторых, следует учитывать отношение пограничной выявляемой концентрации вещества к его санитарно-гиги-



нической и рыбохозяйственной ПДК. Первому показателю можно дать название «коэффициент аналитической надежности», а второму — «коэффициент биологической надежности».

Какие задачи могут решать приемы биотестирования?

1. Контроль за повышением сапробности среды и общего содержания токсических веществ в воде природных водоемов. Поскольку в природных водоемах, как правило, не наблюдается высоких концентраций загрязняющих веществ, за исключением зон первичного разбавления сточных вод, для биотестирования природных вод длительность процедуры будет больше, чем для сточных вод. Здесь мы будем больше уделять внимания методам без автоматизации, особенно в случаях полевых (экспедиционных) работ.

2. Контроль (текущий) за качеством сточных вод. Здесь могут быть довольно разнообразные подходы. При помещении тест-организмов в пробы воды сроки анализа могут быть и довольно длительными (с учетом условий изменения состава пробы). При помещении тест-организмов в сточную воду в проточных условиях предпочтение, очевидно, должно отдаваться длительности анализа, не превышающей продолжительности рабочей смены, т. е. 8 ч.

3. Контроль за остаточной токсичностью очищаемой сточной воды. Для учета допустимого сброса в водоемы разведения, очевидно, необходимо проводить опыты по общей схеме разработки ПДК. Но для выбора наиболее целесообразного способа очистки достаточно использовать принципы биотестирования, с применением одного-двух тест-организмов, например дафний. Это значительно упростит и удешевит такие работы, но даст более надежные результаты, чем один-два химических анализа.

В принципе следует иметь набор тест-организмов и тест-процедур. К одним типам загрязняющих веществ более чувствительны одни виды, к другим — иные. И при составлении системы наблюдений для конкретных предприятий тогда можно будет «прописывать» свои тест-организмы и процедуры наблюдения.

Как мы уже указывали, пока наиболее развернутая система качественного биотестирования изменений водной среды, будет ли это вода из природного водоема или сточная вода, разработана с использованием *Daphnia magna*. Однако «тарирование» дафний в отношении количеств загрязняющих веществ мы пока не делали. Из недостатков дафний следует отметить, что в случае наличия маслянистых веществ на поверхности пробы воды, рачки попросту прилипают к поверхностной пленке и постепенно погибают. И действие пленки может маскировать влияние других форм загрязнения.

При исследованиях на природных водных объектах процедура тестирования с дафниями следующая. С собой мы берем маточную культуру дафний, по возможности, одновозрастных. Удобно возить их в трехлитровых баллонах с полиэтиленовыми

крышками. Пробы воды отбираются в стеклянные банки, например, емкостью 0,5 л, также закрываемые полиэтиленовыми крышками. Отбирается обычно 0,4 л. Для удаления природного зоопланктона проба фильтруется через мелкий газ, например, № 35—49. После выравнивания температуры в пробе и маточной культуре (перестают выделяться дополнительно пузырьки газов) в каждую пробу помещается равное число дафний, обычно, в зависимости от условий, 5, а лучше 10 экз. В первый час наблюдения лучше проводить непрерывно, затем можно просматривать через 2 ч после посадки, через 4 ч, 8 ч, а далее — через сутки, через 2 и 4 суток. Затем пробу можно ликвидировать, но если позволяют условия, полезно провести просмотр еще через 6 и 10 суток. Нами проводились и опыты с большей длительностью (до 22 сут.), но большой дополнительной информации мы не получали.

Непрерывные наблюдения следует проводить визуально, не вынимая дафний из пробы, но при необходимости, с контролем под биноклем, или в крайнем случае, под лупой 7х—10х. Регистрируются: поведение рачков (равномерно распределены в пробе, скучиваются у дна или поверхности, прилипают к поверхностной пленке, кувыркаются и т. п.), изменения окраски тела, тетанические сокращения мышц туловища, абортация яиц или зародышей из выводковой камеры, судорожное опорожнение кишечника и другие симптомы. Кроме того, следует отмечать появления грибковых образований на карапаксах или появление там сувоек и т. п.

Такое использование дафний позволяет учитывать действие остролетальных и частично-хронических летальных концентраций токсических веществ, а также повышение сапробности воды и ентрофикации.

Биотестирование рационально также использовать в случаях оценки влияния на водоемы опыления или опрыскивания участков земли ядохимикатами. Перед обработкой на соседних с обрабатываемым участком местах, особенно на берегах водоемов, размещаются сосуды с гидробионтами, например, с теми же дафниями. По их гибели и срокам реакции можно оценить степень воздействия обработки на природные водоемы.

Приемы биотестирования могут, видимо, использоваться и в других, не упомянутых нами случаях. Но они будут выявляться в ходе разработки биотестационных процедур. Во всяком случае, биотестирование должно стать обычным приемом и дополнять практически во всех случаях расчетные способы установления условий подотведения и как дополнение к приемам химического анализа.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьева Н. А. Эколого-токсикологический контроль качества очищенных сточных вод сульфат-целлюлозного производства. — Автореф. канд. дисс. Петрозаводск, 1980
2. Тесников Л. А. Методика оценки влияния воды из природных водоемов на *Daphnia magna* Straus. — В кн.: Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971, с. 157—166.
3. (В. И. Лукьяненко) *Lukyanenko V. I.* Age specific of sensitivity and resistance of fish to organic and inorganic poisons. — Proc. of the 111 USA—USSR Symposium on the effects of pollutants upon Aquatic Ecosystems. EPA—600/9-80-034, 1979, p. 156—170.
4. Стросанов Н. С., Путинцев А. Н., Шигин В. Н. О применении экспресс-метода оценки острой токсичности промышленных стоков в экспедиционных условиях. — Изв.: ГосНИОРХ, 1974, т. 98, с. 87—90.
5. *Тест А2* по Кнеппу для ориентировочного определения токсичности. — Унифицированные методы исследования качества воды, ч. 3 Методы биологического анализа вод. СЭВ, М., 1975, с. 89—98.
6. Klein L. Aspects of river pollution. L. 1957, 621 p.

Б. А. Флеров

## **БИОТЕСТИРОВАНИЕ: ТЕРМИНОЛОГИЯ, ЗАДАЧИ, ПЕРСПЕКТИВЫ**

Хотя биотестирование в СССР начало разрабатываться в 30-х годах, только к настоящему времени научной общественностью и ведомствами, призванными контролировать состояние водной среды, осознана необходимость его широкого осуществления. Дело в том, что для оценки качества воды в основном используются гидрохимические показатели, которые имеют существенные недостатки.

Первый и самый главный из них. Наличие токсикантов в воде само по себе еще не означает токсичность. Токсические вещества должны быть биологически доступны. Токсичность — характеристика биологическая. Бывают случаи, когда химический состав не может быть определен, а вода токсична. И наоборот, химический анализ показывает наличие токсикантов, а токсичность не проявляется (тест-объекты не гибнут). Второй недостаток: гидрохимические показатели не оценивают влияния трансформации загрязняющих веществ в водной среде, взаимодействия токсических веществ, не дают интегральную оценку вреда, вызываемого токсикантами. Биотестирование по сравнению с гидрохимическим анализом методологически более верно. Кроме того, аналитическая химия водной среды далека от совершенства и дорогостояща. Бесспорно, что биотестирование может существенно ограничить объем громоздких гидрохимических работ и занять надлежащее место в системе контроля как природных, так и сточных вод.

Что же такое биотестирование, как его можно и должно определить? У западноевропейских и американских токсикологов существуют термины «biossay» и «biotest», которые означают практически одно и то же, а именно: определение действия веществ на живые организмы в стандартных условиях. По существу такое же определение дано в докладе Временной научно-технической комиссии «О современном состоянии и перспективах развития научно-исследовательских работ по биотестированию природных и сточных вод» «Под биотестом понимается оценка (испытание) в строго определенных условиях действия веществ

ва или комплекса веществ на водные организмы путем регистрации изменений того или иного биологического (или физиолого-биохимического) показателя исследуемого объекта по сравнению с контролем». Можно дать более короткое определение. Биотестирование — определение токсичности водной среды по биологическим объектам или процессам. Как можно видеть из всех определений, под биотестированием понимается эксперимент. В этом отличие биотестирования от биоиндикации и мониторинга состояния водной среды по биологическим параметрам. Под последним понимаются полевые наблюдения, а для биомониторинга — по жестко осуществляемой программе. В обоих случаях о качестве воды судят по присутствию или отсутствию тех или иных организмов.

При помощи биотестирования решается одна из основных задач водной токсикологии — определение рыбохозяйственных ПДК. Однако процедура и результаты биотестирования отличаются от таковых при нахождении величины ПДК: первая — своей простотой и быстротой, вторая — ориентировочностью. Биотестирование — экспрессное определение с помощью биообъектов токсичности среды, выявление наличия в воде биологически вредных веществ для оценки степени их опасности для гидробионтов. Итак, главная задача, которую решает биотестирование, заключается в получении быстрого ответа, есть или нет токсичность.

Конкретные задачи, которые может решать биотестирование, подробно изложены в упомянутом докладе Временной комиссии. Они следующие. Биотестирование позволяет определить токсичность природных вод, устанавливать районы и источники загрязнения. Оно крайне нужно для выявления токсичности сточных вод, определения пределов очистки, поскольку очистка — дорогостоящий процесс. С помощью биотестирования можно определить: наиболее токсичные из стоков, что может упростить очистку; стоки на разных этапах очистки (контроль за работой очистных сооружений); сточные воды после очистки.

Особо обстоит дело с решением еще одной задачи биотестирования — составлением предварительной токсикологической оценки отдельных загрязняющих веществ. Это направление развивалось в 60—70-х годах в связи с бурным развитием водной токсикологии. В это время было предложено много тест-объектов, но усилия исследователей были направлены не на контроль за состоянием водной среды, а на обоснование ПДК, на прогноз опасности тех или иных веществ. Все это привело к тому, что до сих пор не сделано выбора гидробионтов, которые служили бы унифицированными тест-объектами для определения токсичности водной среды. Это и есть главное препятствие для широкого использования биотестирования в оценке качества воды. Опубликованные в 1976 г. унифицированные биотесты стран СЭВ, по мнению советских токсикологов, недостаточно совершенны и по-

Организмы	Стадия развития, масса, г	Темпера- тура, °С	Хлорофос	Карбофос	Трифос	Метилпа- ратин	Фентон	ЛДВФ	Карбамат (севин)	Мексикарбат (зекран)	Литературный источник
<i>Simoscephalus serrulatus</i>	1 возрастная	16, 21	0,7	3,5	0,47	0,37	0,62	0,28	7,6	13	[12]
<i>Daphnia pulex</i>	1 возрастная	16	0,18	1,8	0,6	0,14	0,80	0,07	6,4	10	[12]
<i>Aesellus brevicaudus</i>	Половозрелые	15, 21	—	3000	2130	—	1800	—	280	—	[11]
<i>Gammarus lacustris</i>	Половозрелые	21	40	1	3,5	—	8,4	0,5	22	46	[11]
<i>Gammarus fasciatus</i>	То же	15, 21	—	0,76	1,3	3,8	110	0,4	26	40	[11]
<i>Palaeomonetes Kadiakensis</i>	То же	21	—	90	1,5	—	5	—	5,6	83	[11]
<i>Pteronarcys californica</i>	Личинки 2 года	15, 16	35	10	5,4	—	4,5	0,1	4,8	10	[13]
<i>Salmo gairdneri</i>	0,5, 1, 4	12	1750	200	1430	3700	930	—	1950	1200	[6, 8]
<i>Carassius auratus</i>	0,9	18	—	10700	1830	9000	3400	—	13200	—	[6]
<i>Cyprinus carpio</i>	0,6	18	—	6590	—	7130	1160	—	5280	13400	[6, 8, 9]
<i>Pimephales promelas</i>	0,9	18	7900	8650	2350	8900	2440	11600	14600	17000	[5, 6, 10]
<i>Lepomis macrochirus</i>	1, 1,5	18	3800	103	400	4380	—	869	6760	22900	[5, 6, 10]
<i>Micropterus salmoides</i>	0,8	18	3450	285	620	5220	1540	—	6400	14700	[6, 8]

этому в нашей стране не используются как стандартные. Не проведена разбивка водных организмов, чувствительных к тем или иным группам (или классам) токсикантов, т. е. не существует еще классификации гидробионтов по их устойчивости к вредным веществам. Хотя и накоплен большой материал по сравнительной устойчивости гидробионтов к различным токсикантам, его трудно анализировать и использовать из-за различных условий проведения опытов.

Нами проведен анализ данных американских исследователей (Колумбийская национальная лаборатория по изучению рыб) по острой токсичности наиболее распространенных хлор-, фосфорорганических и карбаматных пестицидов для пресноводных животных, которая определялась в стабильных условиях проведения опытов. Все 8 фосфорорганических и карбаматных пестицидов оказались на 1—2 порядка токсичнее для водных беспозвоночных, чем для рыб. Особенно чувствительны к ним ветвистоусые (*Daphnia pulex*, *Simoccephalus serru latus*). 96 час.

LC<sub>50</sub> для них, за исключением экспозиций в карбофосе, седине и экстрене, находятся ниже 1 мг/л. Примерно одинаковую устойчивость с рыбами к ФОС и карбаматам проявляют только изоподы *Asellus brevicaudus*. Устойчивость рыб разных семейств варьирует значительно меньше, чем таковая беспозвоночных: 96 час. LC<sub>50</sub> лежат за немногим исключением выше 1 мг/л. Наиболее чувствительными оказались радужная форель, голубожерник, большеротый окунь к карбофосу и два последних вида к тиофосу (табл. 1).

Примерно одинаковой устойчивостью обладают беспозвоночные и рыбы к препаратам хлорорганических пестицидов: 96 час. LC<sub>50</sub>, за исключением эффекта на ветвистоусых и действия альдрина и дильдрина на гаммарид и линдана на рыб, преимущественно лежат в области концентраций 1—50 мкг/л. Наиболее чувствительны ко всем препаратам веснянки (*Pteronarcys californica*), затем следует из остракод *Cypridopsis vidua*, из изопод *Asellus brevicaudus*. Наибольшую токсичность почти для всех представителей водных животных проявляет эндрин. Бокоплавы (*Gammarus lacustris*, *G. fasciatus*) оказались наиболее устойчивыми к действию альдрина (их 96 час. LC<sub>50</sub> составляют соответственно около 10 и 5 мг/л) и дильдрина (LC<sub>50</sub> 0,5 мг/л), ветвистоусые — линдана (LC<sub>50</sub> 0,5 мг/л) (табл. 2).

Данные по сравнительной устойчивости пресноводных животных к токсикантам позволяют сделать правильный выбор тест-объектов. Как видно из приведенного материала, для тестирования фосфорорганических и карбаматных пестицидов наиболее пригодными являются высокочувствительные ветвистоусые. Несмотря на общее правило о значительно меньшей устойчивости беспозвоночных по сравнению с рыбами к ФОС и карбаматам, среди них встречаются мало чувствительные виды, например *Asellus brevicaudus*, которые менее подходят как тест-объекты.

Организм	Стадия развития, масса, г	Темпера- тура, °С	ЛДТ	Альбумин	Энзимы	Диазирин	Токоферол	Липиды	Липиды	Гемоглобин	Литература
<i>Simocephalus serrulatus</i>	I возрастная	15,21	2,5	23	45	240	19	520	47	12	[12]
<i>Daphnia pulex</i>	I возрастная	15,21	0,36	28	20	190	14,2	460	42	12	[12]
<i>Cypridopsis vidua</i>	Половозрелые	21	15	18	1,8	5	—	3,2	—	16	[6]
<i>Asellus brevicaudus</i>	Половозрелые	21	4	8	1,5	5	—	10	—	11	[11]
<i>Gammarus fasciatus</i>	То же	15,21	1	9800	3	460	26	88	29	11	[11]
<i>Gammarus fasciatus</i>	То же	15,21	0,8	4300	4,3	640	26	10	56	11	[11]
<i>Palaeomonetes kadiakensis</i>	То же	21	2,3	50	3,2	20	28	—	1,8	11	[11]
<i>Pteronarcys californica</i>	То же	15	7	1,3	0,25	0,5	23	—	1,1	13	[13]
<i>Pteronarcys californica</i>	Личинки 2 года	13	8,7	2,6	0,75	1,2	10,6	7	7,4	6-8	[6-8]
<i>Salmo gairdneri</i>	I	12,18	—	—	0,44	1,8	14	27	—	6	[6]
<i>Carassius auratus</i>	Мальки	12,18	—	—	0,32	—	3,7	131	—	6	[6]
<i>Cyprinus carpio</i>	Мальки	18	12,2	8,2	1,8	3,8	18	90	23	6-8	[6-8]
<i>Pimephales promelas</i>	1,2	18	8,6	6,2	0,61	3,1	2,4	87	13	6-8	[6-8]
<i>Lepomis macrochirus</i>	1,5	18,24	8,6	5	0,31	3,5	2	68	10	6-8	[6-8]
<i>Micropterus salmoides</i>	0,8	18	1,5	5	0,31	3,5	2	32	—	—	—

И. С. ОБОДОВ  
Институт биологии  
и зоологии  
Академии наук СССР  
Библиотека



Для тестирования хлорорганических пестицидов пригодны высокочувствительные веснянки, остракоды и, в противоположность к ФОС и карбаматам, изоподы; из рыб — лососевые.

Наши собственные данные по устойчивости разных семейств пиявок [1] позволили рекомендовать этих животных для целей биотестирования из-за их достаточной чувствительности к пестицидам, удобства содержания. Кроме того, поведенческие реакции пиявок при действии токсикантов различных классов оказались настолько характерными, специфическими, что их можно использовать для свидетельства присутствия в воде загрязняющих веществ того или иного класса (фосфор-, хлорорганические, фенольные соединения) [2]. Чувствительность метода биотестирования соединений с антихолинэстеразными свойствами, использующего в качестве тест-объектов медницинскую пиявку, — 0,1 мг/л. Однако мы отдаем себе отчет в том, что в развитии такой сложной задачи, как идентификация токсических веществ при помощи биообъектов, сделаны лишь первые шаги и предстоит дальнейшая работа по выявлению индикаторных организмов.

В настоящее время основной научной задачей является разработка классификации водных организмов по их устойчивости к тем или иным классам токсикантов, выбор стандартных для биотестирования тест-объектов, стандартных условий проведения испытаний. Эти вопросы должны решаться ведущими в стране токсикологами и коллективами, занимающимися изучением сравнительной устойчивости гидробионтов к загрязняющим веществам. Тем не менее в водной токсикологии имеются методики, надежно зарекомендовавшие себя, которые могут быть широко внедрены в практику биотестирования. Это, например, методики, где в качестве тест-объектов употребляются дафнии [3, 4].

Много предложено физиолого-биохимических методов определения токсичности водной среды. Их чувствительность зависит от правильно выбранной «функции — мишени» или места действия токсиканта. Поэтому разработка чувствительных экспресс-методов должна основываться на результатах выявления механизмов действия токсических веществ. Так, например, по торможению антихолинэстеразной активности мозга водных животных можно судить о неблагоприятном действии ФОС и карбаматов. Свойство ФОС ингибировать холинэстеразы пригодно для разработки методики определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в воде путем использования промышленных препаратов холинэстераз. Такая методика позволит определять существующими аналитическими методами, не отдельные химические компоненты, а быстро определять токсичность находящихся в воде антихолинэстеразных веществ. Хлорорганические пестициды действуют на нервную и нервно-мышечную систему, угнетают АТФ-азную активность нервной ткани и многие другие биохимические процессы. Электрофизио-

логические методы исследования свойств нервной системы, определения АТФ-азы мозга могут быть применены для биотестирования токсичности ХОС. Соли тяжелых металлов, аммония, а также некоторые хлор- и фосфоорганические пестициды угнетают ионный обмен у водных животных. Быстрота нарушений этого процесса в жабрах рыб и беспозвоночных позволяет использовать его для разработки экспресс-методов тестирования перечисленных веществ путем простой регистрации изменений электропроводности среды, где находятся тест-объекты.

Особо стоит вопрос об использовании поведенческих реакций водных животных для целей биотестирования. Поведение — демонстративный показатель действия сублетальных концентраций токсических веществ. Это первоначально проявляемый, чувствительный и интегральный показатель нарушений жизнедеятельности организма. Поэтому поведенческие тесты по праву все шире и шире находят применение при определении токсичности водной среды. Используются общая двигательная активность, так называемый, «кашель» рыб, локомоторные, оптомоторные фотореакции, пищевое, половое, оборонительное, стайное поведение, условнорефлекторная деятельность, выбор животными температурного преферендума, взаимоотношение между жертвой и хищником. Наиболее чувствительные из них — условные рефлексы или приобретаемые на протяжении жизни временные навыки.

Высокая чувствительность биотестов необходима при оценке качества природных вод, в которых концентрации токсикантов малы. Для тестирования природных вод необходимы не только чувствительные виды гидробионтов и чувствительные стадии онтогенеза, но и использование приемов повышения чувствительности самих тест-объектов или тест-функций. В этом отношении может помочь метод функциональных нагрузок, давно применяющийся в санитарно-гигиеническом эксперименте для выявления действия подпороговых доз различных ядовитых веществ. Это — вынужденное усиление двигательной активности (например, путем создания критической скорости водного потока, которому водные животные могут противостоять, голодание, применение многих других факторов внешней среды (температура, насыщение кислородом, кислотность, соленость и т. д.) в их экстремальных значениях.

Широкое внедрение методов биотестирования в практику оценки качества вод — настоятельная необходимость времени, поскольку никакая даже самая современная аналитическая химия не дает полной информации о токсичности среды. Успешный путь решения вопроса — дополнение гидрохимических сведений данными работ по биотестированию.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лалкина Л. Н., Флеров Б. А. Исследование острого отравления пиявок некоторыми токсическими веществами.— В кн.: Физиология и паразитология пресноводных животных. 1979, Л., с. 50—59.
2. Лалкина Л. Н., Флеров Б. А. Использование пиявок для идентификации пестицидов в воде.— Гидробиол. журн., 1980, т. 16, вып. 3, с. 113—119.
3. Лесников Л. А. Методика оценки влияния воды из природных водоемов на *Daphnia magna* Straus.— В кн.: Методики биологических исследований по водной токсикологии. 1971, М., с. 157—166.
4. Строганов Н. С. Экспресс-метод установления ПДК для рыбохозяйственных водоемов.— Гидробиол. журн., 1976, т. 12, вып. 4, с. 100—103.
5. Eaton J. G. Chronic malation toxicity of the bluegill (*Lepomis macrochirus* Raf.).— *Water Res.*, 1971, vol. 4, p. 673—684.
6. Johnson W. W., Finley M. T. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Washington, 1980. 98 p.
7. Katz M. Acute toxicity of some organic insecticides to three species of salmonids and to the threespine stickleback.— *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 1961, vol. 90, N 3, p. 264—268.
8. Macek K. J., McAllister. Insecticide susceptibility of some common fish family representatives.— *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 1970, vol. 99, N 1, p. 20—27.
9. Mount D. I., Stephen C. E. A method of establishing acceptable toxicant limits for fish-malation and butoxyethanol ester of 2,4—D.— *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 1967, vol. 96, N 2, p. 185—193.
10. Pickering Q. H., et al. The toxicity of organic phosphorus insecticides to different species of warmwater fishes.— *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 1962, vol. 91, N 2, p. 175—184.
11. Sanders H. O. Toxicity of some insecticides to four species of malacostracan crustaceans. U. S. Fish Wildl. Serv., Tech. Pap. 66, 1972, 19 p.
12. Sanders H. O., Cope O. B. Toxicities of several pesticides to two species of cladocerans.— *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 1966, vol. 95, N 2, p. 165—169.
13. Sanders H. O., Cope O. B. The relative toxicities of several pesticides to naiads of three species of stoneflies.— *Limnol. Oceanogr.*, 1968, vol. 13, N 1, p. 112—117.

Н. С. Строганов, О. Ф. Филленко, Г. Д. Лебедева,  
А. И. Путницев, Н. С. Бузинова, А. Г. Дмитриева,  
Е. Ф. Исакова, Л. В. Колосова, В. М. Король, М. С. Кривенко, О. В. Парнина

## **ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ СТОЧНЫХ ВОД И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОД ПРИРОДНЫХ ВОДОЕМОВ**

Охрана чистоты поверхностных вод земли — важнейшая задача современности, поскольку и жизнь и производство невозможны без чистой воды. Пресной воды на земном шаре, казалось бы, еще много, но крайне неравномерное распределение ее ресурсов и плохое качество не позволяют полностью удовлетворить потребности населения.

Следствием возрастающей потребности человечества в воде хорошего качества, быстрым антропогенным загрязнением (промышленным, сельскохозяйственным, транспортным), а также евтрофикацией вод и явилось решение ООН объявить 1981 год годом чистой воды. Во-первых, нарастает число токсикантов в водосмах и действие их смесей трудно предсказуемо. Во-вторых, при разработке технологии производства обычно ориентируются на возможность разбавления стоков после очистки, но такие возможности сейчас исчерпываются. В-третьих, почти повсеместное зарегулирование стока привело к значительному евтрофированию вод и снижению их способности к самоочищению. Поэтому ищут способы быстрой, простой, достоверной и надежной оценки качества воды.

В первой половине XX века гидробиологи создали систему сапробиости для оценки качества загрязненных бытовыми стоками вод, по показательным организмам и видовому разнообразию. В основу системы сапробиости положен принцип оксифильности — отношения гидробионтов к кислороду. В настоящее время открытые водоемы загрязнены, в основном (до 80%), промышленными стоками, и этот принцип оценки часто неприемлем. Поэтому следует рассматривать всю систему оценки качества воды, а не только систему сапробиости. Ряд исследователей внес дополнения и усовершенствования в систему сапробиости, и тем не менее использовать ее весьма затруднительно.

Применяемая сейчас система контроля качества пресных вод основана на гидрохимических методах и нормативах (ПДК). Повысить эффективность контроля можно за счет расширения аналитической службы, автоматизации гидрохимических опре-

делений и широкого использования биологических методов оценки. Многолетние наблюдения и исследования показывают, что оценка наличия токсических веществ в сточной или природной воде по гидрохимическим показателям мало достоверна. В условиях, когда в водосмы попадают биологически опасные вещества, необходимы наиболее достоверные методы токсикологического контроля — методы биологического тестирования.

Внедрение методов биотестирования диктуется экономическими и природоохранными причинами. Замена определения все возрастающих в числе многих гидрохимических показателей несколькими биотестами (при сохранении основных обязательных гидрохимических анализов) существенно уточнит, ускорит и удешевит контроль водной среды. Очень часто невозможно определить химический состав загрязнения, и тогда биотестирование является единственным методом оценки его опасности.

Что такое биотестирование? Как известно, слово «тест» в переводе означает опыт, исследование, испытание. Комиссия Госкомитета по биотестированию дает такое определение: «Под «биотестом» понимается оценка (испытание) в строго определенных условиях действия вещества или комплекса веществ на водные организмы путем регистрации изменений того или иного биологического (или физиолого-биохимического) показателя исследуемого объекта по сравнению с контролем». Используемые в опыте организмы называют тест-организмами, а опыт — биотестированием. Короче, биотестирование — оценка по биологическим показателям воздействия токсического фактора на организмы в экспериментальных условиях.

Цель биотестирования — выявление на гидробионтах степени и характера токсичности воды, загрязненной биологически опасными веществами и оценка возможной опасности этой воды для водных и других организмов.

Задача биотестирования — быстро сигнализировать об опасности.

Токсикологический контроль или биотестирование используют, в основном, в 2 случаях: 1) при оценке промышленных, транспортных, сельскохозяйственных и санитарно-бытовых стоков и 2) для выявления возможной токсичности природных вод вследствие попадания в них загрязнителей из осадков, стоков и почв.

Сточные воды значительно больше содержат токсических веществ, чем природные. Поэтому для биотестирования качества сбросных вод, поступающих в водоем после очистки, обычно достаточен краткосрочный лабораторный опыт в течение 5 сут. Определяются выживаемость тест-организмов, и для повышения точности определения токсичности наблюдают также за поведением гидробионтов. Определение качества воды природных во-

доемов проводят не менее 30 сут. в длительных опытах на тест-организмах.

Для оценки токсичности среды следует использовать показатели, которые лучше всего «отражают благополучие особи вида». Поэтому на первое место необходимо поставить выживаемость, размножение, плодовитость и качество потомства. Дополнительные показатели должны служить как бы пояснением главных [4].

Для решения практических задач прежде всего требуется быстрый ответ о токсичности стоков и об опасности попадания их в природный водоем.

Главное требование к биотестам — чувствительность и быстрота ответа, четкая реакция на внешние воздействия. Так как сток идет постоянно, то повышение его токсичности должно быть зарегистрировано практически моментально, потому что при запаздывающем сигнале сточные воды могут попасть в водоем.

Биотестирование промышленных стоков должно осуществляться на всех стадиях формирования стоков, затем на разных стадиях очистки, при сбросе очищенных стоков в водоем и в самом водоеме. Таким образом, биотесты должны быть дифференцированы на 3 группы: 1) тесты на острую токсичность (гибель организмов или изменения поведения наступают в течение 5 сут.); 2) на слабую токсичность (в долгосрочном опыте у гидробионтов снижаются основные биологические функции, они плохо растут, хуже размножаются, менее жизнеспособны); 3) на безвредность (отсутствие проявления токсического эффекта даже в ряду поколений).

Токсикологический контроль по биотестам должен быть тесно связан с химико-аналитическим контролем.

Большую помощь может оказать и метод постоянного проточного биотестирования стоков на рыбах или моллюсках. Перспективны как показатели (индикаторы) загрязнения и поведенческие реакции водных организмов: рыб, моллюсков, ракообразных. Для контроля за их состоянием можно использовать автоматические устройства, например, подающие сигналы о том, что рыбы переместились в верхние слои воды, или же раковины двухстворок дольше обычного находятся в закрытом состоянии вследствие начала отравления.

Учитывая особенности реакции гидробионтов, в нашей лаборатории [5] для быстрого контроля качества сточных вод, производства и эффективности их очистки используются тест-организмы, обладающие разной чувствительностью к токсикантам: дафний *Daphnia magna* Straus, прудовиков *Limnaea stagnalis* L., рыбок-гулли *Poecilia (Lebistes) reticulata* Peters. Эти организмы легко культивировать в лаборатории, они достаточно чувствительны к токсикантам. В краткосрочных опытах (от нескольких минут до 5 сут.) наблюдали за общим состоянием и «выжи-

ваемостью тест-организмов. За 1 мес. в экспедиционных условиях была определена острая токсичность 58 стоков 28 предприятий Поволжья, а кроме того, проверены стоки ряда предприятий около Астрахани и в Подмосковье. Дополнительно там же проведено и биотестирование из рек Волги и Москвы. Сточные воды по действию их на гидробионтов подразделяли на 3 группы: 1) наиболее токсичные — вызывающие гибель 50% особей всех трех видов; 2) среднетоксичные — вызывающие гибель 50% особей двух видов; 3) менее токсичные — вызывающие гибель 50% особей одного вида.

Предложенный метод быстрого токсикологического контроля качества сточных вод с одновременным использованием трех разных по систематическому положению и экологии тест-объектов (дафнии, большой прудовик, гуппи) показал, что наиболее чувствительны к действию токсиканта дафнии, а наименее — гуппи. Большой прудовик занимает промежуточное положение. Тест-организмы обладали разной чувствительностью к воде одной и той же пробы. Например, прудовик и гуппи могли жить в неразведенной воде стока, а дафнии только в разбавленной от 10 до 100 раз.

Степень очистки на разных предприятиях и очистных сооружениях различна. Данные токсикологического контроля свидетельствуют о том, что токсичность некоторых стоков после очистки сохраняется.

Смешивание очищенных стоков с неочищенными резко ухудшает качество очищенной воды. В этом случае требуется разбавление более чем в 200 раз перед сбросом стоков в открытые водоемы. Некоторые предприятия сбрасывают так называемые условно чистые воды, в которые, как полагают, токсичные вещества не могут попадать или попадают в малых количествах. Токсикологический контроль этих стоков показал, что «условно чистая вода» обладает острой токсичностью и для обезвреживания ее следует разбавлять в 10—100 раз.

Методом токсического контроля было установлено:

1. Испытуемая сточная вода за время протекания от места сброса до места взятия пробы в реке полностью не самоочищается.

2. Сточные воды неполностью перемешиваются с водой реки, а длительное время текут струями, сохраняя токсичность струй.

На примере анализа более 80 образцов сточных вод показана хорошая распознаваемость токсических свойств воды.

Токсикологический контроль сточных вод и речной воды показал, что нередко река не справляется с тем количеством загрязнителей, которые в нее вносят промышленные стоки. Процессы самоочищения в реке ослаблены. Это связано с зарегулированием рек, ликвидировавшим плесы и перекаты. Сделанные на основе данных в незарегулированных реках расчеты технологов производств на обезвреживание стоков за счет разведе-

ния их чистой водой в настоящее время неприемлемы. Из-за нарастания объемов сточных вод, сбрасываемых в водоемы, основную очистку стоков надо производить на самих предприятиях.

На земле теперь практически нет пресных водоемов, не подверженных антропогенному воздействию. Разнокачественные сточные воды и выбросы производств, транспорта и сельского хозяйства, попадая в природные водоемы, могут вызывать различные биологические нарушения. В загрязненных поверхностных водах устанавливается специфический гидрохимический и гидробиологический режим. Н. С. Строгановым [4] предложено такие акватории называть в зависимости от размеров биогидрохимическими областями или районами, а оценку загрязнителей проводить не столько по химическим и физико-химическим показателям, сколько по биологическим. Оценку качества воды водоемов следует осуществлять с помощью токсикологического контроля методами водной токсикологии. Химический анализ, дополняя биологический контроль, лишь помогает выявить причину и виновника наблюдаемой токсичности. Биологическая оценка качества природных вод выявляет районы и источники загрязнения вод токсическими или биогенными веществами, дает заключение о пригодности вод для рыбохозяйственных и сельскохозяйственных целей. Срок проведения исследований в таких случаях увеличивается до 30 сут. и более, а показателями токсичности среды являются плодовитость и качество потомства тест-объектов. Обычно тест-организмами служат представители фито- и зоопланктона, высших растений, бентоса, рыб. При выборе тест-организмов необходимо исходить из видовой токсичности возможных загрязнителей, особенностей водоема и требований водопотребителей.

Разные виды или особи обладают различной чувствительностью к одному и тому же загрязнителю. Гибель или численное сокращение особей одного вида обычно приводит к нарушению трофической цепи, к нарушению биоценоза и к значительному изменению всей экосистемы.

Для оценки качества вод природных водоемов в умеренной зоне Советского Союза нашей лабораторией отобраны, проверены и используются тест-организмы разных функциональных групп, осуществляющих круговорот биогенных веществ в водоеме.

Некоторые из этих организмов используем также для биотестирования сточных вод. Эти биотесты следующие: бактерии (сапрофиты и нитрофикаторы), осуществляющие процессы самоочищения; водоросли и высшие растения — первичные продуценты, дающие начало большинству пищевых цепей в водоеме; дафнии — наиболее широко применяемый тест в экспресс- и хронических опытах, один из основных фильтратов и седиментаторов в пресных водоемах.



На основании апробации на ряде биотестов водно-токсикологическими лабораториями СССР была рекомендована дафния, как наиболее чувствительный к ядам стандартный организм для биотестирования. По заданию ГКНТ СССР группой авторов (Строганов Н. С., Исакова Е. Ф., Колосова Л. В.) написано и сдано для внедрения «Методическое руководство по биотестированию на дафниях». Как биотест используют также в экспресс- и хронических опытах улитку — большого прудовика, рыб — речных и аквариальных. Ихтиологи в жизни рыб выделяют несколько периодов, каждый из которых отличается своими физиологическими особенностями и своей чувствительностью к загрязнению. В эти периоды рыбы могут быть различно использованы для биотестирования сточных и природных вод. В эмбриональный период развития (5—15 сут.) рыбы обладают высокой чувствительностью и как объект биотестирования весьма перспективны.

Для взрослых рыб показателями токсичности среды служат в экспресс-опыте поведение, дыхательный ритм, выживаемость, а в длительном опыте — поведение, выживаемость, количество съеденного корма, темп роста, размножение, качество потомства. Для биотестирования следует рекомендовать ранние биохимические изменения: активность щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, вес селезенки, определение содержания холестерина в крови сеголеток и взрослых рыб. Эти изменения появляются в первые 2—3 нед. опыта даже при отсутствии внешних признаков отравления в летальных и сублетальных концентрациях. Показателями загрязнения воды в хроническом опыте может служить и активность пищеварительных ферментов: амилазы, трипсина, липазы, а также нарушение соотношения пластического и энергетического обмена, выражающееся в обтождении тканей и увеличении количества минеральных веществ.

Число биотестов может быть значительно расширено за счет подбора других чувствительных и специализированных на определенное загрязнение групп гидробионтов. В частности, сейчас получают все большее распространение опыты на инфузории *Tetrahymena pyriformis*, которая является хорошим индикатором на органические загрязнения и незначительное содержание ядохимикатов (основные показатели — изменение формы тела и темпа размножения). Проведение биотестирования природных вод на предлагаемых нами тест-объектах и их показателей устанавливает наличие токсичности воды и определяет чувствительность к ней гидробионтов разных функциональных групп. Гибель или изменение численности наиболее чувствительных видов обуславливают нарушение трофических цепей, вызывают перестройку биоценозов и всей экосистемы водоема.

Возможно, прямой перенос лабораторных опытов по биотестированию токсичности среды не будет безошибочно гарантиро-

вать прогнозирование изменений водоема. Водоем — слишком сложная система, и значительной трудностью является нахождение главных, определяющих ее поведение компонентов и их взаимосвязей.

Поэтому для прогнозирования изменений в естественном водоеме целесообразно первоначально проводить биотестирование не только на организменном уровне, но и модельных экосистем. В течение трех лет мы проверяем результаты лабораторных опытов на модельных экосистемах. Опытные водоемы, конечно, упрощенная система по сравнению с природной, но надо отметить то совпадение результатов, которое мы получили в этих наблюдениях.

Десять модельных водоемов, каждый из которых наполнен 2,5 м<sup>3</sup> речной воды, были использованы таким образом: 4 — контрольных и 6 — опытных (в 3 вносили ТМОХ в концентрации 0,01 мг/л, и в 3—0,1 мг/л). Во все опытные водоемы помещали элодею, дафнии, прудовиков и молодь речных рыб.

Фитопланктон и организмы перифитона в концентрации ТМОХ 0,1 мг/л давали увеличение численности и биомассы. Из зоопланктона наиболее чувствительными были клadoцера: дафнии погибали через 9—10 сут, отсутствовали босмины и почти отсутствовали хидорусы. Из коловраток наиболее чувствительными были керателлы.

На размножение прудовиков эти концентрации токсиканта оказывали стимулирующее действие.

Рыбы по поведению и выживаемости не отличаются от контроля, а темп роста их был несколько ниже в концентрации ТМОХ 0,1 мг/л.

Модельные водоемы — упрощенная система по сравнению с естественными, но прогнозировать нарушения внутри определенных функциональных групп гидробионтов можно достаточно точно.

Методы биотестирования позволяют экспериментально установить наличие загрязнителей в воде и количественно оценить их опасность для тест-организмов. При длительном загрязнении для оценки его интенсивности обычно пользуются описательным методом установления загрязнения по индикаторным организмам и их состоянию.

Качество воды в водоеме формируется водными организмами на основе гидрохимических и гидрологических режимов. Попадающие в водоемы токсиканты изменяют ее гидрохимический состав и оказывают влияние в зависимости от концентрации на процессы формирования ее качества. Скорость разрушения токсиканта зависит от его природы, концентрации, от организмов, участвующих в этом разрушении физико-химических факторов среды.

В общем, пока нет единой системы оценок загрязнения вод по биологическим показателям. Наиболее распространены оцен-

ки качества природных вод по индикаторным организмам.

Видовой состав индикаторных или показательных организмов будет соответствовать географическому положению и типу водоема. Одни из них могут быть использованы как лабораторные тест-организмы для проведения биотестирования сточных и природных вод, вторые можно использовать для оценки качества воды только непосредственно в водоеме. Ко второй группе можно отнести такие организмы, как, например, диатомовые водоросли, которые очень сложно культивировать в лабораторных условиях и которые в чистых водоемах многочисленны и разнообразны по видовому составу, а также — такие ценные породы рыб, как судак, лосось, осетр.

Оценка благополучия экосистемы только по индикаторным организмам не всегда достаточна, часто более точную оценку чистоты вод дает видовой разнообразие гидробионтов. Чем больше хозяйственно полезных видов живет в водоеме, тем лучше в нем условия для обитания, тем чище вода.

Об обеднении фауны и флоры водоема под воздействием загрязнения приведено много материалов. Г. И. Галазий [1] пишет, что распространение очищенных сточных вод Байкальского целлюлозного завода (БЦЗ) в придонных слоях Байкала привело к перестройке донных биоценозов: из состава фауны гаммарид исчезли 10 видов, а из 3 доминирующих остался только 1 вид. На пятне с отложением из лигнина и целлюлозы на дне озера вместо байкальских эндемических видов личинок хирономид появились представители общепалеарктической фауны. Изменился состав и микроорганизмов: увеличилось число сульфатредуцирующих, тионовых, метанообразующих и гнилостных, что привело к некоторому снижению  $O_2$  в придонных слоях озера. Эти изменения происходят под влиянием промышленных стоков БЦЗ, содержание минеральных солей в которых после очистки не превышает требований, предъявляемых к качеству питьевых вод. Это говорит о высокой чувствительности и четкой реакции гидробионтов на изменение внешних условий среды на загрязнение водоема. Оценка загрязнения среды по ее гидрохимическим показателям неполноценна.

Подобный вывод следует и из наших наблюдений в водохранилищах Подмоскowsья на организмах-обрастателях [2]. В воде судоходного водохранилища содержится по сравнению с питьевым незначительное количество нефтепродуктов; которые не учитываются гидрохимическим анализом, но меняют видовой состав и биомассу обрастателей. Загрязнение водоема вызывает замену сообществ обрастателей чистых вод, на комплексы, характерные для загрязненных вод.

Все эти примеры подтверждают высокую чувствительность биологической оценки по сравнению с обычными химико-аналитическими методами.

Благополучие экосистемы водоема определяется не только

по индикаторным организмам и видовому разнообразию гидробионтов, но и по сохранению полезных для человека биологических процессов — самоочищения, фотосинтезу и воспроизводству хозяйственно полезных гидробионтов.

Перед водными токсикологами стоит неотложная задача дальнейших научных разработок по усовершенствованию методов биотестирования и подбора более чувствительных тест-объектов и повышения чувствительности биотестов, поскольку концентрации токсических веществ в природных водах могут быть очень малы, а последствия — весьма значительны и опасны.

Из анализа существующих методов оценки качества вод, токсикологический контроль, или биотестирование, является наиболее точным, быстрым и дешевым способом охраны наших вод.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Галазий Г. И. Об охране водоемов от загрязнений. — География и природные ресурсы, 1980, № 3, с. 92—104.
2. Лебедева Г. Д., Кривенко М. С., Дмитриева А. Г. Различия обрастания и эффективности необрастающих красок в водохранилищах системы Волга — Москва разных по антропогенному воздействию. — В кн.: Проблемы охраны вод Поволжья. Тезисы. Казань, 1977, с. 60.
3. Реагирование гидробионтов на оловоорганические соединения. — Под ред. Н. С. Строганова. М., 1979.
4. Строганов Н. С. Загрязнение водоемов и биологическая оценка качества вод. — Водные ресурсы, 1972, № 2, с. 34—52.
5. Строганов Н. С., Путинцев А. И., Исакова Е. Ф., Шигин В. И. Метод токсикологического контроля сточных вод. — Биол. науки, 1979, № 2, с. 90—104.

## ОПЫТ ПЛАНИРОВАНИЯ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ БИОТЕСТОВ

Совершенствование принципов и методики эксперимента является основой прогресса водной токсикологии, как и любой другой. Современная теория планирования экспериментальной науки [1, 3] открывает для достижения этой цели большие возможности. Однако до настоящего времени в работах по водной токсикологии, в том числе при постановке биотестов, используется в основном классический однофакторный эксперимент с последующей статистической обработкой результатов, что не позволяет достаточно полно раскрыть взаимодействие факторов, определяющих токсический эффект. При этом ставится избыточное количество опытов и нерационально затрачиваются труд и время исследований, тогда как планируемый эксперимент позволяет избежать этого.

Принципы и методы планирования эксперимента применительно к интересам многих отраслей точных и естественных наук разработаны в настоящее время достаточно глубоко и полно [5], поэтому для организации биотестов на основе планируемого факторного эксперимента существенно установить только 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. Таким образом минимальное число факторов, которое следует учесть при планировании биотестов, равно трем, т. е. должна быть реализована, по крайней мере, схема полного трехфакторного эксперимента (ПФЭ 2<sup>3</sup>).

При выборе длительности опытов необходимо учитывать биологию тест-объектов, характер действия исследуемого вещества, цель и задачи биотестирования. В острых опытах проявления токсического действия веществ существенно изменяются в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч. Так, при наблюдениях за динамикой отмирания тест-культур в острых опытах с тяжелыми металлами установлено (при температуре до 25°С), что в пер-

вые сутки отмирание незначительно, а максимум смертности достигается на 5-е сутки. В других случаях максимум смертности может быть достигнут за 3 суток. Не случайно в практике биотестирования острой токсичности, особенно в американских работах [11], указывается, по крайней мере, два значения:  $LC_{50}^{48}$  и  $LC_{50}^{96}$ , и эти величины обычно существенно различаются. 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, коловратки, бактерии) может охватить время жизни нескольких поколений (т. е. является хроническим). Для *Daphnia magna* срок экспозиции от 1 до 5 суток следует признать приемлемым. При этих опытах существенно стандартизировать условия подкормки. Если подкормка не производится, то длительность острого опыта не должна превышать 3 суток. В противном случае подкормку следует трактовать как добавочный фактор (+ или —), и опыт следует ставить по схеме ПФЭ  $2^4$ , или необходимо исключить один из варьируемых факторов, например, стабилизировать температуру. Число тест-объектов должно быть достаточным для статистически достоверных выводов.

Срок проявления эффективного действия разных токсикантов весьма различен. Так, хлорорганические пестициды при концентрациях ниже 1 мг/л могут вызвать явления острого отравления уже в течение нескольких часов, тогда как токсичность тяжелых металлов и СПАВ при аналогичных концентрациях проявляется только через несколько дней, а иногда только в длительном хроническом опыте. Различны и нижние пороги проявления токсического действия; поэтому диапазоны концентраций целесообразно выбирать на основании либо имеющихся литературных данных, либо предварительных «пристрелочных» опытов.

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°С. Различия в эффективности действия токсикантов в диапазоне температур 4—15°С крайне незначительны, но в интервале 25—30°С может иметь место резкое возрастание чувствительности гидробионтов к химическим агентам [2]. Эти температуры не типичны для естественных водоемов СССР, где даже летом вода не нагревается свыше 25°С или такая температура кратковременна, однако перегрев до 28—30°С и выше все чаще возникает в связи с влиянием сбросных вод ТЭС и АЭС [6, 7].

В исследованиях действия этого фактора на жизнь водоемов токсические агенты, как правило, не учитываются. В то же

время в токсикологических исследованиях, в частности при биотестировании, редко принимается во внимание температурный фактор, существенно влияющий на результаты биотестов [2]. При использовании такого подхода необходимо вводить соответствующие коррективы в установленные величины  $LC_{50}$ , например, указывать не  $LC^{48}_{50}$ , но  $LC^{48}_{50}(15^\circ)$  и  $LC^{48}_{50}(25^\circ)$  и т. д.

Результат опыта (т. е. показатель токсичности) должен быть выражен количественно. Именно эта величина является предметом последующей статистической обработки [3]. По существу, любая измеримая величина, характеризующая состояние тест-объекта, может рассматриваться как тест-показатель, но при ее интерпретации необходимо принимать во внимание многочисленные соображения, которые неоднократно высказывались на симпозиумах и совещаниях по вопросам методики исследования [4], выбора критериев токсичности [9], [10], нормы и патологии в водной токсикологии [8], а также зарубежный опыт применения биотестов [12, 13].

План ПФЭ  $2^3$  требует постановки 4 опытов, ПФЭ  $2^5$  — 8 опытов (для обработки эксперимента ставится 3 повторности), для ПФЭ  $2^5$  — 32 опыта [1]. Экспериментально установив значение откликов ( $Y_1, Y_2, Y_3 \dots$ ), например, величину смертности в тест-культуре, или интенсивность дыхания и т. д., дальнейшую обработку результатов производят в соответствии с [3]. При этом поскольку схема обработки информации, поступающей при выполнении ПФЭ, запрограммирована, экспериментатору нет надобности вникать к технику математического анализа получаемой информации и проводить вручную сложные расчеты.

В качестве примера приводим результаты биотестирования токсичности марганца на культуре *D. Magna* (табл. 1).

Таблица 1

Матрица планирования трехфакторного эксперимента (ПФЭ  $2^3$ ) и результаты (температура—время—доза, тест—объект *Daphnia magna*, критерий токсичности  $Y$  — смертность)

Кодированные переменные			Натуральные переменные			Отклики — $Y$ (количество определений)			
$X_1$	$X_2$	$X_3$	Температура, $^\circ\text{C}$	Время, ч	Концентрация, мг/л	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	Уср
+	+	+	30	72	10	50	100	100	83,3
+	+	—	30	72	1	50	40	10	33,3
+	—	+	30	24	10	50	0	0	16,6
+	—	—	30	24	1	0	0	0	0,00
—	+	+	10	72	10	60	60	70	63,3
—	+	—	10	72	1	10	0	0	3,3
—	—	+	10	24	10	60	50	50	53,3
—	—	—	10	24	1	0	0	0	0,00

В качестве факторов выбраны:  $X_1$  — температура (30, 10° С);  $X_2$  — время экспозиции (72, 24 ч);  $X_3$  — концентрация марганца (10,1 мг/л). После проведенного эксперимента и статистической обработки получено следующее уравнение регрессии:

$$Y = 31.69 + 14.11X_2 + 22.54X_3 + 10.79X_1X_2 \quad (1)$$

Значимость коэффициентов регрессии при  $p = 0,05$ —5,87.

Из уравнения следует, что смертность дафний возрастает лишь при увеличении экспозиции (14.11 $X_2$ ) и концентрации марганца (22.54 $X_3$ ). Влияет на смертность взаимодействие двух факторов — температуры и времени экспозиции (10.79 $X_1X_2$ ).

Аналогичным образом проанализированы материалы биотестирования других тяжелых металлов и различных иных токсикантов.

Таблица 2

Матрица планирования ПФЭ 2<sup>3</sup> и результаты эксперимента  
(Y — биоразлагаемость СПАВ, %)

Кодированные переменные			Натуральные переменные			Отклики			
$X_1$	$X_2$	$X_3$	Время, ч	Температура, °С	Концентрация, мг/л	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y_{\text{ср}}$
+	+	+	20	25	25	86,8	91,2	88,2	88,73
+	+	—	20	25	2,5	95,4	94,8	96,6	95,60
+	—	+	20	5	25	29,6	32,0	37,6	33,06
+	—	—	20	5	2,5	52,0	57,6	56,8	55,46
—	+	+	10	25	25	54,4	49,6	55,2	53,06
—	+	—	10	25	2,5	93,9	95,5	92,0	93,80
—	—	+	10	5	25	28,8	28,0	30,4	29,06
—	—	—	10	5	2,5	49,6	46,4	45,4	47,13

Приведенный пример рассматривает простейший случай анализа взаимодействующих факторов токсичности. В природной воде постоянно действующими факторами являются содержание кислорода, углекислоты, pH, освещенность водной толщи, содержание биогенов и др. Поэтому полноценный факторный эксперимент требует учета этих факторов и выражается формулой ПФЭ 2<sup>n</sup> (где n может быть более 10). Однако при стабилизации условий опыта (одна и та же вода, одинаковые условия освещенности) гидрохимические и гидрологические факторы могут практически не приниматься во внимание или варьироваться последовательно на фоне стабилизации ряда факторов в пределах полного факторного эксперимента.

Фактор жесткости, например, имеет особо существенное значение в опытах с тяжелыми металлами, содержание кислорода — при исследовании пестицидов.

Все изложенное относится преимущественно к острым опытам. В длительных хронических опытах многие параметры сре-



ды могут меняться, а методические основы проведения хронических опытов с гидробionтами пока еще не унифицированы в должной мере, поэтому проведение многофакторного хронического эксперимента требует дальнейшей методической разработки.

Таблица 3  
Матрица полного пятифакторного эксперимента (ПФЭ 2<sup>5</sup>)

Кодированные переменные					Натуральные переменные			Глюкоза, мг/л	Количество микробных клеток, млн
X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	концентрация СПАВ, мг/л	Температура, °С	Фосфор, мг/л		
+	+	+	+	+	10	28	50	20	5
+	+	+	+	—	10	28	50	20	0,5
+	+	+	—	+	10	28	50	1	5
+	+	+	—	—	10	28	50	1	0,5
+	+	—	+	+	10	28	5	20	5
+	+	—	+	—	10	28	5	20	0,5
+	+	—	—	+	10	28	5	1	5
+	+	—	—	—	10	28	5	1	0,5
+	—	+	+	+	10	4	50	20	5
+	—	+	+	—	10	4	50	20	0,5
+	—	+	—	+	10	4	50	1	5
+	—	+	—	—	10	4	50	1	0,5
+	—	—	+	+	10	4	5	20	5
+	—	—	+	—	10	4	5	20	0,5
+	—	—	—	+	10	4	5	1	5
+	—	—	—	—	10	4	5	1	0,5
—	+	+	+	+	1	28	50	20	5
—	+	+	+	—	1	28	50	20	0,5
—	+	+	—	+	1	28	50	1	5
—	+	+	—	—	1	28	50	1	0,5
—	+	—	+	+	1	28	5	20	5
—	+	—	+	—	1	28	5	20	0,5
—	+	—	—	+	1	28	5	1	5
—	+	—	—	—	1	28	5	1	0,5
—	—	+	+	+	1	4	50	20	5
—	—	+	+	—	1	4	50	20	0,5
—	—	+	—	+	1	4	50	1	5
—	—	+	—	—	1	4	50	1	0,5
—	—	—	+	+	1	4	5	20	5
—	—	—	+	—	1	4	5	20	0,5
—	—	—	—	+	1	4	5	20	5
—	—	—	—	—	1	4	5	1	0,5

Планируемый эксперимент может быть успешно применен и при изучении процессов деструкции токсикантов, в частности в биотестировании деградации поверхностноактивных веществ. Ниже рассматриваются соответствующие примеры.

В опытах исследован препарат из класса алкилбензосульфатов длиной цепочки  $R = C_{10} - C_{13}$ . Процесс деградации СПАВ определяется активностью водных микроорганизмов и зависит,

в первую очередь, от концентрации разлагаемого вещества, температуры и продолжительности опытов. Соответственно построен план трехфакторного эксперимента (табл. 2).

Эксперимент проводился на природной речной воде, взятой из Киевского водохранилища. Начальное количество сапрофитов составило 2126 кл./мл.

На основе экспериментальных данных было получено уравнение регрессии, проверена его адекватность и значимость коэффициентов регрессии. В результате получено следующее уравнение регрессии:

$$Y = 61.9 + 6.135X_1 + 20.7X_2 - 10.9X_3 - 3.07X_1X_2 + 3.78X_1X_3 + 4.85X_1X_2X_3 \quad (2)$$

Из уравнения следует, что биораспад СПАВ в значительной степени зависит от температуры ( $20.7X_2$ ) и в меньшей — от времени ( $6.135X_1$ ); концентрация же препарата очень резко тормозит процесс деструкции ( $-10.9X_3$ ). Эксперимент показал, что время, температура и концентрация СПАВ ( $X_1X_2X_3$ ) довольно слабо связаны между собой и выступают как независимые переменные.

Проведен также пятифакторный планируемый эксперимент (ПФЭ 2<sup>5</sup>) по оценке биораспада одного из компонентов синтетических моющих средств (СМС) — хлорного сульфанола на основе керосина (ХС). Этот эксперимент позволил учесть взаимодействие начальной концентрации СПАВ, температуры, концентрации триполифосфата натрия (наполнитель СМС), глюкозы и начального количества микроорганизмов.

В качестве факторов выбраны (табл. 3):  $X_1$  — начальная концентрация ХС 1—10 мг/л (в природных водах концентрация находится в этих пределах);  $X_2$  — температура ( $4-28^\circ\text{C}$ );  $X_3$  — фосфор (триполифосфат натрия, наполнитель СМС — 5—50 мг/л);  $X_4$  — глюкоза 1—20 мг/л (нижняя граница приближается к уровню содержания свободного органического вещества в природной воде);  $X_5$  — начальное количество бактерий в природной воде (0,0—5 млн. кл./мл — численность бактерий, встречающихся в природной воде).

В эксперименте использовали культуру *Pseudomonas sr.*, выделенную из эпифитной микрофлоры кувшинки белой (*Nymphaea alba*).

Остаточные количества СПАВ определяли по реакции с метиленовой синью. Время экспозиции — 7 суток.

После обработки результатов эксперимента и оценки коэффициентов регрессии, а также проверки адекватности уравнения, было получено следующее (табл. 4):

$$Y = 20.3 + 2.2X_2 + 3.3X_3 + 5.6X_4 - 3.9X_1X_2 + 3.0X_1X_3 - 2.26X_2X_3 + 2.2X_1X_2X_4 + 2.07X_1X_3X_4 + 2.09X_2X_3X_4X_5 \quad (3)$$

Наибольшее значение для ускорения процесса биораспада (в случае хлорного сульфанола) имеет присутствие глюкозы ( $5.6X_4$ ), а также фосфора ( $3.3X_3$ ) и взаимодействие начальной

Таблица 4

Результаты пятифакторного эксперимента (ПФЭ 2<sup>5</sup>)  
(при  $C_{\text{фосф}} = 11,5$  и  $1,12$  мг/л)

Концентрация, мг/л	% распада	Среднее, %	Концентрация, мг/л	% распада	Среднее, %
7,05	38,70	34,005	0,775	32,58	33,185
8,13	29,31		0,742	33,79	
7,65	33,48	33,155	0,924	17,50	15,45
7,72	32,83		0,970	13,4	
9,24	19,66	17,705	0,895	20,09	16,745
9,69	15,75		0,970	13,40	
9,00	21,74	11,74	0,775	30,80	26,565
11,30	1,74		0,870	22,33	
9,90	13,92	17,715	0,775	30,80	25,94
9,02	21,51		0,884	21,08	
8,64	24,87	23,655	0,710	36,61	37,725
8,92	22,44		0,685	38,84	
9,94	13,56	6,78	0,897	19,92	26,035
11,50	0,00		0,760	32,15	
10,30	10,44	9,57	0,897	19,92	24,025
10,50	8,70		0,805	28,13	
6,25	45,66	38,615	0,81	27,68	25,895
7,87	31,57		0,85	24,11	
7,26	36,87	42,51	0,94	16,08	23,22
5,96	48,15		0,78	30,36	
8,38	27,15	24,84	1,00	10,72	8,935
8,91	22,53		1,04	7,15	
10,04	12,70	17,615	1,06	5,36	9,38
8,91	22,53		0,97	13,40	
10,04	12,70	12,70	0,78	30,36	23,22
10,04	12,70		0,94	16,08	
11,00	4,35	11,785	0,90	19,65	12,505
8,60	25,22		1,06	5,36	
8,94	21,27	12,81	1,10	1,79	0,895
11,00	4,35		1,12	0,00	
9,26	19,48	19,48	1,04	7,15	3,575
9,26	19,48		1,12	0,00	

концентрации СПАВ с фосфором ( $3.0X_1X_3$ ), что особенно важно при деградации С.М.С. Значительно влияет на ускорение процесса биораспада комбинация температуры, фосфора, глюкозы и начального количества микроорганизмов ( $2.09X_2X_3X_4X_5$ ). Очень резко тормозит этот же процесс взаимодействие СПАВ и температуры ( $-3.9X_1X_2$ ).

Приведенные примеры указывают на несомненную перспективность применения планируемого факторного эксперимента в биотестировании. Этот метод позволяет более строго подойти к постановке биотестов. Освоение этого метода в методике биотестирования позволяет поднять на новую ступень уровень исследовательских работ и способствовать повышению эффективности и качества исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий, М., 1971. 283 с.
2. Бразинский Л. П., Шербань Э. П. Острая токсичность тяжелых металлов для водных беспозвоночных при различных температурных условиях.— Гидробиол. журн., 1978, т. 14, № 6, с. 86—97.
3. Васильев Н. Н., Амбросов В. А., Амарин И. П. Быстрые методы математической обработки и планирование эксперимента. Л., 1975, с. 44—47.
4. Вопросы методики в водной токсикологии. Л., 1979, вып. 144, с. 167.
5. Зедгидзе И. Г. Планировка эксперимента для исследования многокомпонентных систем. М., 1976, 390 с.
6. Кителица Л. А. Влияние сброса подогретых вод тепловых и атомных электростанций на беспозвоночных водоемов-охладителей.— Гидробиол. журн., 1973, т. 9, № 5, с. 104—120.
7. Мордухай-Болтовский Ф. Д. Тепловые электростанции и жизнь водоемов.— Природа, 1975, т. 13, № 1, с. 57—66.
8. Норма и патология в водной токсикологии.— Под ред. Н. С. Строганова. Байкальск, 1977, 194 с.
9. Строганов Н. С. Методика определения токсичности водной среды.— В кн.: Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971, с. 14—60.
10. Строганов Н. С. Биологический критерий токсичности в водной токсикологии.— В кн.: Критерий токсичности и принципы методик по водной токсикологии. М., 1973, с. 14—29.
11. (Doudoroff P.) Дудоров П. Токсикологические тесты при регулировании сброса сточных вод.— В кн.: Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л., 1979, с. 213—220.
12. Maciowski A. W., Liffle L. W., Sivas S. L. Bioassa-procedures and results. - Water Pollut. Contr. Fecl., 1980, vol. 52, N 6. p. 1630—1656.
13. Weber C. J. Bioassay.— In: Biological Field and laboratory methods for measuring the Quality of surface Waters and effluents. EPA, Cincinnati, Ohio, 1973. p. 1—20.

В. И. Лутьяненко

## БИОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ В ИХТИОТОКСИКОЛОГИИ

Идея биотестирования, т. е. оценки в экспериментальных условиях действия веществ на гидробионтов путем регистрации одного из важнейших биологических показателей, была предложена в конце XIX века выдающимся отечественным ихтиологом и рыбоводом О. А. Гриммом. По его инициативе выполнены первые экспериментальные исследования [1, 6] с целью выявить характер действия нефти на рыб в связи с обострившейся в то время проблемой нефтяного загрязнения Волги. В опытах Н. К. Чермака [6] и И. Н. Арнольда [1] убедительно показано токсическое действие нефти на различные виды рыб, наличие половых и индивидуальных особенностей токсикорезистентности рыб и высокая обратимость нефтяного отравления после перенесения рыб в чистую воду. Показателем токсичности служила «выживаемость» подопытных рыб в острых опытах, продолжительность которых варьировала в разных сериях от нескольких часов до нескольких суток. Иными словами, Н. К. Чермак и И. Н. Арнольд впервые применили метод «рыбной пробы», который впоследствии стал одним из основных методов в отечественных и зарубежных ихтиотоксикологических исследованиях.

Ихтиотоксикологов всегда волновала проблема оперативного определения токсичности поступающих в водоемы различных групп веществ, а разработка физиолого-биохимических экспресс-методов оценки токсичности на рыбах сформулирована в качестве задачи первостепенной важности полтора десятилетия тому назад [2]. К сожалению, разработка этого направления исследований, актуальность которого с каждым годом нарастает, одно время сдерживалась вследствие абсолютизации некоторых положений водной токсикологии, в частности, представлений о «биологической норме» организма и биологических критериях токсичности (плодовитость и качество потомства), предполагающих необходимость проведения длительных опытов на беспозвоночных с коротким жизненным циклом [5]. «Основными показателями токсичности водной среды должны быть плодовитость и качество потомства», — писал Н. С. Строганов. «Физио-

логические и особенно биохимические нарушения могут использоваться как показатели второстепенные, дополнительные к этим основным в первую очередь в тех случаях, когда речь идет о грубом воздействии токсиканта» [5, стр. 22—23]. К сожалению, подобные ничем не аргументированные соображения сыграли отрицательную роль в деле организации физиологических и биохимических исследований в токсикологических лабораториях и задержали их развитие почти на целое десятилетие. Только в середине 70-х годов эти исследования стали занимать важное место в работах ихтиотоксикологов, а их актуальность многократно возросла после осознания необходимости форсированной разработки проблемы биотестирования природных и сточных вод.

Цель и задачи биотестирования достаточно хорошо известны и рассмотрены в ряде статей настоящего сборника. Подчеркнем лишь одно принципиально важное положение: биотестирование проводится в первую очередь для получения оперативного сигнала о степени токсичности поступающих в водоем сточных вод, т. е. направлено на выявление острой токсичности. Поэтому, естественно, выявление так называемой «слабой» токсичности и «безвредности» в длительных опытах на ряде поколений с учетом размножения и качества потомства никак не согласуется с основной задачей биотестирования и имеет отношение к совершенно иной проблеме — биологической регламентации поступающих токсических веществ с помощью ПДК. Получение оперативного сигнала о токсичности сточных вод возможно только в краткосрочных опытах длительностью от 6 до 48 ч, лучше 24 ч, но никак не в течение 120 ч, т. е. 5 суток. Каждый, кто проводил острые опыты на рыбах, знает, что динамика гибели, а также изменения физиолого-биохимических параметров подопытных рыб после 24-часового контакта с ядом резко отличается от того, что имеет место в первые 24 ч. Происходит это вследствие включения адаптационно-компенсаторных механизмов и наступления фазы адаптации, протяженность которой зависит как от степени токсичности исследуемых компонентов сточных вод, так и от исходного физиологического состояния подопытных рыб, определяемого многими факторами [2, 3]. Кроме того, интересы производства, которые, собственно, и призвано обслуживать биотестирование, таковы, что требуют получения именно оперативного сигнала о качестве работы очистных сооружений и степени очистки поступающих с них сточных вод с тем, чтобы принять необходимые меры, если качество очистки в тот или иной момент работы предприятия окажется неудовлетворительным. Вполне понятно, что сведения о токсичности сточных вод, т. е. нарушении нормального хода работы очистных сооружений, которую токсикологи будут получать в течение 5 сут. (я уже не говорю об опытах «в ряду поколений»), попросту лишены информативного смысла для производства, ибо за это время ситуация может измениться десятки раз

в сторону как улучшения, так и ухудшения очистки сточных вод. Поэтому, решая основную задачу биотестирования, мы должны стремиться искать такие тест-объекты и выбирать такие физиологические и биохимические показатели, которые позволяют в кратчайшие сроки (3, 6, 12 или 24 ч.) выявить, если она имеется, токсичность поступающих в естественные водосмы сточных вод и принять на основе полученных данных оперативные меры для снижения этой токсичности.

Критический анализ имеющихся теперь многочисленных литературных сведений показывает, что различные группы токсикантов вызывают глубокие изменения биохимического состава и обмена веществ рыб задолго до их гибели, а многие биохимические показатели белкового углеводного и липидного обмена, глубина и направленность их изменений могут быть использованы для диагностических целей [3]. Рассмотрим некоторые из этих показателей.

Многогранная физиологическая роль тканевых и особенно сывороточных белков, способность чутко отражать изменение интенсивности и направленности белкового обмена, в частности пластического, позволяют использовать их в качестве важнейшего биохимического теста функционального состояния организма как в норме, так и при воздействии различных токсикантов. Исходя из этих представлений, мы предприняли попытку использовать концентрацию общего сывороточного белка в ихтиотоксикологических исследованиях еще в середине 60-х годов. Первые опыты выполнены на двух массовых видах, обитающих в Рыбинском водохранилище, — леще и налиме. В качестве токсиканта использована сублетальная доза фенола — 5 мг/л. Продолжительность опытов 24—144 ч. Снижение концентрации общего сывороточного белка отмечено как у малоподвижных налимов (на 13%), так и у более подвижных лещей (на 11%) только в конце опытов, что, на наш взгляд, следует объяснить низкой температурой токсического раствора (6—8°С), поскольку эксперименты ставились весной и осенью.

Значительно более выраженные, а главное — скоротечные изменения концентрации общего сывороточного белка отмечены нами у молоди осетровых, отравленных различными пестицидами. В серии экспериментов, проведенных нами совместно с сотрудниками А. А. Кокзой, А. П. Берилло, А. Б. Захаровым на 2—4-месячной молоди русского осетра и белуги, мы исследовали сравнительную токсичность трех широко применяемых в сельском хозяйстве пестицидов: метафоса, пропанида и ялана. Продолжительность острых опытов 24—48 ч, концентрации пестицидов — метафоса 16,7 мг/л, пропанида 26,6 мг/л, ялана 50 мг/л.

Острое отравление молоди белуги метафосом привело к снижению концентрации общего сывороточного белка почти на 50%, яланом — на 40 и пропанидом — на 30 (см. таблицу).

**Влияние острого отравления пестицидами на концентрацию  
общего сывороточного белка рыб, г %**

Вид рыбы	Пестицид	Опыт $M \pm$	Контроль $M \pm$
Белуга	Метафос	$0,60 \pm 0,21$	$1,17 \pm 0,29$
	Пропанид	$0,85 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,29$
	Ялан	$0,71 \pm 0,16$	$1,17 \pm 0,29$
Русский осетр	Метафос	$1,71 \pm 0,26$	$2,05 \pm 0,37$
	Пропанид	$2,31 \pm 0,42$	$2,07 \pm 0,32$
	Ялан	$1,62 \pm 0,27$	$2,07 \pm 0,32$

Глубокое и стремительное снижение концентрации общего сывороточного белка у молоди белуги, возможно, связано с его перераспределением между тканями и кровью или активацией процессов катаболизма белка. Однако нельзя исключить в качестве первопричины столь резкой гипопротенемии и нарушение водно-солевого обмена, вследствие чего могло произойти «разжижение» крови. Вопрос этот заслуживает специального внимания.

Несколько иная картина выявлена при анализе результатов определения концентрации общего сывороточного белка у молоди русского осетра. В острых опытах с яланом и метафосом концентрация общего сывороточного белка снизилась на 24 и 15% (соответственно) и практически не изменилась в опытах с пропанидом. Важно, однако, подчеркнуть то обстоятельство, что увеличение времени наблюдений до 12 сут при снижении концентрации исследованных пестицидов вдвое оказало еще более выраженный токсический эффект. Концентрация общего сывороточного белка у мальков, отравленных метафосом, снизилась на 50,5%, у мальков, отравленных яланом, — на 32% и только у мальков, отравленных пропанидом, — на 6%. Особое значение этих опытов состоит в том, что они демонстрируют односторонненность изменений белкового обмена у рыб как при остром, так и подостром отравлении. Это имеет первостепенное значение при выборе того или иного биохимического показателя для целей биотестирования.

Таким образом, концентрация общего сывороточного белка является важным интегральным показателем белкового обмена, его направленности и интенсивности. Она претерпевает существенные изменения под влиянием токсикантов различной природы. Особо следует отметить чрезвычайную простоту определения концентрации общего сывороточного белка на рефрактометре. Важным дополнительным показателем белкового обмена, который можно использовать для целей биотестирования, следует считать фракционный состав сывороточных белков, а точнее — соотношение между альбуминами и глобулинами. Первая попытка использовать этот биохимический показатель в ихтиоток-



сикологических исследованиях предпринята нами в 1965 г. на каспийской севрюге, подвергнутой токсическому воздействию сточных вод сложного состава, в которых ведущая роль принадлежит ядам органического ряда с преимущественным действием на кровь.

Электрофоретический анализ сывороточных белков отравленных рыб выявил существенные изменения относительного содержания основных фракций (альбуминов, глобулинов) в сравнении с контрольными севрюгами. У отравленных рыб произошло снижение альбуминов и увеличение относительного содержания глобулинов, вследствие чего альбуминглобулиновый коэффициент у подопытных рыб (0,35) оказался на 34% ниже в сравнении с контрольными (0,53). Еще более существенные различия между отравленными и здоровыми севрюгами выявляются при сопоставлении относительного содержания отдельных фракций глобулинов. Так, например, относительное содержание альфа-глобулинов у отравленных рыб (13,8%) в 2 с лишним раза выше, чем у здоровых (6,4%), а содержание бета<sub>1</sub>-глобулинов в 3 с лишним раза выше (27,3 и 8,0% соответственно). В то же время уровень содержания высокомолекулярных белков — бета<sub>2</sub>-глобулинов + гамма-глобулинов у отравленной севрюги (33,1%) значительно ниже, чем у здоровой (51,1%).

Основные результаты электрофоретического анализа сывороточных белков у подопытных и контрольных рыб были подтверждены с помощью одной из наиболее чувствительных проб коллоидной устойчивости белков — коагуляционной ленты Вельмана. У абсолютного большинства подопытных рыб она была смещена на 2—3 единицы влево, что свидетельствует о серьезном нарушении нормального соотношения альбумин — глобулины, снижении альбуминов и увеличении грубодисперсных фракций глобулинов. Здесь я хотел бы подчеркнуть простоту, демонстративность и доступность реакции коллоидной устойчивости, что делает возможным использовать ее в качестве экспресс-метода оценки характера соотношения между основными фракциями сывороточных белков. К сожалению, этот метод оценки токсичности веществ с преимущественным гепатотропным действием все еще не вошел в практику ихтиотоксикологических исследований.

Совокупность полученных нами данных однозначно свидетельствует о влиянии различных групп токсикантов на белковый обмен, что находит свое проявление в изменении концентрации общего сывороточного белка и его основных фракций: альбуминов, альфа-, бета- и гамма-глобулинов. В дальнейшем этот вывод был неоднократно подтвержден в других лабораториях и тем самым экспериментально обоснована возможность использования сывороточных белков в качестве биохимического теста токсичности различных групп веществ. Высокая чувствительность этого показателя, скоротечность наступающих

изменений и простота определения позволяют использовать его наряду с коллоидной устойчивостью сывороточных белков при опотестировании на рыбах.

Одним из двух основных источников энергии, необходимой организму для обеспечения нормальной жизнедеятельности, служат углеводы. Глюкоза и гликоген — легко мобилизируемые энергетические субстраты, используемые организмом в качестве «запального» топлива для обеспечения энергией многих физиологических процессов, лежащих в основе реакций на экстремальные воздействия. Поэтому показатели углеводного обмена, его интенсивности и направленности представляют первостепенный интерес при оценке реакций рыб на токсические вещества.

Уже в первых наших опытах, выполненных на модели фенольной интоксикации разных по экологии видов рыб (налим и лещ), было показано, что в течение первых 24 ч под влиянием токсиканта в концентрации 5 мг/л происходят разнонаправленные изменения уровня гликемии. Так, например, у 27% подопытных налимов, подвергнутых токсическому воздействию фенола, отмечена резко выраженная гипергликемия при среднем содержании сахара крови 218 мг%, что в 3 раза превосходит данные по контрольной группе (73 мг%). У второй группы подопытных рыб (36% исследованных особей) имела место гипогликемия при среднем содержании сахара 42,2 мг%. Наконец, у третьей группы испытуемых налимов (43% особей) содержание сахара практически оставалось неизменным в сравнении с контрольной группой налимов. Если учесть, что все налимы, как подопытные, так и контрольные, длительное время (в течение зимнего периода) выдерживались в аквариальных условиях, то обнаруженные нами разнонаправленные сдвиги уровня сахара крови подопытных рыб можно объяснить различной индивидуальной устойчивостью налима к токсическому действию сублетальной концентрации фенола. Кстати, разнонаправленные изменения концентрации сахара крови отмечены впоследствии В. В. Метелевым [4] у карпов, отравленных фтором. Спустя 28 ч после погружения налимов в субтоксический раствор фенола наметилась тенденция к некоторому снижению содержания сахара у подопытных рыб и его нормализация, продолжавшаяся последующие 2 сут. Однако на 5-е сутки контакта рыб с ядом уровень гликемии вновь повысился. Иными словами, у налимов отмечена двухфазная реакция: первоначальное повышение, затем возвращение к норме с относительной стабилизацией и, наконец, новое повышение в случае продолжающегося контакта рыб с ядом.

У лещей имела место однофазная реакция на токсикант — более выраженная и стойкая в сравнении с налимом гипергликемия. Мы связываем эти особенности с различной двигательной активностью исследованных видов рыб. У активных лещей сублетальная концентрация фенола вызвала повышенную

в сравнении с налимами двигательную активность, а следовательно, повышенную потребность мышц в глюкозе. Это в свою очередь приводит, по-видимому, к более энергичной мобилизации гликогена и поступлению глюкозы в кровяное русло с последующей доставкой в мышцы.

Высказанное нами предположение о повышенной мобилизации гликогена печени у отравленных рыб было проверено в нашей лаборатории Г. К. Шелухиным на модели пестицидного отравления четырехмесячной молоди русского осетра. В качестве токсикантов использован метафос в концентрации 8,3 мг/л, пропанид — 13,3 и ялан — 25. Определение гликогена в печени проводили антроновым методом.

Резкое снижение содержания гликогена печени с  $4,7 \pm 1,07$  г% у контрольных рыб до  $1,00 \pm 0,29$  г% у подопытных отмечено при отравлении метафосом. Менее выразительное, но достаточно заметное (на 24%) снижение содержания гликогена в печени имело место и в опытах с пропанидом (с  $4,71 \pm 1,07$  до  $3,58 \pm 1,09$  г%) и только ялан в течение 5-суточного опыта не оказал сколько-нибудь существенного влияния на гликоген в печени.

Полученные нами исходные данные по влиянию токсикантов органической природы на углеводный обмен указывают на возможность использования важнейших показателей этого обмена — сахара крови и гликогена печени в качестве биохимических индикаторов токсического эффекта. Последующие работы, выполненные как в нашей стране, так и за рубежом с использованием различных групп токсикантов [3], подтвердили и сам факт изменения углеводного обмена у отравленных рыб и его диагностическое значение.

В тесной связи с углеводным находится липидный обмен, поскольку при энергетическом обеспечении многих процессов жизнедеятельности углеводы используются в качестве «запального» топлива, а липиды играют роль стратегического топлива. Образно говоря, липиды, а точнее жирные кислоты, «сгорают в пламени углеводов». Основная масса липидов рыб представлена фосфолипидами и триглицеридами, из которых первые несут структурную функцию, а вторые служат основным энергетическим субстратом. Достижения современной биохимии липидов рыб позволили использовать некоторые показатели липидного обмена для оценки реакции рыб на воздействие токсических веществ различной природы. Первые опыты в этом плане были начаты и успешно развиваются в Институте биологии АН Латвийской ССР. В серии экспериментов, выполненных в 70-х годах Т. Х. Фрейманс, В. П. Платпира, М. В. Грундауле, М. Р. Дамска, К. К. Хейдеманнс на модели пестицидного отравления карпа, исследована направленность и интенсивность изменений уровня содержания в органах и тканях подопытных рыб (печень, сердце, мозг, плазма крови, эритроциты, скелетная мускулатура) фосфолипидов, триглицеридов, незастерифици-

рованных жирных кислот, свободного холестерина и эфиров холестерина. В качестве токсикантов авторы использовали 2 гербицида (2,4-Д и феназан) и 2 инсектицида (ДДТ и линдан). Наиболее значительные сдвиги показателей липидного обмена в печени и плазме крови. Количество фосфолипидов и неэстерифицированных жирных кислот в печени резко снижается, а триглицеридов существенно возрастает. В плазме крови, напротив, содержание фосфолипидов увеличивается почти втрое. У отравленных рыб происходит перераспределение фосфолипидов между печенью и мышцами, вследствие чего их содержание в печени снижается, а в крови (транспортная функция), в скелетной и сердечной мускулатуре возрастает. Снижение неэстерифицированных жирных кислот в печени без достоверного увеличения их содержания в крови и мышцах обусловлено, вероятно, повышенными энергетическими потребностями этого органа, удовлетворение которых может осуществляться за счет окисления жирных кислот. В плазме подопытных карпов отмечено достоверное снижение концентрации свободного холестерина, обусловленное либо участием холестерина в связывании токсиканта, либо его успешным использованием для синтеза стероидных гормонов, обеспечивающих адаптацию организма к неблагоприятным условиям. Авторы приходят к вполне обоснованному заключению, что показатели липидного обмена должны занять достойное место в практике ихтиотоксикологических исследований, а от себя добавлю — и в практике биотестирования.

Особое достоинство биохимических показателей белкового, углеводного и липидного обмена при использовании их в качестве биотестов на рыбах состоит в том, что выраженные отклонения этих показателей от нормы наступают задолго до летального исхода и могут быть выявлены даже при таких концентрациях, которые не вызывают видимых проявлений токсического эффекта.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Арнольд Н. Н. О влиянии нефти на рыб — Вести рыбопромышленности, 1897, № 4, с. 167—196.
2. Архипов В. И. Токсикология рыб. М., 1967, 216 с.
3. Тихомиров В. И. Общая ихтиотоксикология. М., 1983, 320 с.
4. Мелья В. В. Патогенез отравления рыб фтором, метилнитрофосом и фосфиндом — Бюлл. Всесоюз. ин-та экспериментальной ветеринарии, 1969, вып. 6, с. 55—59.
5. Смирнова Н. С. Биологические критерии токсичности водной среды — В кн. Симпозиум по водной токсикологии, Л., 1969, с. 21—23.
6. Чижик Н. К. О влиянии нефти на рыб. — Вести рыбопромышленности, 1929, № 1, с. 1—30.

## ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА ТОКСИКОЗОВ РЫБ

Нормальное течение обменных процессов, лежащих в основе жизнедеятельности целостного организма или отдельной клетки, контролируется огромным количеством ферментов, объединенных в сложные, взаимосвязанные системы. Согласно данным современной биохимии и молекулярной биологии, в любой клетке животного организма одновременно «работают» многие сотни ферментов. В настоящее время число идентифицированных ферментов достигло 800, и их список непрерывно пополняется. Отсюда понятен огромный интерес к ферментным системам со стороны медиков и формирование мощного направления биохимической науки — клинической биохимии, в которой учение о ферментах, энзимодиагностике и энзимопатиях занимает по праву центральное место.

Сегодня уже ни у кого не вызывает сомнений (и это стало азбучной истиной), что в основе токсического действия различных по природе групп веществ лежит нарушение функций того или иного фермента, той или иной ферментной системы, контролирующей белковый, липидный, углеводный или энергетический обмен. Использование ферментов в практике ихтиотоксикологических исследований еще только набирает силу и заметно отстает от смежных областей сравнительной токсикологии. Причин тому много, и одна из них пренебрежительное (в недалеком прошлом) отношение к биохимическим исследованиям в ихтиотоксикологии, возведение их в ранг второстепенных. Мы должны глубоко осознать, что решение центральных задач ихтиотоксикологии — биологическая регламентация с помощью ПДК и биотестирование сточных вод — возможно только в экспериментальных условиях на «организменном», а не «экосистемном» уровне, с тем чтобы предотвратить поступление в водоем токсических веществ в таком количестве, которое может оказать пагубное влияние на жизнь водоема в целом.

Первые отечественные ихтиотоксикологические исследования с использованием ферментов были выполнены в Институте биологии внутренних вод АН СССР в начале 60-х годов [4, 6, 7]. Мы исследовали динамику изменения активности холинэстера-

зы в мышцах карасей и сыворотке крови лещей, отравленных фенолом. Установлено, что уже через 7 мин. после погружения подопытных рыб в токсический раствор активность мышечной холинэстеразы снижается почти в 2 раза и остается примерно на этом уровне в течение следующих 2 часов. Таким образом была продемонстрирована принципиальная возможность использования активности ферментов в качестве биохимического теста токсичности веществ для рыб и выявлена скоротечность изменения этого показателя, происходящего задолго до наступления летального эффекта. Это обстоятельство приобретает первостепенное значение для использования активности ферментов при биотестировании.

В дальнейшем, в конце 60-х и в 70-х годах у нас в стране и особенно за рубежом стали регулярно появляться публикации, в которых представлен большой экспериментальный материал, однозначно свидетельствующий о существенном влиянии различных веществ на активность холинэстеразы мозга, крови и других тканей рыб. Фактическая часть этих работ довольно подробно рассмотрена мной в специальной главе монографии «Общая ихтиотоксикология» [5], и сейчас я хочу остановиться лишь на общих моментах, представляющих интерес для энзимодиагностики токсикозов рыб и биотестирования.

Прежде всего следует подчеркнуть однотипность реакции рыб и теплокровных животных на токсическое воздействие фосфорорганических пестицидов — угнетение активности ацетилхолинэстеразы мозга. Сходство реакции рыб и теплокровных животных на фосфорорганические пестициды проявляется не только в самом факте ингибирования ацетилхолинэстеразы (АХЭ) мозга, но и в скорости развития этого эффекта — развивается в первые часы контакта с ядохимикатами, задолго до летального эффекта. Выраженность антихолинэстеразного действия фосфорорганических пестицидов у рыб находится в прямой зависимости от концентрации ядохимиката и времени его действия. Более глубокое угнетение АХЭ мозга рыб вызывают летальные концентрации фосфорорганических пестицидов в сравнении с сублетальными. Разумеется, строгой корреляции между концентрацией токсиканта и любым токсическим эффектом ожидать нереально, поскольку токсикологи имеют дело с живыми организмами, исходное состояние которых определяется десятками факторов, и «уравнять» их практически невозможно. Тем не менее, имеющиеся сегодня экспериментальные данные однозначно свидетельствуют о том, что высокие концентрации фосфорорганических пестицидов вызывают более глубокое и быстро наступающее угнетение активности АХЭ мозга рыб в сравнении с более низкими.

Итак, фосфорорганические пестициды вызывают быстро развивающееся снижение активности АХЭ мозга рыб с более или менее длительным последствием. Восстановление исходной ак-

тивности АХЭ мозга рыб в случае прекращения контакта с пестицидами происходит в течение 8—30 суток. Все эти факты, выявленные экспериментальным путем, послужили основанием для использования уровня активности фермента в качестве биохимического критерия токсичности данной группы веществ и даже для оценки уровня загрязнения водных экосистем в США [10—12]. Правда, здесь возникли разногласия относительно того, где именно смотреть активность холинэстеразы: в мозге или в плазме крови. Конечно, кровь доступнее для анализов, чем, скажем, мозг или печень, и ее можно исследовать на разных этапах эксперимента у одной и той же рыбы, но при этом следует помнить, что функциональное значение АХЭ мозга и крови далеко не равнозначно для организма. Необходимо опытным путем установить характер изменений и скорость их проявления со стороны холинэстеразы различных органов и тканей у разных видов рыб.

Существенный интерес в практическом отношении представляет вопрос о том, какая степень угнетения активности холинэстеразы того или иного органа и ткани должна восприниматься как свидетельство выраженного токсического эффекта. По мнению Коппеджа [10, 11], снижение активности АХЭ мозга на 13% от контроля отражает токсическое действие пестицидов, а на 83% приводит к гибели рыб. Сходной точки зрения придерживается Гольдштейн [13]. Он считает, что угнетение активности АХЭ мозга рыб на 10%, а также в эритроцитах на 20% и в плазме крови на 33% может служить надежным показателем токсического действия пестицидов. Напомним, что и у теплокровных животных снижение активности АХЭ эритроцитов на 20—25% отражает развитие токсического процесса. По данным М. Али [1], угнетение активности АХЭ мозга рыб в первые часы контакта с пестицидами до 50% и ниже является показателем неизбежного летального исхода в пределах 10 сут, а на 30—40% — развития выраженного токсического эффекта. Иными словами, угнетение активности холинэстеразы различных органов и тканей можно использовать не только в качестве надежного биохимического критерия токсичности пестицидов, но и для прогностических целей.

Теперь остановимся еще на одном, весьма важном, на наш взгляд, вопросе о специфичности антихолинэстеразного эффекта фосфорорганических пестицидов у рыб. Вопрос этот представляет не только теоретический, но и первостепенный практический интерес. Как мы уже отмечали, в США антихолинэстеразное действие ФОСов используют как для оценки степени токсичности того или иного пестицида фосфорорганической группы в лабораторных экспериментах, так и для оценки уровня загрязнения фосфорорганическими пестицидами водных экосистем, т. е. для биотестирования и для биомониторинга.

Биотестирование фосфорорганических пестицидов в лабора-

торных условиях на рыбах с использованием такого чувствительного биохимического теста не вызывает никаких возражений. Однако биоиндикация фосфорорганических пестицидов в естественных водоемах на основе одного лишь этого биохимического теста встречается с серьезными затруднениями. И дело не только в том, что уровень активности АХЭ мозга и других органов и тканей у рыб природных популяций зависит от многих факторов, в том числе от температуры воды в водоеме, а поэтому широко варьирует. Главная причина состоит в том, что изменение активности АХЭ рыб может быть вызвано и другими токсикантами. Напомним, что нами еще в 1963 г. было впервые показано снижение активности мышечной холинэстеразы у рыб, подвергшихся острому фенольному отравлению [7]. Результаты этих опытов были впоследствии подтверждены на других видах рыб, отравленных фенолом, серноокислым аммонием и медью, причем исследовалась ацетилхолинэстераза мозга [15].

В настоящее время накоплено уже довольно много экспериментальных данных, из которых следует, что активность АХЭ различных органов и тканей рыб может изменяться под влиянием не только фосфорорганических пестицидов, но и ряда других токсикантов, в том числе карбаматных и даже хлорорганических. Так, например, в работе В. Литбраски и Г. Литбраски [14] показано, что хлорорганический пестицид — токсафен (полихлоркамфен) в концентрации 0,5 и 0,75 мг/л уже спустя 10 ч после начала опытов вызывал снижение активности АХЭ сыворотки крови карпа на 23—41%, а в эритроцитах — повышение на 27—53%. Другой хлорорганический пестицид — ДДТ вызывал угнетение активности АХЭ мозга окуней почти на 50% от контроля [8]. А. Я. Маляревской [8] удалось показать, что такие неспецифические стрессорные воздействия на организм, как гипоксия, приводят к резко выраженному снижению активности АХЭ мозга (на 82—87%) и печени (71—89%) у окуней на стадии агонии. Вполне понятно, что эти изменения наступают не сразу, а имеют динамику своего развития по мере углубления патологических изменений. Анализируя полученные данные, А. Я. Маляревская приходит к вполне обоснованному выводу, что угнетение активности холинэстеразы «свидетельствует о неспецифичности изменения этого показателя и о возможности применения его для характеристики различных токсикаций и разнообразных нарушений в организме рыб, связанных с изменением нормального функционирования нервной системы» [8, стр. 106].

Влияние хлорорганических пестицидов на активность АХЭ различных органов и тканей отмечает и О. В. Маслова [9] у рыб, оглобленных на загрязненных участках Дуная. Определяя наличие остаточных количеств хлорорганических пестицидов в организме рыб, в частности ДДТ, она обнаружила весьма интересный факт: чем больше ДДТ в том или ином органе рыб, тем ниже активность его АХЭ. Интересно, что активность холинэсте-



разы сыворотки крови рыб, в организме которых имеется ДДТ, либо вообще не меняется, либо увеличивается. Так, например, у хищных рыб, отловленных в дельте Дуная, активность фермента крови была достоверно выше (у судака на 63%, у окуня на 54), чем у этих же видов, отловленных в более чистом Днепровско-Бугском лимане. Такая направленность изменений активности холинэстеразы сыворотки крови влиянием хлорорганических пестицидов, отличающихся от того, что имеет место при отравлении рыб фосфорорганическими пестицидами, вполне возможна. По нашим неопубликованным данным, полученным совместно с Л. А. Петуховой еще в 1963 г., длительное (до 6 сут) действие сублетальной концентрации фенола (5 мг/л) на лещей приводило к значительному повышению активности холинэстеразы крови (с 3,60% разложенного ацетилхолина у контрольных рыб до 9,79% у отравленных). Сегодня трудно дать однозначное объяснение обнаруженным различиям в изменении активности АХЭ сыворотки крови, вызванным фосфорорганическими пестицидами и другими токсикантами (фенол, ДДТ). Одной из причин могут быть фазовые изменения активности фермента [3], когда первоначальное снижение активности АХЭ сменяется затем повышением и стабилизацией на новом уровне с последующим резким снижением незадолго до гибели рыб.

Наконец, имеются убедительные экспериментальные данные [1] о том, что карбаматные пестициды вызывают не менее выраженное и скоротечное угнетение активности АХЭ мозга рыб, чем фосфорорганические.

Таким образом, угнетение активности АХЭ мозга и крови рыб может быть вызвано не только фосфорорганическими пестицидами, но и многими другими токсикантами (фенол, аммоний, медь, карбаматные и хлорорганические пестициды, синезеленые водоросли и их токсины). Отсюда следует, что использовать этот биохимический показатель для оценки загрязнения водных экосистем фосфорорганическими пестицидами, т. е. для биомониторинга, можно лишь с большой осторожностью наряду с определением остаточных количеств этих пестицидов в рыбах, исключив при этом наличие других токсикантов в воде и гидробионтах. Вполне понятно, что сделать это чрезвычайно трудно, а поэтому с практической точки зрения мало оправдано. Сказанное в полной мере относится и к другой, более поздней [2] идее использования «энзимомониторинга природных вод», высказанной недавно в небиологической прессе. Речь идет об энзимодиагностике функционального состояния жизнедеятельности природных популяций как об одном из элементов биомониторинга качества природных вод. К сожалению, эта идея не имеет под собой необходимой экспериментальной основы. Более того, современный уровень знаний в этой области позволяет думать, что уровень активности ферментов у гидробионтов может изме-

няться не только под влиянием токсического фактора (независимо от природы поступающих в водоем токсических веществ, что уже само по себе в значительной мере обеспечивает энзимондикацию в качестве элемента биомониторинга), но и многих абиотических факторов водной среды. Не исключено также, что разные ферменты у разных по высоте организации групп гидробионтов будут в разной степени зависеть от разных факторов водной среды (температуры, величины pH, дефицита кислорода и др.). Словом, здесь необходимо солидное экспериментальное, а не «теоретическое» обоснование возможности использования энзимондикации для оценки качества природных вод. Что касается «теоретического обоснования», то необходимости в нем нет по двум причинам. Во-первых, «при современном уровне знаний» вряд ли кто решится серьезно оспаривать роль ферментов в обеспечении нормального хода метаболизма и что в основе действия различных токсикантов лежит нарушение координированной деятельности отдельных ферментов и ферментных систем. Во-вторых, сама идея использования ферментов в ихтиотоксикологии была высказана, как мы уже отмечали, почти два десятилетия тому назад и с тех пор в этом направлении как у нас в стране, так и за рубежом уже ведутся интенсивные экспериментальные поиски. В результате показано, что многие ферменты, такие как ацетилхолинэстераза различных органов и тканей, аденозинтрифосфатазы тканей, тиамингидролаза, глутаматдегидрогеназа, трансаминазы могут успешно использоваться в лабораторных условиях для энзимодиагностики отравления рыб различными токсикантами, оценки выраженности токсического процесса и его исхода [5].

Правда, большинство имеющихся данных получено на тканевых ферментах (за исключением сывороточной холинэстеразы). Ферменты сыворотки крови остаются все еще вне поля зрения ихтиотоксикологов. Между тем, их количество у человека, например, варьирует, по данным разных авторов, от 50 до 100. Основная масса ферментов крови образуется клетками тканей и поступает в кровь в результате распада клеток различных тканей и последующего освобождения ферментов. Поэтому, вполне естественно, возникла идея использовать ферменты, образующиеся в тканях и циркулирующие в крови, для диагностических целей. Успехи клинической биохимии позволили всесторонне обосновать представления об определенных биохимических синдромах, характеризующих тот или иной патологический процесс. Особое место при этом заняла энзимодиагностика — оценка уровня активности отдельных ферментов сыворотки крови в диагностических целях. Чаше других в клинической биохимии используются щелочные и кислая фосфатазы, трансаминазы, холинэстеразы, альдолаза и амилаза. Некоторые из этих ферментов уже применяются в ихтиотоксикологии, а возможности использования других необходимо эксперимен-

тельно изучить в самое ближайшее время. В этом мы видим одну из важнейших задач дальнейшего развития биохимических аспектов ихтиотоксикологии. Не приходится сомневаться в том, что энзимодиагностика займет в ихтиотоксикологии столь же почетное место, которое по праву принадлежит ей в клинической биохимии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Али М. А. Сравнительное изучение действия пестицидов различного химического состава на рыб.— Автореф. канд. дисс., М., 1976, 23 с.
2. Короленко П. И., Гвоздарев А. Ю., Предина Л. М. К вопросу создания экспресс-методов энзимодиагностики функционального состояния жизнедеятельности организмов природных популяций.— В кн.: Гидрохимические материалы. Л., 1981, с. 64—77.
3. Косинова Н. Р. Влияние фосфорорганических пестицидов на уровень метаболизма некоторых видов рыб.— Автореф. канд. дисс. Севастополь, 1978, 24 с.
4. Лукьяненко В. И. Токсикология рыб. М., 1967, 216 с.
5. Лукьяненко В. И. Общая ихтиотоксикология. М., 1983, 320 с.
6. Лукьяненко В. И., Петухова Л. А. Динамика изменений активности мышечной холинэстеразы и количества аммиака в мозге при фенольном отравлении карасей.— В кн.: Биология рыб волжских водохранилищ. М.—Л., 1966, с. 311—318.
7. Лукьяненко В. И., Петухова Л. А. Некоторые биохимические показатели крови и тканей рыб в норме и при рефлекторном возбуждении.— Тез. докл. Всесоюз. совещ. по экологической физиологии рыб. М., 1966, с. 101—103.
8. Малиревская А. Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного еутрофирования водоемов.— Киев, 1979, 254 с.
9. Маслова О. В. Активность холинэстеразы у эстуарных рыб при коммуляции ДДТ.— Гидробиол. журн., 1981, т. 17, вып. 1, с. 78—81.
10. Coppage D. L. Characterization of fish brain acetylcholinesterase with an automated pH-stat for inhibition studies.— Bull. of Environ. Contamination and Toxicology, 1971, N 6, p. 304—310.
11. Coppage D. L. Organophosphate pesticides: specific level of brain Ache inhibition related to death in sheeps head minnows.— Trans. Amer. Fish. Soc., 1972, vol. 101, p. 534.
12. Coppage D. L., Braldech T. E. River pollution by anticholinesterase agents.— Water. res., 1976, vol. 10, N 1, p. 19—24.
13. Goldstein G. Biochemical indicators of environmental pollution.— In: Indicators of Environmental Quality. N. Y.—L., 1972, p. 109—131.
14. Litbraski B., Litbraski H. Hemmung der Acetylcholinesterase durch Toxaphen in Insekten und Fischen.— Biol. Rdseh., 1974, vol. 12, N 5, p. 345—346.
15. Mukherjee S., Bhattacharya S. Effect of some industrial pollutants on fish brain cholinesterase activity.— Environ. Physiol. and Biochem., 1974, vol. 4, N 5, p. 226—231.

А. С. Лукьянов, О. Ю. Фролов

### **АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В РАННИЕ СРОКИ ФЕНОЛЬНОГО ОТРАВЛЕНИЯ КАРПА *CYRINUS CARPIO* L.**

Одним из важнейших этапов создания систем биотестирования качества вод является разработка экспресс-методов раннего выявления первичных симптомов отравления гидробионтов. Для этих целей целесообразно использовать физиолого-биохимические показатели, позволяющие выявить токсический эффект веществ по состоянию различных функциональных систем организма. Известно, что большинство токсических веществ, загрязняющих водоемы, действует на нервную систему рыб, и влияние многих из них сопровождается ингибированием эстеразных ферментных систем. Показано [16], что фосфорорганические пестициды (ФОП), карбаматы, ионы меди, кадмия, арсената, дихромата и галогенопроизводные углеводов подавляют активность ферментов ацетилхолинэстеразы (АХЭ), которой принадлежит важная роль в реализации нейромедиаторной функции ацетилхолина (АХ) в нервной системе. Накопилось много данных, позволяющих использовать изменение активности холинэстеразы (ХЭ), в первую очередь АХЭ, в качестве чувствительного индикатора и экспресс-теста для оценки степени загрязнения вод различными концентрациями ФОП и карбаматов.

Широко распространенным загрязняющим веществом является фенол. Имеется ряд работ, свидетельствующих о том, что при фенольной интоксикации рыб в первую очередь воздействию подвергается центральная нервная система (ЦНС) рыб [2, 3, 7—9]. Ведущая роль в развитии комплекса реакций, обусловленных фенольным отравлением, по-видимому, принадлежит системе АХ — АХЭ, на что указывают результаты поведенческих [4, 9], электрофизиологических [14] и биохимических [5, 15] исследований. Конкретные механизмы действия фенола до сих пор остаются неясными и требуют дальнейших исследований.

Для установления возможности использования определения активности АХЭ в качестве биохимического теста для выявления токсического действия фенола в ранние сроки отравления и в целях диагностики токсикоза нами было проведено исследование влияния различных сублетальных концентраций фенола на активность ХЭ сыворотки крови, АХЭ мышечной ткани

и в некоторых отделах головного мозга карпа (тектуме и сетчатке глаза), в которых холинэргической системе принадлежит важная роль [10].

В работе использовали карпов-сеголетков и годовиков, содержащихся в условиях аквариальной. Опыты проводили в песенно-летний и летне-осенний периоды в 10-литровых аквариумах в воде с рН 7,0—7,2 и температурой 20—22° С. В контрольные и опытные группы отбирали рыб одинакового размера по 5—10 шт. В опытные аквариумы вносили фенол в конечной концентрации 1, 5, 10, 20 мг/л. Действие каждой дозы испытывали через 2, 5, 8, 24, 48 и 72 ч. Воду в аквариуме меняли ежедневно с восстановлением исходной концентрации токсиканта. Рыб контрольной и опытной групп декапитировали быстрым отсечением головы. На холоду из мозга извлекали тектум, а из изолированного глазного яблока сетчатку. Сегменты мышц вычленили из части тела между хвостовым и анальным плавниками. Сыворотку получали из крови, взятой из хвостовой вены. Полученные ткани контрольных и опытных рыб промывали в растворе Рингера, взвешивали и гомогенизировали в 5-кратном объеме 50 мМ трис-НСI буфера рН 7,4. После центрифугирования гомогената на ЦУМ-1М при 4000 об/мин 20 мин в надосадочной фракции проводили определение общей АХЭ. Активность внешней (функциональной) АХЭ тектума и сетчатки определяли путем одновременного измерения ее в толстых срезах тканей и в гомогенатах из них, как описано в работе [6]. Для определения активности мембранно-связанной АХЭ из тектума и сетчатки выделяли фракцию синаптических мембран по методу [17], применяя градиентное центрифугирование. В опытах по влиянию фенола на АХЭ *in vitro* фермент солибилизировали 1%-ным тритоном X-100. Активность АХЭ в тканях мышц и мозга измеряли по Элману [11], в присутствии селективного ингибитора неспецифической ХЭ тетраизопропилпирофосфорамид ( $10^{-4}$ М), используя в качестве субстрата ацетилтиохолинйодид. Активность ХЭ сыворотки определяли с бутирилтиохолинйодидом и ацетилтиохолинйодидом как субстратами реакции. Стандартную кривую зависимости числа тиольных групп от значения экстинкции при 412 нм получали для восстановления глутатиона. Удельную активность фермента выражали количеством микромолей тиольных групп, освобождаемых ферментом в 1 мин 1 мг белка материала при 25° С и рН 8,0. Содержание белка измеряли по Лоури [12]. Статистическую обработку данных проводили по непараметрическому критерию Вилкоксона — Манна — Уитни, в отдельных случаях, при выявлении различий, дополнительно по критерию Стьюдента.

Проведенные нами эксперименты показали, что под действием использованных концентраций фенола снижается активность АХЭ в тканях мозга и мышц карпов. Снижение активности фермента происходит в первые сутки отравления (рис. 1).

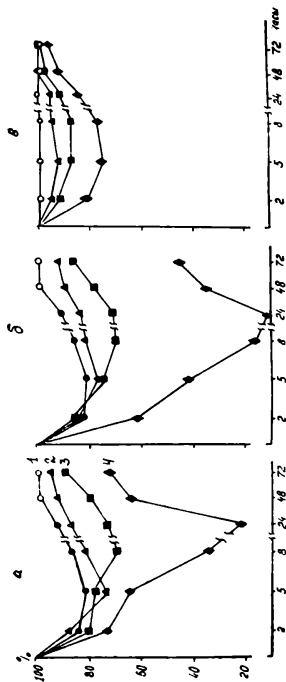


Рис. 1. Общая активность ацетилхолинэстеразы (% от контроля) в гомогенатах текстуры (а), сетчатки (б) и мышечной ткани (в) карпа в течение 3-суточной экспозиции рыб в воде, содержащей фенол в концентрациях 1 (1), 5 (2), 10 (3) и 20 (4) мг/л. Заштрихованные знаки — достоверные различия ( $p < 0.05$ ) опыта и контроля

При этом наибольшая степень ингибирования АХЭ в отделах мозга при концентрации фенола 1,5 мг/л отмечается к 5 ч действия фенола на рыб, а при 10 мг/л к 8 ч. Степень подавления активности фермента при концентрации фенола 10 мг/л составляет к 8 ч в тектуме и сетчатке 27—29%, при концентрациях 1 и 5 мг/л составляет к 5 ч соответственно 17—15 и 23—20%. При содержании фенола в воде 20 мг/л АХЭ в сетчатке подавляется в большей степени, чем в тектуме и максимальное снижение происходит к 24 ч. Достоверное угнетение активности мышечной АХЭ наблюдалось при концентрации фенола в воде 5 мг/л и выше, при этом подавление фермента наиболее выражено к 5 ч действия токсиканта. Обращает внимание меньшая степень подавления активности АХЭ мышц по сравнению с таковой в отделах мозга. Следует отметить различное время восстановления активности АХЭ в исследованных тканях для использованных концентраций фенола и пропорциональность степени реактивации фермента концентрации токсиканта. Активность мышечной АХЭ при концентрациях фенола 5 и 10 мг/л восстанавливается до уровня контроля уже в течение 48 ч. Активность АХЭ в тектуме и сетчатке при концентрации фенола 1 мг/л не отличается от уровня контроля через 48 ч действия фенола. Достоверных различий АХЭ активности отделом мозга в контроле и опыте при концентрациях фенола 5 и 10 мг/л не обнаруживали соответственно к 96 и 120 ч фенольного отравления. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами работы [15], где показано, что активность ХЭ мозга других видов рыб при фенольной интоксикации снижается в течение 24 ч с последующим повышением активности до уровня нормы к 48 ч. В другой работе [5] также наблюдали рост активности мышечной ХЭ карасей после значительного угнетения фермента при отравлении фенолом в концентрации 100 мг/л.

Известно, что существует внутриклеточная АХЭ и АХЭ, локализованная на поверхности мембраны нервных клеток. Последняя рассматривается как внешняя и функциональная. Общая активность фермента в гомогенатах включает активность обеих форм. Разработаны методы отдельного определения внешней и общей АХЭ с использованием параллельного измерения активности в гомогенатах и срезах одной и той же ткани [6]. Нам представлялось важным установить, в какой мере изменяется под действием фенола активность внешней АХЭ как функциональной доли фермента. Для этого исследовали влияние фенола в концентрации 10 мг/л через 2, 5 и 24 ч его действия на активность внешней АХЭ срезов тектума и сетчатки и внешней АХЭ, связанной с синаптическими мембранами, выделенными из тектума и сетчатки. Внешняя АХЭ срезов и мембранно-связанная АХЭ составляют для тектума соответственно 23—26 и 12—14%, для сетчатки 34—40 и 6—10% общей активности фермента. Из анализа полученных данных по влия-

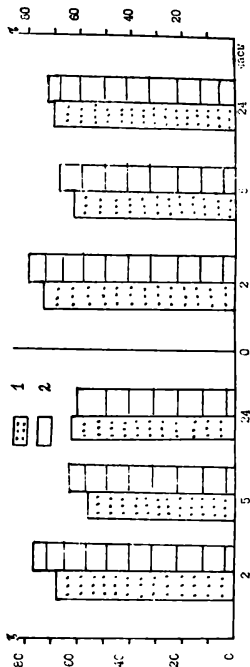


Рис. 2. Внешняя (функциональная) ацетилхолинэстераза (% от внешней АХЭ контроля) тканей (а) и срезов (б) в срезах ткани (1) и фракции синтетических мембран (2) через 2, 5, 24 ч действия фенола при концентрации 10 мг/л.



нию фенола (рис. 1, 2) следует, что внешняя АХЭ срезом и мембрано-связанная подавляется при сопоставлении с таковыми контроля через 2, 5 и 24 ч действия фенола в большей степени, чем общая активность фермента. Из результатов этой серии экспериментов можно заключить, что действие фенола приводит к угнетению активности преимущественно внешней, функциональной АХЭ.

Действие фенола на активность АХЭ может быть прямым или опосредованным. Для выяснения этого были поставлены дополнительные опыты *in vitro*, когда фенол непосредственно вносили в конечных концентрациях 1, 5, 10 и 100 мг/л в гомогенаты тектума мозга и мышц и в раствор фермента, солиubilизированного детергентом из фракции синаптических мембран тектума, с измерением активности АХЭ через 2, 5 и 24 ч. Установлено, что фенол в концентрациях 1 и 5 мг/л не снижает уровня АХЭ в пробах. При концентрации фенола, соответствующей 10 мг/л, активность фенола в гомогенатах тектума и мышц оказалась сниженной лишь через 24 ч на 4—6%, а активность солиubilизированного фермента на 8—10%. Через 2 и 5 ч достоверных различий не выявлялось. Следует отметить, что в опытах *in vivo* (рис. 1) снижение активности АХЭ в гомогенатах через 24 ч действия 10 мг/л фенола было более значительным. Фенол в концентрации 100 мг/л угнетал активность в гомогенатах через 5 ч в среднем на 5%, через 24 ч на 9—12%, а активность солиubilизированного фермента подавлял через 2 ч на 3%, через 5 ч на 6—8, через 24 ч на 11—14. Эти данные указывают на возможность прямого ингибирующего действия фенола на активность АХЭ в опытах *in vivo*. В то же время учитывая, что в организме животных фенол метаболизируется в диоксифенолы гидрохинон и пироксатетин [1], а также возможность ингибирования АХЭ избытком АХ, в пользу чего свидетельствуют данные об увеличении выброса АХ в синаптическую щель нервно-мышечного синапса при прямом воздействии фенола [14], можно говорить и об опосредованном действии фенола на фермент. При этом не исключены и другие механизмы опосредованного действия фенола, приводящего в конечном счете к снижению активности АХЭ.

Результаты опытов по влиянию фенола в концентрациях 1, 5, 10 и 20 мг/л на АХЭ сыворотки крови сеголетков карпа показали, что холинэстеразная активность остается на уровне контроля в течение 72-часовой экспозиции рыб с фенолом, что согласуется с имеющимися данными [13] об отсутствии изменения АХЭ сыворотки рыб под действием фенола.

Итак, фенольное отравление карпа сопровождается изменениями активности АХЭ мозга и мышц в ранние сроки интоксикации, причем подавление активности фермента в отделах мозга более выражено, чем в мышцах. Изменения активности АХЭ происходят в основном за счет функциональной доли фермента.

Результаты настоящей работы не противоречат известным представлениям о важной роли системы АХ — АХЭ ЦНС рыб в развитии симптомокомплекса фенольной нитоксикации рыб. Определение активности холинэстераз может служить удобным биохимическим показателем токсического действия фенола в ранние сроки нитоксикации, а также для целей диагностики фенольного отравления рыб.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Деннис В. Парк. Биохимия чужеродных соединений. М., 1973.
2. Лукьяненко В. И. Физиологические механизмы фенольной нитоксикации рыб.— В кн.: Вопросы гидробиологии. М., 1965.
3. Лукьяненко В. И. Физиолого-биохимические аспекты водной токсикологии.— В кн.: Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л., 1979.
4. Лукьяненко В. И. О механизме действия фенола на центральную нервную систему рыб в связи с изменением внешнего симптомокомплекса фенольной нитоксикации под влиянием антихолинэстеразных препаратов.— В кн.: Вопросы водной токсикологии. М., 1970.
5. Лукьяненко В. И., Петухова Л. А. Динамика изменений активности мышечной холинэстеразы и количества аммиака в мозге при фенольном отравлении карасей.— В кн.: Биология рыб волжских водохранилищ. М.— Л., 1966.
6. Маслова М. Н., Озирская Е. В. Об использовании срезов мозга для определения внешней ацетилхолинэстеразы в филогенетических и онтогенетических исследованиях.— Журн. эвол. биохим. и физиол., 1978, т. 5, с. 505—507.
7. Матей В. Е. Действие фенола на центральную нервную и периферическую системы костистых рыб.— В кн.: Антропогенные факторы в жизни водоемов. Л., 1975, с. 97—117.
8. Флеров Б. А. Влияние фенола на условнорефлекторную деятельность рыб.— Гидробиол. журн., 1965, т. 1, вып. 3, с. 49—50.
9. Флеров Б. А. Экспериментальное исследование фенольного отравления у рыб.— В кн.: Влияние фенола на гидробионтов. Л., 1973, с. 5—58.
10. Drüjan B. D., Borges J. H. D., Brzin M. Histochemical and cytochemical localization of acetylcholine esterase in retina and optic tectum of teleost fish.— Can. J. Biochem., 1979, vol. 57, p. 43—48.
11. Ellman Y. L., Courtney V., Andres J. R., Featherstone R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity — Biochem. Pharmac., 1961, vol. 7, p. 88—95.
12. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent.— J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265—275.
13. Kristoffersson R., Broberg S., Oikari A., Pekkarinen M. Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike (*Esox lucius* L.) in brackish water.— Ann. zool. fenn., 1974, vol. 11, p. 220—230.
14. Kuba K. The action of phenol on neuromuscular transmission in the red muscle of fish.— Japan J. Physiol., 1969, vol. 19, p. 30—36.
15. Mukherjee S., Bhattacharya S. Effect of some industrial pollutants on Fish Brain Cholinesterase activity — Environ. Physiol. and Biochem., 1974, vol. 4, p. 226—231.
16. Olson D. L., Christensen Y. M. Effect of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro) — Environ. Res., 1980, vol. 21, p. 327—337.
17. Whittaker V. P. The subcellular fractionation of nervous tissue.— In: The structure and function of nervous tissue (ed. Baurne). N.—Y., 1969, vol. 3, p. 1—24.

### **ВЛИЯНИЕ СМОЛЯНЫХ КИСЛОТ НА МОЛЕКУЛЯРНУЮ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ ПЕЧЕНИ ФОРЕЛИ**

В настоящее время имеется достаточно много сведений, свидетельствующих о тонком и высокочувствительном реагировании изоферментной системы организма на изменение условий внешней среды. Появляется все больше данных, говорящих, что молекулярная гетерогенность ферментов и других белков (например гемоглобина) служит своеобразным биохимическим инструментом, с помощью которого организм повышает свои гомеостатические свойства [3, 5, 6].

Нами была выяснена адаптивная роль лизосомального аппарата рыб при воздействии токсикантов, входящих в состав промстоков целлюлозно-бумажных комбинатов [2, 9, 10].

По-видимому, еще большее значение для оценки санитарного состояния водоемов по физиолого-биохимическому статусу организмов, в них обитающих, могли бы иметь изоферменты или множественные молекулярные формы лизосомальных ферментов.

Для такого рода исследований нами выбран фермент-маркер лизосом кислая фосфатаза (фосфомоноэстераза, КФ-3.1.3.2). Хотя ее роль в клеточном метаболизме окончательно не установлена, считают, что кислая фосфатаза выполняет регуляторную функцию, контролируя уровень неорганического фосфата в клетке [4]. Как и большинство других ферментов, кислая фосфатаза обнаруживает молекулярную гетерогенность [7, 11]. В литературе имеются сведения об изменчивости зимнего профиля этого фермента при различных формах патологии [1, 8, 14].

В настоящей работе представлены некоторые результаты изучения влияния натриевой соли абнетиновой кислоты на фракционный состав кислой фосфатазы в гомогенате печени форели. Абнетиновая кислота — наиболее распространенная из смоляных кислот, неотъемлемый компонент промстоков ЦБК (рис. 1). Она принадлежит к производным дитерпена, кольцевая структура которого лежит в основе строения различных

физиологически-активных соединений, таких как стерины и гормоны. Известно также, что натриевая соль дегидроабиеино-вой кислоты используется в качестве стандартного токсиканта для бионисследования лососевых рыб [13].

Объектом исследования служили двухлетки заводской радужной форели (*Salmo gairdneri* Rich). Рыбу помещали в дехлорированную воду (температура 10—12°), содержащую натриевую соль абиеиновой кислоты. С целью выбора рабочей дозы токсиканта был проведен ряд опытов, в которых использовались дозы 15 и 30 ppm, оказавшиеся остротоксичными (рыбу

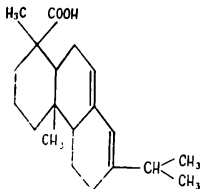


Рис 1. Структура абиеиновой кислоты.

брали на анализ в сублетальном состоянии). Кроме того, в разные сезоны года были поставлены хронические опыты (концентрация токсиканта — 3 ppm). Партия контрольных рыб находилась в чистой воде при тех же условиях содержания (аэрирование, температура и т. д.). По окончании опыта рыбу забивали декапитацией, извлеченную печень отмывали от крови в охлажденном физиологическом растворе. Гомогенат готовили растиранием ткани в ступке с песком. В качестве ресуспендирующей среды использовали 0,005 М Трис-НСI буфер, pH 7,4. Экстракт кислой фосфатазы получали при последующем центрифугировании гомогената при 20 000 g в течение 30 мин.

Фракционирование экстракта фермента осуществляли методом ионообменной хроматографии на слабом анионите ДЭАЭ-целлюлозе. На колонку размером 1,0×1,5 см, заполненную ионитом, наносили 10 мг белка, элюирование проводили Трис-НСI буфером, pH 7,4, используя ступенчатый градиент концентраций: 0,005, 0,010, 0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,250, 0,500, 0,750 и 1,00 М. Собирали фракции элюата по 3 мл и определяли в них активность кислой фосфатазы по методу Бессея с сотр. [12].

Патологоанатомическое обследование рыб, подвергшихся хроническому воздействию, выявило ряд изменений в органах,

характерных для токсикозов: гиперемию и ослизнение респираторных пластинок жабр и сердца, более светлую окраску печени, желчи и т. д.

После хроматографирования экстракта кислой фосфатазы из печени на ДЭАЭ-целлюлозе максимумы активности обнаруживались в I, 4 и 7-й порциях элюата. Для удобства сравнения спектров множественных форм энзима было выделено три фракции: I — активность кислой фосфатазы в 1-й порции, II — суммарная активность фермента во 2, 3, 4 и 5-й порциях, III — суммарная активность в 6, 7, 8, 9 и 10-й порциях элюата (рис. 2).

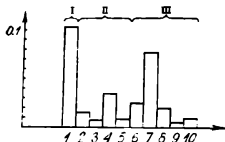


Рис. 2. Распределение активности кислой фосфатазы после фракционирования экстракта фермента на ДЭАЭ-целлюлозе. I, II, III — номер фракции. По оси ординат — активность кислой фосфатазы, условные единицы, по оси абсцисс — номер порции элюата.

Данные по распределению активности кислой фосфатазы в трех фракциях получены после колоночной хроматографии (см. таблицу). Сравнение показывает, что во всех хронических опытах активность кислой фосфатазы в I фракции у опытных рыб меньше, чем у контрольных. В то же время в опыте (за исключением январского эксперимента) активность гидролазы в III фракции выше, чем во II; в контроле — наоборот, вторая изоформа активнее третьей, т. е. абиеитиновая кислота вызывает перераспределение активности в сторону анионных форм.

Таким образом, присутствие токсиканта в воде приводит к активизации изоформ кислой фосфатазы с измененной электронной плотностью молекул и, следовательно, к реализации новых каталитических свойств энзима.

Таблица демонстрирует очевидное отличие результатов зимнего (январь) опыта от летних (май и август). Так, зимой активность II изоформы кислой фосфатазы в значительной степени угнетена, доля фермента с менее выраженными анионными свойствами (I фракция) заметно выше. Такая перестройка может быть вызвана необходимостью функционирования фермента при низких температурах воды зимой. Еще раз подчеркнем, что в этом опыте не происходило перераспределения активности между II и III изоформами, как это было в летних опытах.

Особо жесткие условия в острых опытах (доза абиеитиновой кислоты 15 и 30 ppm, экспозиция 0,5—3 сут) вызывали почти

Таблица

Активность кислой фосфатазы во фракциях, полученных после хроматографии экстракта кислой фосфатазы из печени контрольных и опытных рыб на ДЭАЭ-целлюлозе, % от суммы

Дата	Доза токсиканта, ррп	Время воздействия, сут.	№ рыб	Контроль			Опыт		
				I фр.	II фр.	III фр.	I фр.	II фр.	III фр.
Апрель 1978 г.	15	1	1	80,3	12,3	7,4	93,2	0,6	6,2
			2	68,7	15,3	16,0	91,2	8,6	0,2
	15	3	1	*	—	—	92,5	2,4	5,1
	30	0,5	1	*	—	—	88,9	5,3	6,8
Май 1978 г.	30	1	1	*	—	—	86,8	6,8	6,4
	3	7	1	64,9	20,7	14,4	42,4	22,8	34,8
			2	57,7	23,4	18,9	62,8	18,8	19,4
			3	34,7	37,5	27,8	38,0	26,8	35,2
Август 1978 г.	3	16	1	64,4	20,3	15,3	51,4	18,0	30,6
			2	66,3	25,5	8,2	42,6	19,2	38,2
Январь 1979 г.	3	19	1	82,7	8,0	9,0	69,4	4,6	26,9
			2	77,8	6,4	15,8	74,3	7,2	18,5
			3	76,3	7,7	16,0	86,5	3,2	10,3
			4	75,8	1,8	22,4	73,4	2,4	25,2
			5	78,7	3,5	17,8	—	—	—

Примечание \* — контроль, общий для всех острых опытов; рыбы выдерживались в чистой воде в течение 3 сут.

полное элиминирование II и III фракций кислой фосфатазы. Такое изменение во фракционном составе является, видимо, фатальным, в то время как в хронических опытах модификация изоферментного спектра имеет адаптивный характер. Наблюдаемые сдвиги активности изоферментов в ответ на действие факторов внешней среды являются выражением регуляции клеточного обмена, механизм которой может заключаться в индукции биосинтеза отдельных изоформ или в проявлении специфических ингибиторов, или во взаимодействии этих факторов.

Таким образом, получены данные, позволяющие судить о возрастании аннионных свойств кислой фосфатазы в гомогенате печени форели в результате воздействия абнетиновой кислоты в хроническом опыте. Сублетальное состояние рыбы в остром опыте характеризуется незначительной долей аннионных изоформ фермента.

В связи с вышесказанным предполагается, что исследования в данном направлении могут привести к получению критерия, указывающего на изменения биохимических характеристик лизосом, вызванных наличием ядов в водной среде. Этот тест можно использовать для оценки физиологического состояния рыб при изменении экологической обстановки в водоеме

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Андреев Н. А., Андерсоне Д. П. Количественные сдвиги изоферментов кислой фосфатазы в крови больных инфарктом миокарда.— Кардиология, 1978, т. 18, № 11, с. 122—124.
- 2 Высоцкая Р. У., Руоколайнен Т. Р., Сидоров В. С. Изменение активности кислых гидролаз при действии на изолированные лизосомы рыб сульфатного щелоча.— В кн.: Гидробиология Выгозерского водохранилища. Петрозаводск, 1978, с. 156—165.
- 3 Кирличников В. С. Функциональные различия между изоэнзимами (изоформами) и между аллельными формами белков у рыб.— В кн.: Биохимическая и популяционная генетика рыб. Л., 1979, с. 5—9.
- 4 Несмелкова М. А., Мареева О. Б., Колот М. Н., Кулаев Н. С. Изучение взаимосвязи метаболической и генетической регуляции щелочной и кислой фосфатазы в клетках *E. coli*— Биохимия, 1978, т. 43, вып. 10, с. 1783—1789.
- 5 Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М., 1973, 227 с.
- 6 Покровский А. А., Коровников К. А. К вопросу о функциональном значении изоферментов дегидрогеназ.— В кн.: Проблемы медицинской химии. М., 1973, с. 5—36.
- 7 Покровский А. А., Николаева М. Я., Кравченко Л. В., Тутельян В. А. Внутрелизосомальная локализация изоферментов кислой фосфатазы.— ДАН СССР, 1973, № 2, с. 469—472.
- 8 Рязанов Е. М. Действие противоопухолевых препаратов на лизосомальный аппарат нормальных и опухолевых клеток.— Автореф. канд. дис., Л., 1978, 29 с.
- 9 Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Лизенко Е. Н., Руоколайнен Т. Р., Богдан В. В., Нефедова З. А. Участие лизосом в механизме действия токсических веществ на организм.— В кн.: «Биологические проблемы Севера». Тезисы, Петрозаводск, 1976, с. 202—203.
- 10 Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Руоколайнен Т. Р. Влияние фенола и смоляных кислот на изолированные лизосомы печени рыб.— В кн.: Структура и функции лизосом. Тезисы. М., 1976, с. 130—131.
- 11 Allen J. M., Gocherman J. Electrophoretic separation of multiple forms of particle associated acid phosphatase.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, vol. 121, p. 616—633.
- 12 Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum.— J. Biol. Chem., 1946, vol. 164, p. 321—329.
- 13 Davis J. C., Hoos R. A. W. Use sodium pentachlorophenate and dehydroabiatic acid as reference toxicants for salmonid bioassay.— J. Fish. Res. Board. Canada, 1975, vol. 32, N 3, p. 411—416.
- 14 Li C. J., Tam L. T., Lam K. W. Acid phosphatase isoenzymes in human Leukocytes in normal and pathologic conditions.— J. Histochem. Cytochem., 1970, vol. 18, N 7, p. 437—481.

## **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СООТНОШЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ — БИОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕСТ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ**

Биологический тест должен количественно и качественно характеризовать состояние среды, обеспечивающее нормальное развитие организмов и их воспроизводство в естественных условиях. Поэтому в качестве биотестов необходимо выделять ведущие показатели жизнедеятельности организмов, которые в максимальной степени интегрировали бы их общее функциональное состояние. В качестве такого биотеста можно назвать интенсивность процессов обмена веществ, обеспечивающих все стороны жизнедеятельности организмов — развитие, рост и воспроизводство. Если абсолютные показатели обмена веществ свидетельствуют лишь о количественных параметрах протекания этих процессов, то их соотношение отражает качественную сторону. В качестве таких соотношений могут быть предложены отношения абсолютных величин пластического ( $P$ , дж) и функционального ( $R$ , дж) обмена к общей величине энергии ассимилированной пищи ( $A$ , дж), а также отношение пластического и функционального обмена между собою.

Для исследования возможности использования количественных соотношений между некоторыми сторонами обмена веществ в качестве биотестов были определены абсолютные величины пластического и функционального обмена в раннем онтогенезе пресноводного лосося, зимнего бахтака, гегаркуни, летнего бахтака, радужной и озерной форели. На основании полученных результатов вычислялись коэффициенты  $P/A$ ,  $R/A$  и  $P/R$ . Коэффициенты  $P/A$  и  $R/A$  показывают степень использования организмом ассимилированной энергии пищи на пластический и функциональный обмен. Соотношение  $P/R$  свидетельствует о зависимости между собою пластического и функционального обмена.

Интенсивность пластического обмена определялась по биохимическому составу и приросту массы тела исследуемых организмов за конкретное время развития. Величина  $R$ , дж рассчитывалась по интенсивности потребления кислорода (определялась в проточной респираторной установке), умноженной на



оксикалорийный коэффициент 14,08. В качестве функциональных нагрузок были применены изменения температуры среды и условий освещения. Опыты поставлены в проточных аквариумах и бассейнах (100×100 см). Все условия опытов, за исключением исследуемых параметров среды, для каждого вида рыб были сходными.

Средние результаты исследуемых коэффициентов для эмбрионов, личинок и мальков лососевых рыб показывают, что соотношение процессов обмена веществ у различных видов неодинаково (см. таблицу). У эмбрионов наибольшее количество

Соотношение процессов обмена веществ  
в раннем онтогенезе лососевых рыб

Период развития	Коэффициенты	Лосось	Зимний бахтак	Гегаркуни	Летний бахтак	Радужная форель	Озерная форель
Эмбриональный	P/A	50,6	26,4	15,6	44,5	43,4	47,6
	R/A	49,4	73,6	84,4	55,5	56,6	62,4
	P/R	102,5	36,0	18,4	59,4	76,5	115,8
Личиночный	P/A	30,2	32,2	26,5	32,2	34,4	33,7
	R/A	69,8	67,8	73,5	67,8	65,6	66,3
	P/R	56,7	47,4	36,1	46,7	48,0	51,8
Мальковый	P/A	40,0	33,5	32,7	31,3	40,0	39,6
	R/A	60,0	66,5	67,3	68,7	60,0	60,6
	P/A	66,7	50,4	49,4	45,4	66,6	68,4

энергии пищи расходуется лососем и озерной форелью на пластический обмен. Затем следует летний бахтак и радужная форель. Судя по коэффициенту P/R эмбрионы лосося и озерной форели характеризуются минимальными величинами функционального обмена.

Во время личиночного развития максимум трансформированной энергии пищи на пластический обмен отмечен у радужной и озерной форели; на второе место по данному показателю могут быть поставлены зимний и летний бахтак. В мальковый же период вновь на первое место по использованию энергии на пластический обмен выдвигаются лосось и озерная форель, к ним практически примыкает радужная форель.

Если рассмотреть изменения соотношений использования энергии пищи на функциональный и пластический обмен в процессе развития исследованных организмов, то наибольшей интенсивностью пластического обмена будут характеризоваться эмбрионы (за исключением гегаркуни и зимнего бахтака). Затем наблюдается некоторое его снижение во время личиночного развития (кроме названных выше видов рыб) с последующим увеличением в мальковый период. Очевидно, некоторое сокращение использования энергии на пластический обмен у личинок

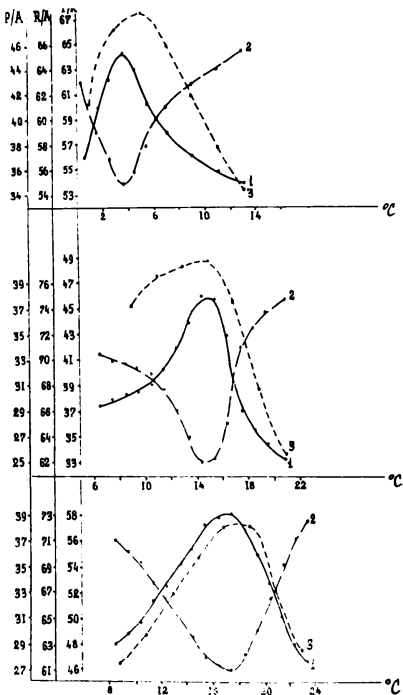


Рис. 1 Зависимость соотношения абсолютных показателей некоторых сторон обмена веществ лососевых рыб от температуры среды.

ком пищи в естественных условиях. Об этом свидетельствует тот факт, что у всех видов исследованных рыб величина пластического обмена сокращалась во время смешанного питания в среднем на 7—45%. Еще следует отметить, что наблюдаются различия в соотношении процессов обмена веществ между весенне- и осенненерестующими видами. Так, у эмбрионов осенненерестующих рыб средняя величина  $P/A$  равнялась 35,0, а у весенненерестующих — 43,9. Этот показатель соответственно был у личинок 30,3 и 33,3 и у мальков — 36,4 и 35,7. Показатели  $R/A$  равнялись соответственно 65,0 и 56,1, 69,7 и 66,7, 63,6 и 64,3, а коэффициенты  $P/R$  — 68,2 и 67,9, 48,0 и 49,9, 58,7 и 56,0.

При изменении температуры воды исследуемые количественные соотношения процессов обмена веществ существенно изменялись (рис. 1). Максимальные значения  $P/A$  и  $P/R$ , а минимальные  $R/A$  отмечены для всех возрастных групп в зоне благоприятных температур. Для эмбрионов лососевых этот диапазон находится в пределах 2,5—6,0°, для личинок — 10—16° и для мальков — 15—19°. Характерно, что для осенненерестующих рыб более благоприятна левая половина выявленного интервала, а для весенненерестующих — правая. При отклонении температуры среды от благоприятной зоны в обе стороны величины  $P/A$  и  $P/R$  уменьшаются, а  $R/A$  возрастают, что указывает на снижение в зоне неблагоприятного температурного режима использования трансформированной энергии пищи на пластический обмен и увеличение интенсивности функционального обмена (очевидно, до определенного температурного уровня).

Средние результаты изменения количественных соотношений величин обмена веществ эмбрионов лососевых рыб зависят от условий освещения (рис. 2). Условия освещения также отражаются на соотношении величин использования энергии на пластический и функциональный обмен. У эмбрионов лососевых показатель  $P/A$  возрастает в темноте (икра в естественных условиях инкубируется в темноте). Повышение коэффициента  $P/R$  также отмечено в темноте и при смене условий освещения через 16 ч. У личинок после перехода на активное питание и у мальков, наоборот, увеличение  $P/A$  отмечено при круглосуточном освещении. По-видимому, в данном случае начинают действовать другие биологические механизмы, обусловленные сменой характера питания.

Весьма важно еще отметить, что в опытах с кормлением молодью лососевых рыб неполноценное питание отрицательно сказывалось на пластическом обмене рыб с одновременным стимулированием использования энергии на функциональный обмен. При обеспечении молоди полноценной и калорийной пищей величина  $P/A$  возрастала, а  $R/A$  уменьшалась по сравнению с

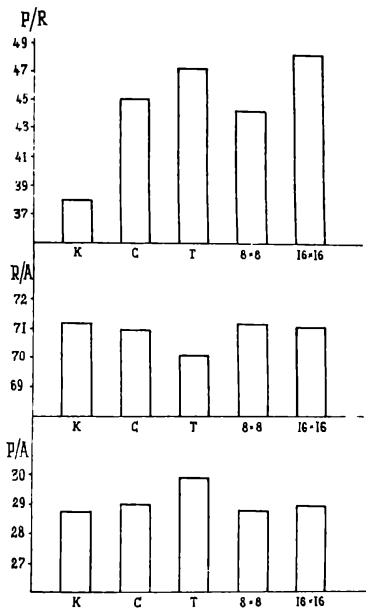


Рис. 2. Зависимость соотношения абсолютных показателей некоторых сторон обмена веществ эмбрионов лососевых рыб от условий освещения.

По оси абсцисс — условия освещения.

~~аналогичным показателям в обычных условиях развития ор-~~  
ганизмов. Изменения исследуемых величин коэффициентов со-  
ставляли от 8 до 22%.

Полученные фактические материалы показали, что исследо-  
ванные количественные соотношения пластического и функцио-  
нального обмена между собою и с величинами энергии ассими-  
лированной пищи достаточно стабильны в благоприятных усло-  
виях развития организмов. При отклонении условий развития  
от благоприятного интервала возникающие изменения в функ-  
циональном состоянии организмов хорошо прослеживаются по  
уменьшению величин  $P/A$  и  $P/R$  и увеличению показателей  
 $R/A$ . Все это свидетельствует, что количественные соотношения  
величин пластического и функционального обмена между собою  
и с трансформированной энергией ассимилированной пищи хо-  
рошо отражают функциональное состояние организмов и могут  
быть использованы в качестве биологических тестов при воз-  
действии неблагоприятных условий среды.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ МЕТОДОМ ВЫЯВЛЕНИЯ У НИХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ СООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ НЕКОТОРЫМИ ПРОЦЕССАМИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ**

Осуществление природоохранных мероприятий может быть эффективным при наличии совершенных методов выявления любых нарушений окружающей среды. Одним из таких методов является биологическое тестирование функционального состояния организмов. В качестве биотестов применяются скорость роста, выживаемость, интенсивность питания и размножения, потребление кислорода и так далее. Применение названных показателей состояния организмов в качестве биотестов, хотя и позволяет судить о состоянии среды, но только лишь по одностороннему исследованию определенной функции, отражающей какую-то одну сторону процессов жизнедеятельности системы. Это может приводить к некоторому завышению содержания токсических веществ в водной среде. Поэтому целесообразно изыскать такой тест, который бы в максимальной степени интегрировал в себе общее функциональное состояние организмов. В качестве такого биотеста предлагается использовать количественные соотношения различных сторон процессов обмена веществ, отражающие практически все стороны жизнедеятельности организмов — развитие, рост и воспроизводство.

Сущность предлагаемого метода заключается в определении количественных соотношений между абсолютными показателями использования трансформированной энергии пищи на пластический ( $P$ , дж) и функциональный ( $K$ , дж) обмен (коэффициент  $P/R$ ), а также между абсолютными величинами пластического и функционального обмена с ассимилированной энергией ( $A$ , дж) пищи (коэффициенты  $P/A$  и  $R/A$ ).

Абсолютные показатели пластического обмена рассчитываются по разности содержания общей энергии в теле исследуемых организмов до начала ( $P_0$ , дж) и после окончания ( $P_1$ , дж) опытов ( $P_1$ , дж —  $P_0$ , дж). В зависимости от возраста рыб рекомендуется продолжительность опытов не сокращать менее 10–30 сут. Все опытные работы обычно проводятся в стеклянных аквариумах с проточной или часто сменяемой водой. Объемы аквариумов определяются размерами опытных организмов.

должно участвовать не менее 10 организмов. Опыты проводятся одновременно в трехкратной повторности. Содержание общей энергии в теле организмов определяется путем их прямого сжигания в калориметре или рассчитывается по биохимическому составу подопытных животных. Известно, что при сгорании 1 г белка выделяется 18,9 кдж энергии, при сгорании 1 г жира — 39,0 кдж и 1 г углеводов — 17,6 кдж энергии. Достаточно достоверные результаты могут быть получены при расчете содержания общей энергии по сухому весу исследуемых организмов (высушивание проводится при температуре около 80°С до постоянного веса). Для выполнения расчетов принимается, что при сгорании 1 г сухого вещества выделяется 20,95 кдж энергии.

Абсолютные показатели функционального обмена рассчитываются по средним величинам потребления кислорода за время опытов, умноженным на оксикалорийный коэффициент 14,08. Наиболее достоверные результаты дает определение потребления кислорода исследуемыми организмами с помощью метода проточной воды [1, 2]. При определении интенсивности потребления кислорода методом замкнутых сосудов необходимо вводить дополнительные коэффициенты, величины которых для сиговых и лососевых рыб колеблются в пределах 1,65—1,85. Изменение интенсивности потребления кислорода любым методом должно проводиться не менее 3 раз за период опыта — в начале, середине и конце опыта. Одновременно следует проводить не менее 10 измерений, что позволит рассчитать возможные ошибки и получить достоверные результаты. Для расчетов используются только средние результаты всех измерений интенсивности потребления кислорода. Опыты проводятся в сходных для каждого вида рыб условиях. Расчет интенсивности потребления кислорода проводится по следующей формуле

$$R = O_2, \text{ мг/г — час} \times 337,9 \text{ п,}$$

где  $R$  — интенсивность функционального обмена, кдж,  $O_2$  — средняя интенсивность потребления кислорода за время опыта при естественной температуре воды, мг/г·ч,  $p$  — продолжительность опытов по определению функционального обмена, сут, коэффициент 337,9 равен произведению оксикалорийного коэффициента (14,08) на количество часов в сутках (24).

Величина ассимилированной энергии пищи с достаточной степенью точности может быть определена как сумма абсолютных показателей пластического и функционального обмена ( $A = P + R$ ). Более достоверно величина энергии ассимилированной пищи рассчитывается по разности между энергией потребленной пищи и энергией выделенной с экскрементами  $З$ .

Количественное соотношение  $P/A$  показывает, какая часть энергии ассимилированной пищи используется на пластический обмен. При данном способе расчета не учитывается часть энер-

гии (до 1%), отторгаемая при жизни организмов со слизью и другими секретами. Соотношение  $R/A$  обозначает количество энергии ассимилированной пищи, используемое на функциональный обмен. И наконец, количественное соотношение  $P/R$  свидетельствует об отношении величин пластического и функционального обмена между собой, т. е. показывает, какое количество энергии используется на пластический обмен относительно величины функционального обмена.

При применении предлагаемого метода следует исходить, что в благоприятных условиях развития организмов величины  $P/A$  и  $P/R$  имеют максимальные, а величины  $R/A$  минимальные, но достаточно стабильные показатели. При ухудшении условий развития в любую сторону от благоприятного интервала проявляющиеся изменения в функциональном состоянии исследуемых организмов хорошо прослеживаются по отклонениям выявленных количественных соотношений процессов обмена веществ — показатели  $P/A$  и  $P/R$  уменьшаются, а  $R/A$  — увеличиваются. Отклонение величин исследованных соотношений от стабильного уровня более чем на 20% уже свидетельствует о неблагоприятности условий развития организмов. Более значительные изменения количественных соотношений процессов обмена веществ могут привести к необратимым явлениям. При приближении к такому состоянию организмов обычно начинается параллельное уменьшение величин всех названных коэффициентов ( $P/A$ ,  $R/A$ ,  $P/R$ ).

Предлагаемый метод может найти применение при определении качества рыбоводной продукции, условий развития выращиваемых на рыбоводных заводах ценных видов рыб, а также предельно-допустимых концентраций токсических веществ в водоемах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Рыжков Л. П. Зависимость газообмена у молоди севанских форелей от температуры среды — Изв. АН Армянской ССР. Биол. науки, 1960, т. 13, № 2, с. 41—50.
2. Рыжков Л. П. Установка для измерения интенсивности газообмена у водных организмов при токсикологических исследованиях. — В кн.: Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971, с. 35—40.
3. Рыжков Л. П. Морфофизиологические закономерности и трансформация вещества и энергии в раннем онтогенезе пресноводных лососевых рыб. Петрозаводск, 1976, 290 с.



П. И. Побегалло, Т. Г. Новосадова

### **ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕСТОВ ДЛЯ ОПЕРАТИВНОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ОЧИЩАЕМЫХ И СБРАСЫВАЕМЫХ СТОЧНЫХ ВОД**

Одной из основных задач по охране окружающей среды являются мероприятия по предупреждению загрязнения водоемов отходами производства, поступающими с промышленными сточными водами.

Первостепенная роль в решении этого вопроса отводится организации на промпредприятиях замкнутых систем водоснабжения с одновременной утилизацией из сточных вод ценных продуктов.

Однако для этого, по всей видимости, потребуется не одно десятилетие, так как перестройка на существующих предприятиях всех систем водоснабжения и канализации потребует больших денежных затрат.

Не менее важной задачей является ограничение сброса в водоемы загрязнений, поступающих со сточными водами, которые приносят им непоправимый вред.

Как в первом случае, при возвращении сточных вод в оборотные системы предприятий, так и во втором — при сбросе их в водоемы, решающее значение имеет подготовка сточных вод в процессе их очистки от вредных веществ на различных очистных сооружениях. Существующие в настоящее время способы и сооружения по очистке сточных вод можно подразделить на механические, химические и биологические. Набор очистных сооружений, их качественный и количественный состав, определяется составом, химическими, физическими и др. свойствами сточных вод. Наиболее часто используются сооружения предварительной механической очистки (решетки, дробилки, песколовки, нефтеловушки), а также сооружения доочистки — отстойники и фильтры.

В настоящее время необходимая глубина очистки контролируется в основном по химическим показателям, таким как БПК, ХПК, взвешенные вещества, азот, а также специфические продукты, так называемые лимитирующие вещества, на которые имеются предельно-допустимые концентрации (ПДК). При этом, как правило, остаются неучтенными многие исходные токсикан-

ты и промежуточные продукты распада, образующиеся в процессе биохимического окисления, а также продукты метаболизма, которые в большинстве случаев могут быть более токсичны, чем исходные загрязнения. Поэтому в настоящее время признается, что одними химическими показателями нельзя определить истинное качество очищенных сточных вод и, что является особенно важным, установить тот предел, до которого следует доочищать сточные воды для их использования в оборотных системах, а также при сбросе в водоемы.

Исследованиями института ВОДГЕО установлено, что даже после полной биологической очистки сточных вод разных отраслей промышленности (с доведением БПК<sub>полн.</sub> до 5—10 мгО<sub>2</sub>/л) очищенная жидкость остается сильно токсичной для гидробионтов. Для ее обезвреживания требуется дополнительная доочистка или разбавление в водоеме не менее чем в 100—200 раз, что практически не может быть обеспечено.

Оценить степень токсичности очищенной сточной воды только по химическим показателям не представляется возможным из-за наличия в стоках многих и часто неизвестных веществ, обуславливающих токсичность сточных вод. При этом многие токсические вещества могут оказывать вредное влияние в малых концентрациях, не увеличивая практически БПК и ХПК.

Даже определение в очищенной воде остаточного содержания тех веществ, на которые имеются ПДК, не может полностью характеризовать сточную жидкость с токсикологических позиций. В качестве примера приведем результаты токсикологического исследования сточной воды химкомбината, проведенные ВНИИ ВОДГЕО в 1975 г.

Сточная вода, взятая после полной биохимической очистки в аэротенках, выдерживалась (инкубировалась) в лабораторных условиях в темноте при 18°С для снятия остаточной токсичности. После того как процесс детоксикации закончился, и вода в перазбавленном состоянии считалась безвредной для дафний (30-суточные эксперименты на 2—4-дневных рачках, показатели токсичности — поведение, выживаемость, размножение, плодовитость и качество потомства), по данным химического анализа, в стоке присутствовала медь в количестве 0,5 мг Cu<sup>2+</sup>/л. Параллельно с исследованиями токсичности стока изучалось действие на дафний химически чистой сернистой меди. Установлено, что в 48-часовом эксперименте ЛК<sub>100</sub> составляет 0,2 мг Cu<sup>2+</sup>/л, пороговой же в 30-суточном опыте является 0,01 мг/л. Как известно, сейчас рыбохозяйственная ПДК меди составляет 0,001 мг/л (дополнительный перечень ПДК от 16.V.1975). Медь же в составе сточной жидкости, будучи в ионной форме, безвредна для дафний в концентрации 0,5 мг/л, что в 50 раз выше ПДК и в 2,5 раза больше, чем ЛК<sub>100</sub> (48 ч).

Следовательно, в данном случае имеет место детоксицирующее действие других веществ — оставшихся органических

ствие токсичности стока с содержанием меди 0,5 мг/л — следствие антагонизма компонентов сточной жидкости, что не может зарегистрировать ни один химический анализ.

В настоящее время получило общее признание то положение, что для объективного установления истинного качества очищенных сточных вод, отвечающего «Правилам спуска сточных вод в водоемы», необходимо применять интегрирующий воднотоксикологический показатель, т. е. методы биотестирования.

Биотесты, разработанные в Советском Союзе и за рубежом, весьма многочисленны. Но все они, как правило, служат для определения действия на гидробионты отдельных токсикантов. Биотестированию же сточных вод имеет свои особенности ввиду сложности, непостоянства состава, сильно меняющихся во времени физико-химических показателей, взаимного влияния компонентов стока, совместного влияния их на гидробионты, постоянно развивающегося процесса детоксикации. Поэтому предлагаемые методы токсикологического контроля качества сточных вод должны быть переработаны с учетом этих особенностей, апробированы на одних и тех же промстоках в одинаковых условиях для обеспечения сопоставимости результатов.

Институт ВОДГЕО, разрабатывающий схемы очистки сточных вод и контролирующий глубину их очистки по химическим показателям, использует и биотесты, которые дополняют химическую характеристику и дают однозначный ответ о токсичности действия сложного и подчас трудноанализируемого комплекса загрязнителей.

Многие тест-объекты, используемые при установлении ПДК, несмотря на их большую чувствительность к различным загрязнениям, не могут быть использованы для биотестирования сточных вод в первую очередь из-за невозможности их культивирования в течение всего года. Другие организмы, хотя и сравнительно легко культивируются, мало чувствительны к токсикантам. В то же время, для определения токсичности сточных вод тест-объекты должны обладать следующими основными качествами: высокой чувствительностью к различным токсическим агентам; легко культивироваться в лабораторных условиях круглогодично; иметь короткий жизненный цикл, должна быть возможность использовать их не только в коротких опытах (2—4 сут), но также и в хронических исследованиях (до 30 сут). Для работы не должно требоваться сложного лабораторного оборудования.

Результаты многолетней практики работы по определению в институте ВОДГЕО токсичности промышленных сточных вод и отдельных веществ согласуются с мнением Н. С. Строганова (МГУ), что тест на дафнии magna является одним из самых лучших и с успехом может применяться и для установления

острой токсичности, и в хронических опытах для установления безвредных концентраций очищенной сточной воды перед сбросом ее в водоем.

В настоящее время существует мнение, что для установления токсичности сточных вод многочисленных отраслей промышленности одного тест-организма недостаточно. Следует иметь 3—4 теста на организмах разного систематического положения. С учетом этого требования в институте ВОДГЕО в 1979—1980 гг. продолжалась работа по подбору и освоению новых биотестов, которые могут быть использованы наравне с дафнией magna для более глубокого изучения токсичности сточных вод как в процессе разработки методов очистки сточных вод, так и перед сбросом их в водоем.

Причем предпочтение при выборе тест-объектов мы отдавали организмам с коротким жизненным циклом, либо использовали отдельные, ранние наиболее чувствительные стадии развития гидробионтов.

При этом в качестве основных критериев токсичности в остром опыте использовали поведенческие реакции и выживаемость.

Не останавливаясь на особенностях культивирования выбранных тестовых организмов, обратимся к некоторым результатам исследования токсичности очищенных сточных вод.

Так, например, при изучении влияния стоков ряда нефтеперерабатывающих заводов на гидробионты установлено, что наибольшей чувствительностью обладают дафнии и эмбрионы большого прудовика, наименьшей — взрослые прудовики.

При действии сточных вод одного из автомобильных заводов чувствительность гидробионтов убывает в следующем порядке: дафнии, личинки артемии, хлорелла, сценедесмус, гидра.

Исследования действия стоков спиртово-дрожжевого производства также показали, что наибольшей чувствительностью обладают дафнии и эмбрионы прудовика.

В течение ряда лет ВОДГЕО в своих токсикологических экспериментах в качестве тест-объектов использовал рыб из природных водоемов и аквариумных: молодь форели, верховку, окуня, гуппи. Несмотря на весьма высокую чувствительность трех первых видов рыб к воздействию токсических агентов, считаем их неподходящими тест-объектами для проведения производственного контроля токсичности сточных вод: эти рыбы требуют условий, создание которых не всегда может быть обеспечено — живой корм, пониженная температура, высокое содержание кислорода в воде и др.

В настоящее время остро стоит вопрос о биотестировании на производстве, как о быстром, непрерывном, круглогодичном и относительно недорогом методе контроля качества сточных вод.

В связи с этим представляет интерес использование аквари-

группы рыб — дафнии, карпы, гуппи — наименее чувствительный тест-объект по сравнению с дафниями и прудовиками [1]. Однако простота культивирования круглый год ставит этих рыб в ряд удобных тест-объектов.

Специалисты стран — участниц СЭВ, согласно Унифицированным методам, используют гуппи в водно-токсикологических исследованиях. Многие западные государства, такие как Франция, Канада, применяют биотест с гуппи при изучении токсичности отдельных веществ и в отдельных случаях сточных вод. Исследователи относят гуппи в разряд среднечувствительных организмов.

В институте ВОДГЕО гуппи и дафнии используются как основные тестовые организмы при определении токсичности сточных вод.

В заключение целесообразно отметить: практика института ВОДГЕО показывает, что методы биологического контроля качества сточных вод можно и следует использовать не только по окончании очистки, но и в процессе ее, не подменяя, но дополняя химические анализы. Считаю рациональным внедрение биотестирования в практику контроля образования сточных вод от отдельных производств, цехов, с целью выделения наиболее токсичных компонентов и направления их на локальное обезвреживание, что в значительной мере удешевит очистку общего стока и будет способствовать усилению контроля и охраны водоемов от загрязнения сточными водами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Строганов Н. С., Путинцев А. И., Исакова Е. Ф., Шигин В. И. О применении экспресс-метода оценки острой токсичности промышленных стоков в экспедиционных условиях. — Изв. НИИ оз. речн. рыб. хоз-ва, 1974, т. 98, с. 87—90.

**К ВОПРОСУ ОБ УНИФИКАЦИИ  
МЕТОДОВ ПРОВЕДЕНИЯ  
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ  
В ЦЕЛЯХ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**

В настоящее время все большее значение для оценки качества сточных вод, а в некоторых случаях и природных, приобретает биотестирование. В литературе накоплены многочисленные данные по оценке токсичности как сточных вод, так и отдельных загрязняющих веществ на разных тест-объектах. Однако сравнение всех этих данных значительно затруднено. Такое положение возникает в результате ряда причин.

Биотестирование проводится на живых организмах, отличающихся по слоям биологии, физиологии, требованиям к среде, чувствительности к разным токсикантам и многим другим параметрам.

Даже при культивировании одного и того же тест-объекта по общепринятой методике устойчивость организмов к токсическим веществам широко варьирует. Такое положение может возникнуть, например, при культивировании организмов в среде, приготовленной на воде разной степени жесткости. По данным Мюллера [3, 4], изменение щелочности и жесткости среды влияет на степень токсичности загрязняющих веществ. Он считает непригодной для опытов мягкую воду. По его мнению, важную роль играет соотношение в воде ионов Са и Mg, равное 4:1. При увеличении Са уменьшается токсичность  $K_2C_2O_7$  для *Daphnia magna*, а увеличение Mg приводит к увеличению токсичности данного вещества.

Не способствует получению сравнимых результатов проведение токсикологических исследований с разновозрастными группами организмов.

Например, при исследовании влияния однозамещенного фосфата аммония на выживаемость *D. magna* мы в опыт брали разновозрастных рачков. Результаты показывают, что устойчивость организмов к данному веществу с возрастом увеличивается:

Стадии развития	LC <sub>50</sub> (24 ч), мг/л
Между 1-й и 2-й линькой	1700
Между 3-й и 4-й линькой	1500
После 5-й линьки	1122

часто используют различные критерии токсичности. Помимо выживаемости, это поведенческие, физиологические, биофизические показатели. Суждения о токсичности одного и того же вещества по разным критериям получаются диаметрально противоположными. При исследовании действия хлорофоса и фтористого аммония на элодею по различным критериям токсичности (изменение ионной проницаемости тканей элодеи и скорость прироста элодеи) получились следующие результаты: по данным Иркутского НИИ биологии фтористый аммоний оказался на порядок токсичнее хлорофоса, а по данным МГУ, хлорофос более токсичен, чем фтористый аммоний.

Отдельные исследователи повышают чувствительность тест-объектов, нарушая физиологическое состояние организмов (например, голоданием, обработкой ультразвуком и т. д.), или выводят чувствительные штаммы организмов, неадекватно реагирующие на воздействие в сравнении с исходным организмом. Это тоже мало способствует получению результатов, которые можно было бы сравнить и которые были бы близки к откликам на воздействие, наблюдаемым в природе.

Так, мезофильный штамм *Chlorella perinoidosa* оказался весьма устойчив к хлорофосу, хотя для природных популяций и лабораторных культур *Ch. perinoidosa* и *Ch. vulgaris* хлорофос весьма токсичен. Для рыбохозяйственных водоемов ПДК данного вещества равна нулю (полное отсутствие).

Большое значение на результаты биотестирования оказывают вопросы, связанные с техникой введения токсических веществ в опытные растворы. Особенно важно оговорить вопрос о введении практически нерастворимых в воде веществ, токсичность которых необходимо оценить. Чаще всего такие вещества растворяют в органических растворителях, которые в той или иной степени сами оказываются токсичными для организмов. Например, 3%-ный диметилсульфоксид, рекомендованный для растворения водонерастворимых веществ, при апробации ряда веществ оказался токсичным для дафний уже в концентрации, равной 1,5%. Кроме того, добавки органических растворителей необходимо учитывать при проведении эксперимента либо путем введения их в контрольные пробы, либо учитывая в виде поправки в конечном результате.

Важное значение для биотестирования промышленных стоков, иногда и отдельных загрязняющих веществ, имеет время проведения опытов. Долгосрочные исследования (свыше 3 сут) здесь не рентабельны. В соответствии с прикладным характером биотестирования время проведения опытов, на наш взгляд, необходимо ограничить 24 ч. По возможности нужно выбирать методы или критерии токсичности, которые по своей чувствительности дают возможность получить результаты за еще более короткий срок.

В большинстве западноевропейских стран (ФРГ, США, Франция, Международный комитет по стандартизации) [1, 2, 4] биотесты сравнительно просты (дафния, артемия, рыбы), методики для проведения биотестирования стандартизованы. Время проведения опытов ограничено, как правило, 48 ч. Данные унифицированные методы биотестирования мы попытались применить в своих токсикологических работах и пришли к выводу, что перенести без изменения эти методики применительно к нашим условиям не всегда возможно. Тем не менее, взяв их за основу и модифицировав некоторые положения, можно использовать в токсикологических исследованиях и получать стабильные результаты.

Весьма важен также вопрос о стандартном веществе (модельный токсикант). Наиболее часто используют для этих целей  $\text{CuSO}_4$  и  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . Опыт работы с этими веществами показал, что в зависимости от состава среды  $\text{CuSO}_4$  может образовывать нерастворимые гидроокиси, выпадающие в осадок.  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в некоторых случаях слабо токсичен, и его иррационально брать за единицу токсичности. Скорее всего универсального вещества предложить не удастся, но можно предусмотреть несколько веществ, которые могут быть приняты в качестве модельного токсиканта в соответствии с условиями биотестирования.

Таким образом, вышеизложенные положения, а также проведенная в 1979 г. апробация некоторых веществ целым рядом токсикологических лабораторий, выявили слабые стороны биотестирования и показали, что в настоящее время остро назрел вопрос об упорядочении и стандартизации условий проведения токсикологических исследований с целью биотестирования, которые существенно дополняют химико-аналитический контроль за качеством сточных вод на производстве.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bioassay procedures for the ocean disposal permit program. EPA. Gulf Breeze, Florida, 1976. 80 p.
2. Détermination de l'inhibition de la mobilité *Daphnia magna* (Straus Crustacés Cladocera). Paris, 1974. 6 p.
3. Müller H. G. Acute toxicity of potassium bichromate to *D. magna* as a function of the water quality. — Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 1980, vol. 25, N 1, p. 113—117.
4. Müller H. G. Experiences with test systems using *D. magna* — Ecotoxicol. and environ. Safety, 1980. vol. 4, N 1, p. 21—25.



Ю. А. Щербанов, С. Г. Котляр

### **РОЛЬ БИОИНДИКАЦИИ В ОЦЕНКЕ СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОДОЕМОВ ПРИ НАТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И ЛАБОРАТОРНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ**

Изучение вопросов загрязнения и самоочищения водных объектов имеет свою длительную историю. В настоящее время условно можно выделить несколько направлений в изучении сложнейших взаимодействий загрязняющих веществ со всеми компонентами водных экосистем: гидродинамическое, гидробиологическое, гидрохимическое и комплексное, при котором решение как общетеоретических, так и практических задач, объединенных в понятие «проблема чистой воды», наиболее результативно.

Это подтверждается результатами, полученными при проведении натурных исследований и лабораторного моделирования процессов в плане экспериментального обоснования предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ [1, 3].

Общие вопросы, с которыми приходится сталкиваться при изучении загрязнения водоемов, состоят в идентификации загрязняющих компонентов, оценке их индивидуального или комбинированного влияния на составляющие водных биоценозов и оконтуривании загрязненных участков.

При изучении состояния загрязнения водоемов используется ряд гидрохимических и гидробиологических показателей, характеризующих качество воды, факторы, его формирующие, состояние биоценозов различных участков водоема.

Одним из наиболее употребительных способов оценки степени загрязненности водоемов по химическим показателям следует считать сравнение концентраций загрязняющих веществ в водном объекте с их предельно допустимыми концентрациями.

Но такой подход не всегда дает истинное представление о токсичности среды и степени ее загрязненности. В водоеме приходится иметь дело с действием множества веществ, находящихся на разных уровнях по отношению к существующим нормативам. Отсутствие аналитических методов определения в воде многих сложных веществ, даже с установленными ПДК, отсутствие информации о комплексном их влиянии (с учетом антагонизма или синергизма) на составляющие водных биоце-

позов затрудняют, а подчас и делают невозможной оценку степени загрязненности водных объектов только по уровню предельно допустимых концентраций.

В условиях значительного разбавления такого рода оценки чрезвычайно затруднены. Вследствие этого применение в оценке степени загрязненности наряду с превышением ПДК загрязняющих веществ, общих, интегральных показателей состава воды оказалось в достаточной мере результативным. Составленная С. М. Драчевым с сотрудниками [2] схема оценки класса чистоты вод оказалась применима не только для малых рек, как предлагалось, но и для водотоков с большими расходами воды. Возможность такого применения заключается в том, что в любых водных объектах общие интегральные показатели (в данном случае некоторые биофильные компоненты) и их изменения лежат в основе тех сдвигов, которые характеризуют изменения биогеохимических циклов элементов в биосфере. В качестве исходных данных для выведения суммарных коэффициентов загрязнения использовались наиболее интегральные и изменчивые показатели: содержание азота аммонийных соединений, нефтепродуктов и величины пятисуточного биохимического потребления кислорода. Метод суммарных коэффициентов позволяет оценить степень загрязнения различных участков водоема при множественности химических показателей, проследить сезонность в распределении загрязнения по акватории водоема.

Одним из бесспорных достоинств в подобной оценке класса чистоты вод является применение гидробиологической индикации: определенному классу чистоты вод соответствует определенная оценка в категориях сапробиости по микробиологическим (сапрофитная микрофлора и общее количество микроорганизмов) и гидробиологическим показателям. Интересно отметить, что при проведении натурных исследований полного совпадения оценок класса чистоты вод нами не отмечалось.

Оценка по химическим показателям, с выделением 5 классов чистоты вод (очень чистые, чистые, умеренно загрязненные, загрязненные, грязные), сопоставлялась с оценкой по категориям сапробиости микроорганизмов, зоопланктона, зообентоса. Оценка степени загрязненности реки по химическим показателям в местах максимального загрязнения в речном режиме (1966—1967 гг.) совпадала с оценкой по общему количеству бактерий, характеризующим водоем в целом как олигосапробный с участками  $\beta$ -мезосапробного типа. По количеству сапрофитной микрофлоры степень загрязненности водоема выше:  $\beta$ -мезосапробная, с очагами  $\alpha$ - и полисапробного типа.

Совпадение оценок по химическим показателям в сопоставлении с микробиологическими наблюдалось в 20% случаев, с гидробиологическими — в 50—70% случаев по организмам зоопланктона и зообентоса соответственно.

Нами установлено, что в местах наибольшего влияния сточ-

ных вод химические показатели характеризуют большую степень загрязненности по сравнению с оценкой по категориям сапробиости организмов зоопланктона и зообентоса. В то же время гидробиологические показатели констатируют слабое или отрицательное влияние загрязненности на значительном удалении от мест поступления в водоем. Особенно это относится к зообентосу. И наоборот, тогда, когда химические показатели констатируют слабое или отрицательное влияние загрязненности на данном участке водоема, прослеживаются значительные изменения со стороны гидробиологических показателей, в частности зообентоса.

В условиях зарегулирования речного стока полное совпадение оценок по химическим показателям в сопоставлении с биологическими отмечалось в 40% случаев по микробиологическим показателям и в 30% случаев по индикаторным организмам зоопланктона и зообентоса.

В условиях водохранилища увеличилась степень совпадения оценок по химическим и микробиологическим показателям с 20 до 40% случаев и уменьшилась по индикаторным организмам зоопланктона и зообентоса с 50—70 до 30%, но в водоеме увеличились площади со слабой степенью загрязненности, где гидробиологическая индикация наиболее информативна.

Анализ чувствительности различных тест-объектов при экспериментальном обосновании ПДК вредных веществ в воде рыбохозяйственных водоемов выявил следующее (см. таблицу): из 33 изученных токсических веществ в 60% случаев наиболее чувствительными оказались процессы минерализации органических веществ по динамике биохимического потребления кислорода (БПК) и сапрофитная микрофлора. Примерно в том же соотношении отмечалось совпадение оценок по химическим и микробиологическим показателям в условиях зарегулированного речного стока.

Рыбы и различные стадии ее развития (икра, предличинки, личинки и молодь) оказались наиболее чувствительными в 30% случаев.

Использование дафний *D. magna* St., *D. longispina* в качестве тест-объекта показало, что они оказались наиболее чувствительными лишь в 10% случаев.

Интересно отметить, что хирономиды *Chironomus dorsalis* ни в одном из 33 рассмотренных случаев не оказались на первом месте по чувствительности к испытуемым веществам. В то же время при натурных исследованиях индикаторные организмы зообентоса констатировали отрицательное влияние загрязнения на значительно большем расстоянии по сравнению с химическими, а также с оценкой по другим гидробиологическим показателям.

Большая чувствительность гидробиологических тестов в натурных исследованиях совершенно очевидна, поскольку исполь-

зуемые индексы видового разнообразия позволяют характеризовать сформировавшийся биоценоз в целом. При этом различная чувствительность отдельных видов организмов к загрязнению приводит к изменению индексов видового разнообразия, наиболее полно характеризующая возможные изменения (стимуляцию, торможение, гибель).

**Наиболее чувствительные тест-объекты  
при экспериментальном обосновании ПДК**

Наименование веществ	Концентрация, мг/л	Наиболее чувствительный тест-объект
Борная кислота	0,1	Микрофлора
Тетраборат натрия	0,05	
Закрепитель ДЦМ	0,1	
Закрепитель ДЦУ	0,5	
Карбамол	0,1	
Метазин	0,1	
ПВАЭ	0,1	
Препарат ОС-20	0,01	
Стеарокс	0,01	
Трилон Б	0,5	
Хромолан	0,1	БПК, микрофлора
Дисольван 4411—4422	1,0	
Метанол	0,1	
Моноэтаноламин	0,1	
НЧК	0,05	
Препарат АМ	1,0	
Резорцин	0,1	
Фосфор элементарный	0,0	
Фосфор треххлористый	0,1	
Фосфор пятихлористый	0,1	
Анилин	0,2	Дафнии
Азербайджан «10»	0,42	
ГКЖ-94	0,0	Рыбы в онтогенезе
Аминная соль 2,4-Д	0,1	
Натриевая соль 2,4-Д	0,62	
Бутиловый эфир	0,004	
Нитрофен	0,09	
Анилин серноокислый	0,1	
Алкамон ОС-2	0,012	
Выравниватель А	0,1	
Диспергатор НФ	0,25	
ИКБ-4 с ОП-7	0,02	
Каптакс	0,5	

Анализируя вышесказанное, можно сказать, что сопоставление оценок по химическим и гидробиологическим показателям (зообентос) указывает на большую информативность последних при натурных исследованиях.

В условиях лабораторного моделирования (в хроническом опыте) использование дафний и особенно хирономид в качестве тест-объекта показало их недостаточную чувствительность к

изученным веществам, что ставит вопрос о необходимости привлечения дополнительных показателей для оценки влияния вредных веществ.

Наиболее чувствительными к влиянию изученных веществ оказались процессы минерализации органического вещества (60%) и рыбы в онтогенезе (30%), что обусловлено, очевидно, принадлежностью большинства из изученных веществ к легко минерализуемым и применением достаточно чувствительных, разнообразных и надежных методов при проводимых микробиологических, химических и ихтиотоксикологических исследованиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние вредных веществ на водную среду и водные организмы.— Тр. Саратовск. отд. ГосНИОРХ, т. 13, 1975. 235 с.
2. Драчев С. М. Борьба с загрязнением рек, озер и водохранилищ промышленными и бытовыми стоками. М.—Л., 1964. 274 с.
3. Качество воды и биологическая продуктивность Саратовского и Волгоградского водохранилищ.— Тр. Саратовск. отд. ГосНИОРХ, т. 16. 1978. 117 с.

## ПРОБЛЕМА РАЗРАБОТКИ ПРИБОРНЫХ МЕТОДОВ БИОИНДИКАЦИИ КАЧЕСТВА СТОЧНЫХ ВОД

В настоящее время общепризнано, что наиболее интегральная оценка качества сточных вод возможна только на основании информации о действии загрязняющих веществ на биологические процессы в водоемах и на отдельные виды гидробионтов. Использование в качестве решающего биологического критерия нарушений в функциональных процессах в организме животных способствует повышению чувствительности и оперативности методов биоконтроля качества вод [2]. Современный уровень науки и техники позволяет осуществлять регистрацию многих показателей функционального состояния у биообъектов без нарушения их целостности при сохранении нормальной жизнедеятельности последних.

Процессы жизнедеятельности гидробионтов сопровождаются разнообразными физико-химическими явлениями: электромагнитными, оптическими, механоакустическими, химическими.

В современной технике имеются разнообразные датчики-преобразователи, позволяющие преобразовывать биосигнал любой природы в электрический сигнал. Преобразовательные, усилительные, уравнивающие и регистрирующие устройства в существующих в настоящее время измерительных системах различного назначения не имеют принципиальных отличий, кроме пределов измерений и характеристик вспомогательных узлов. Поэтому вопрос об автоматизации процесса измерений параметров живого организма технически вполне разрешим.

Успешное применение чувствительных, надежных и оперативных методов биоиндикации с использованием технических устройств зависит от правильного выбора датчиков, отводящих биосигналы, генерируемые тест-объектами. Основные требования, предъявляемые к таким датчикам, заключаются в том, что они должны соответствовать особенностям показателя, регистрируемого у гидробионтов, и условиям, в которых это измерение производится. Знание особенностей таких показателей и их связи с процессами жизнедеятельности организма как в нормальных условиях, так и при антропогенном воздействии явля-

ется основой для успешного использования данных методов в практике биоиндикации качества вод.

В настоящее время наибольшее распространение получили приборы для регистрации биоэлектрической активности, генерируемой живым организмом. По биопотенциалам анализируют активность и состояние мышечного и дыхательного аппарата, органов кровообращения, центральной нервной системы и других органов, тканей и структур организма.

Отведение биопотенциалов осуществляется, как правило, при помощи контактных, фиксируемых на поверхности тела или же имплантируемых в ткани животных датчиков. Сложности использования для биотестирования качества вод контактных, разработанных для наземных животных, датчиков заключаются в трудности их закрепления на теле водных животных, покрытых слизистой оболочкой и особыми правилами их эксплуатации в водной (электропроводной) среде. Недостатком имплантируемых электродов является травмирование гидробионтов в процессе оперативного вмешательства и длительного периода нахождения животных в состоянии стресса. Так, судя по результатам наших работ, вживление электродов в мышечные ткани рыб вызывает у них состояние стресса, продолжающееся до 3 сут, что значительно увеличивает длительность исследований и не отвечает одному из требований биоиндикации качества вод — оперативности. Бесконтактные датчики, предложенные для исследований на водных животных [5, 6], позволяют проводить тестирование в условиях, близких к естественным. С помощью их измеряется разность потенциалов между двумя точками проводящей среды, окружающей водных животных. В качестве датчиков используют металлические электроды, подбираемые соответственно размерам тела животных. Таким способом отводится электрохимический потенциал — «потенциал течения», генерируемый движениями животных или же активностью органов, осуществляющих вентиляцию жабр. Запись таких биосигналов возможна даже у таких небольших по размерам животных, как рачок дафния magna. Измеренная нами величина такого биосигнала, обусловленного движениями грудных ножек у вышеуказанного тест-объекта, равна 20—30 мкв. Усиливающие приборы для исследований на этих животных соответственно должны иметь больший коэффициент усиления и низкий уровень шумов.

Существенные недостатки подобных способов регистрации заключаются в сложности интегрирования, а соответственно и автоматизации процесса обработки информации в виду значительного варьирования амплитуды полезного сигнала. Последняя зависит от месторасположения биообъектов относительно отводящих электродов и скорости тока воды или исследуемых растворов.

Этот способ отведения биосигналов применим для оценки

качества вод с небольшой минерализацией. Увеличенная минерализация, характерная для сточных вод многих видов производства, снижает эффективность данного метода регистрации биосигналов вследствие шунтирующих эффекта более электропроводных промстоков и снижения его амплитуды полезного сигнала.

Можно полагать, что успешное использование в исследованиях по биоконтролю вод методов регистрации биоэлектрической активности организма водных животных возможно путем разработки новых типов контактных, неимплантируемых в тело водных животных датчиков, позволяющих осуществлять отведение биосигналов у животных с частично ограниченной двигательной активностью. В этом плане весьма многообещающими могут быть разрабатываемые в настоящее время приборы для регистрации электрических полей по магнитной составляющей. Этот способ основан на измерении магнитного поля вокруг животных посредством двух катушек, включенных навстречу друг другу [4]. Он позволяет проводить, к примеру, регистрацию магнитокардиограмм у животных, находящихся в воде с любой степенью минерализации, так как напряженность магнитного поля, в отличие от электрического, прямо пропорциональна проводимости среды и имеет меньший коэффициент ослабления при удалении от живого объекта.

Широкое распространение в исследованиях на водных животных имеют приборы и устройства, основанные на регистрации оптических явлений, сопутствующих процессам жизнедеятельности водных животных.

Эти устройства применяются для оценки действия загрязняющих веществ на двигательную активность и поведенческие реакции рыб и других животных с непрозрачным телом [3]. У животных с прозрачным телом с помощью оптических приборов оценивается активность некоторых внутренних органов [1]. Опыт наших работ по разработке подобных устройств и их эксплуатации показал, что успешное использование приборов для регистрации оптических явлений у тест-объектов с целью оценки качества сточных вод возможно только после внесения в них ряда технических усовершенствований. Последние должны быть направлены на возможность параллельной регистрации физиологических показателей у нескольких (до 10) особей, дифференциации биосигналов в зависимости от природы их происхождения и их интегрирования при необходимости. Кроме того, важное значение имеет разрешающая способность таких приборов, позволяющая осуществлять регистрацию показателей круглосуточно, без нарушения световых биоритмов у тест-объектов.

В техническое оснащение устройств по биотестированию качества сточных вод целесообразно включить:

1— блоков подготовки, предназначенных для обеспечения



постоянной равномерной подачи промышленных сточных вод с учетом разведения их в определенных пропорциях с чистой водой;

2 — технологических блоков, предназначенных для анализов процессов жизнедеятельности у тест-объектов в условиях их пребывания в сточных водах;

3 — измерительных блоков, предназначенных для усиления биосигналов, отводимых от биообъектов, регистрации, преобразования сигналов, их расшифровки, автоматического анализа с последующей сигнализацией о кондиционных характеристиках промстоков.

Подготовительные и технологические блоки должны предусматривать возможность регулирования и поддержания на заданном уровне температуры, газового состава, скорости тока исследуемых вод, освещенности и других экзогенных помех. С вышеуказанными проблемами, касающимися возможности использования электрографических и оптических устройств для регистрации показателей функционального состояния у водных животных, нам пришлось столкнуться на первом этапе исследований по подготовке исходных данных для разработки автоматизированных систем биоконтроля вод. По разработанным нами техническим заданиям и требованиям в настоящее время осуществляется проектирование и изготовление опытных образцов устройств для биоиндикации сточных вод по данным показателей внешнего дыхания, сердечной деятельности, реотаксиса у рыб, дыхательной активности и частоты дыханий у гаммарид. Несомненно, что на втором этапе опытно-производственных испытаний этих образцов в технологической цепи очистных сооружений предприятий целлюлозно-бумажной промышленности будут вскрыты и другие, не затронутые нами в этом сообщении, проблемы использования приборных методов биоиндикации качества вод.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Колупаев Б. И., Андреев А. А., Самойленко Ю. К. Оптический метод регистрации сердечного ритма у дафний. — Гидробиол. журн., 1977, № 3, с. 119—120.
2. Лукьяненко В. И. Физиолого-биохимические аспекты водной токсикологии — В кн.: Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Т. 1, 1979, с. 49—57.
3. Назиров Л. А., Сухачев В. А., Молявин Ю. М. Автоматический прибор с фотодиодной индикацией для регистрации поведенческих реакций рыб. — В кн.: Эколого-физиологические исследования в природе и эксперименте Фрунзе, 1977, с. 47—48.
4. Cseleowits D. B. Magnetocardiography. — IEE Trans Biomed. Engin., 1979, vol. 26, N 9, p. 497—504.
5. Rommel S. A. A simple method for recoding fish heart and operculum beats without the use of implanted electrodes. — J. Fish Res. Board Canada, 1973, vol. 30, N 5, p. 693—694.
6. Spoor W. A., Neiheisei J. W. and Drummond. An electrode chamber for recording respiratory and other movements of freeswimming animals. — Trans. Amer. Fish. Soc., 1971, vol. 100, p. 22—28.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ ПО ОПТОМОТОРНОЙ РЕАКЦИИ РЫБ

Известно, что наличие в воде токсических веществ в первую очередь влияет на поведенческие реакции гидробионтов [2, 3, 9, 10]. Среди водных животных наиболее сложное и разнообразное поведение свойственно рыбам. Именно у рыб центральная нервная система, организующая поведение, достигает наивысшего развития. Все это делает перспективным использование для целей биотестирования качества водной среды различных методов анализа поведенческих реакций рыб [3].

В настоящей работе представлены результаты исследования влияния ряда широко распространенных загрязняющих водную среду токсических веществ на оптомоторную реакцию рыб — врожденную зрительно обусловленную форму поведения, хорошо выраженную у многих видов рыб.

Для целей наших исследований была разработана специальная оптомоторная установка, конструктивно несколько отличающаяся от установок, описанных В. Р. Протасовым [5] и Д. С. Павловым [4] (рис. 1).

Основным элементом оптомоторной установки является кольцеобразный аквариум с вращающимися вокруг него жестко связанными между собой ширмами (одна с внешней, другая с внутренней стороны). Кольцеобразный аквариум (наружный диаметр 400, внутренний 180, высота 110 мм) устанавливался на подставку, верхняя панель которой была сделана из листа оргстекла, а на дне размещался источник света. Под аквариум обычно помещали подкладку из белого полупрозрачного материала, которая обеспечивала лучшее рассеивание света от источника света и захождение полос ширмы ниже дна аквариума, что особенно важно для более четкого проявления оптомоторной реакции у природных видов рыб. Для полного исключения всех ориентиров в поле зрения рыбы оптомоторная установка сверху и с боков закрывалась цилиндром из плотной темной материи. Над установкой закреплялась телевизионная камера, при помощи которой изображение экспериментального аквариума можно

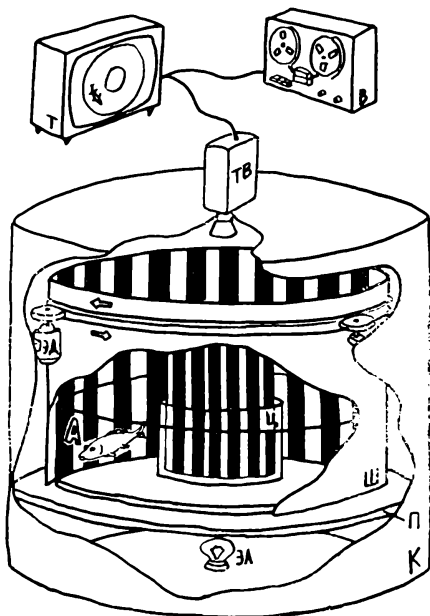


Рис. 1. Схема экспериментальной оптомоторной установки. А - рабочий хвостик; Ш - ширма; Ц - центральная установка с внутренней ширмой; ЭД - источник света; К - корпус; ТВ - телевизионная камера; Т - телевизор; В - видеоматрикс; ЭД - электродвигатель; П - подставка из оргстекла.

было наблюдать на экране телевизора и записывать на видеомагнитофон.

В экспериментах на морских видах рыб, проводимых на базе грузинского отделения ВНИРО (г. Батуми), использовался второй вариант установки: без телевизионной системы, с кольцевым окном в верхней части установки для визуального наблюдения за рыбой.

Измерения параметров оптомоторной реакции осуществлялись с помощью частотометра-хронометра Ф5034 или секундомера.

Опыты проводились на сеголетках и годовиках чешуйчатого карпа *Surgipus sagrio* — наиболее распространенного вида прудовых рыб, и черноморской смарида *Spicara smaris*, размером 9,5—12,5 см. Рыбы помещались в аквариумы и выдерживались в них не менее 10 дней для адаптации к аквариумным условиям. Перед началом эксперимента рыбы пересаживались в опытные аквариумы емкостью 20—60 л по 5—6 экз. в каждый. Все эксперименты сопровождался контролем, причем в опыт и контроль брали рыб одинакового размера и физиологического состояния.

Критерием токсичности служило изменение времени прохождения рыбой одного оборота в оптомоторной установке при фиксированной скорости вращения ширмы, соответствующей «крейсерской» скорости движения в естественных условиях обитания.

Использовались следующие вещества: технический хлорофос ТУ 6—15—908—75 — фосфорорганические соединения; фенол — представитель ароматических соединений, главный компонент сточных вод целлюлозно-бумажных комбинатов; хлористая ртуть — группа тяжелых металлов и трифениловохлорид — оловосодержащие соединения.

Анализировалось действие следующих концентраций токсиكانтов: в опытах на карпе — хлорофос (по активному началу) 0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мг/л, фенол 10, 5, 1, 0,5 и 0,1 мг/л; хлористая ртуть 0,1, 0,01, 0,005 мг/л; трифениловохлорид 0,01 и 0,001 мг/л; в опытах на смарида — фенол 1, 0,1, 0,05 и 0,01 мг/л.

Опыт с каждой концентрацией повторялся минимум 2 раза. В длительных экспериментах ежедневно производили смену воды в опытных и контрольных аквариумах с восстановлением исходной концентрации токсиканта.

Тестирование оптомоторной реакции осуществляли по следующей схеме. Рыбу из экспериментальных аквариумов по очереди пересаживали в оптомоторную установку. После адаптации ее к новым условиям включали двигатель вращения ширмы и, постепенно увеличивая скорость вращения до фиксированного уровня, вовлекали рыбу в устойчивое движение за ширмой. После этого измеряли время прохождения рыбой одного оборота в кольцевом аквариуме (параметр Т) (на одной рыбе дела-

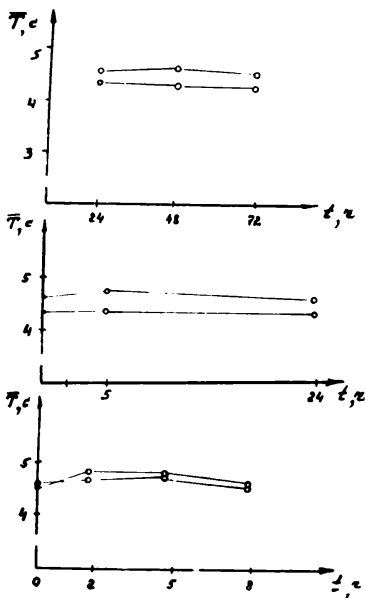


Рис. 2 Примеры изменений оптомоторной реакции карпа во времени при стандартных условиях проведения опыта. Здесь и на рис 3—5 незаштрихованные знаки — недостоверные различия ( $p > 0.05$ ) между опытной и контрольной группами. Использовался непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, а при невыявлении различий — дополнительно критерий Стьюдента.

лось не менее 6 измерений). Тестирование отравленных рыб проводили в воде, содержащей исходную концентрацию токсиканта.

Первая серия экспериментов была посвящена анализу стабильности оптомоторной реакции карпов и черноморской смариды во времени при стандартных условиях проведения опыта.

Исследования показали, что две группы из 5—6 рыб одинакового размерного индекса статистически не различаются между собой по выбранному критерию в течение как 1 сут, так и 3 сут подряд. В качестве примера приведены данные, полученные на карпах (рис. 2). Следует отметить, что иногда при резких изменениях атмосферного давления могло наблюдаться увеличение параметра  $T$ , но оно касалось обеих групп в равной мере, так что группы оставались статистически неразличимыми по этому параметру.

Таким образом, имеются основания для использования контрольной группы рыб в качестве «текущей» точки отсчета для сравнения с опытной группой рыб.

Вторая серия экспериментов была проведена для оценки динамики изменения оптомоторной реакции рыб под влиянием относительно больших концентраций токсикантов при 72-часовой продолжительности опыта. Использовали фенол (концентрации 10, 5 и 1 мг/л) и технический хлорофос (концентрации 0,1 и 0,01 мг/л).

Исследования показали, что присутствие в воде токсических веществ вызывает ухудшение скоростных характеристик рыб (увеличивается параметр  $T$ ). Причем этот эффект выявлялся уже через 2 ч — минимальное время экспозиции в токсичной среде, принятое в наших опытах для тестирования рыб (рис. 3). Степень угнетения зависит от концентрации токсиканта и от длительности экспозиции рыб, при этом, как это хорошо видно из рис. 3, максимальный эффект наблюдается в первые сутки токсикоза.

В связи с этим в следующей серии экспериментов, направленной на выяснение чувствительности данного метода, мы ограничили опытами длительностью 1 сут с регистрацией параметров оптомоторной реакции через 2, 5 и 24 ч с момента внесения в опытный аквариум токсического вещества. Результаты некоторых из этих опытов представлены на рис. 4 и 5. При определении пороговых концентраций токсикантов ряд опытов был проведен в условиях отсутствия у экспериментатора информации о том, в какой из двух аквариумов внесено токсическое вещество. Пороговые минимальные действующие концентрации, полученные в данной серии экспериментов для различия веществ, приведены на стр. 97.

Результаты опытов свидетельствуют о довольно высокой чувствительности метода определения токсичности водной среды по оптомоторной реакции рыб. Сравнение с литературными

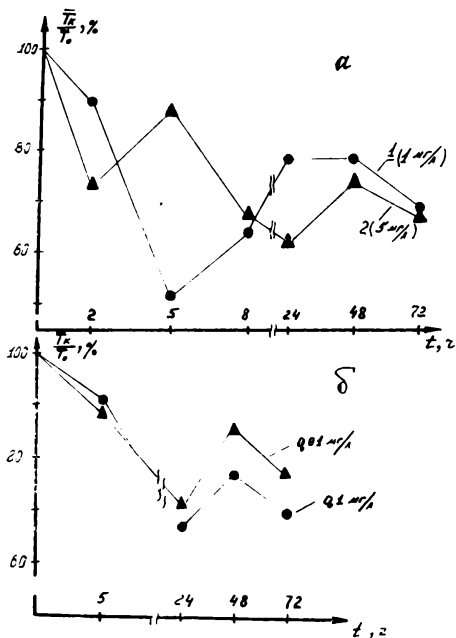


Рис. 3 Изменения оптомоторной реакции рыб под влиянием токсикантов в течение 3 сут. а — фенол, 1 — смарида, 2 — карп; б — хлорофос, карп.  $T_0$  и  $T_1$  — среднее значение параметра  $T$  для контрольной и опытной групп.

Вещество	Объект	Пороговая концентрация, мг/л	ПДК, мг/л	
			Санитарно-гигиенические	Рыбохозяйственные
Фенол	Черноморская смаида	0,05	0,001	0,001
Хлорофос (технический)	Карп	1	0,05	отсутствие
	Карп	0,001		
Трифенило- ловохлорид	Карп	0,001	—	0,0001
Ртуть (хлористая ртуть)	Черноморская смаида	0,001	0,005	0,001
	Карп	0,01		(для морской воды)

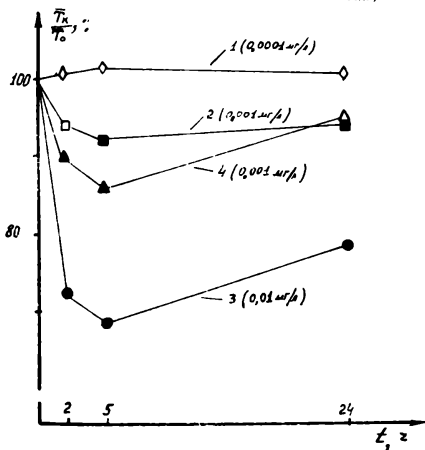


Рис 4. Влияние хлорофоса (1, 2) и трифенилового хлорида (3, 4) на опто-моторную реакцию карпа.



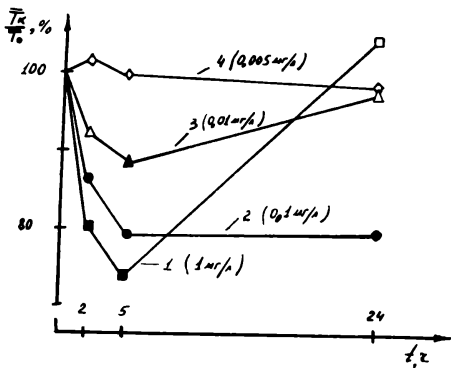


Рис 5 Влияние фенола (1) и ртути (2, 3, 4) на оптомоторную реакцию карпа

данными [1, 6—8] говорит о том, что этот метод по чувствительности соизмерим с хроническими экспериментами, основанными на регистрации выживаемости и определении различных физиолого-биохимических показателей рыб. Особо следует отметить высокую экспрессность метода, основанного на оптомоторной реакции, позволяющего выявлять токсический эффект сублетальных концентраций токсикантов в первые часы развития токсикоза. Эксперименты с фенолом показали также, что чувствительность данного метода не ниже, чем таковая методики условных рефлексов — одной из наиболее чувствительных методик определения токсичности веществ, загрязняющих водную среду [2, 8]. По сравнению с последней метод, основанный на регистрации оптомоторной реакции, имеет ряд преимуществ. Главные из них: регистрация оптомоторной реакции, как врожденной формы поведения, не требует предварительного обучения рыб, что существенно упрощает и укорачивает эксперимент; установка для регистрации оптомоторной реакции конструктивно проста.

Таким образом, имеются все основания надеяться, что методика определения токсичности водной среды по оптомоторной реакции рыб может быть использована при создании устройств для биотестирования качества воды.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крылов О. Н. Изменение некоторых физиологических показателей рыб, икры и личинок под влиянием хлорофоса, этобактерина — Экспериментальная токсикология, 1973, вып. 5.
2. Лукьяненко В. И. Токсикология рыб. М., 1967.
3. Лукьянов А. С., Никоноров С. И., Гусельников В. И. Анализ действия токсических веществ на центральную нервную систему рыб в свете проблемы биотестирования качества водной среды. — Биол. науки, 1980, № 12, с. 5—18.
4. Павлов Д. С. Оптомоторная реакция и особенности ориентации рыб в потоке воды. М., 1970.
5. Протасов В. Р. Зрение и ближняя ориентация рыб. М., 1968.
6. Сторожук Н. Г. Действие ртути на ферментативную систему вьюна. — Тр. ВНИРО, т. 134, 1978, с. 78—84.
7. Сторожук Н. Г. Изменение активности мембран связанных систем печени и жабр рыб под действием ртути. — В кн.: Физиология морских рыб. М., 1980, с. 47—52.
8. Флеров Б. А. Экспериментальные исследования фенольного отравления у рыб. — В кн.: Влияние фенола на гидробионтов. Л., 1973, с. 5—38.
9. Флеров Б. А. Поведенческие аспекты водной токсикологии. — В кн.: Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л., 1979, с. 226—276.
10. Sutterlin A. M. Pollutants and the chemical senses of aquatic animals: perspective and review. — Chem. Senses Flavor, 1974. vol. 1, N 2, p 167—178.

## **ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЙ ЭКСПРЕСС- МЕТОД ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ СТОЧНЫХ ВОД ПО РЕАКЦИИ УХОДА РЫБ**

Одной из наиболее характерных поведенческих реакций рыб, свидетельствующей о наличии в воде токсичных веществ, является реакция избегания, широко применяемая в водной токсикологии для обнаружения целого ряда химических соединений [2].

Этот тест был использован нами при разработке инструментального экспресс-метода оценки токсичности некоторых химических веществ и сточных вод, обеспечивающего автоматизацию процесса тестирования. Автоматизация позволяет включить разработанные на основе метода устройства биотестирования в системы оперативного контроля сточных вод с целью получения информации о наличии в сточных водах токсичных примесей, обладающих отпугивающим действием.

Метод основан на регистрации и анализе изменения поведения рыб в присутствии токсичных соединений, проявляющегося в нарушении у рыб положительного реотаксиса и подавлении реакций на слабое электрическое поле.

Известно [1], что рыбы воспринимают электрические поля и реагируют на них. В зависимости от напряженности поля реакции рыб могут быть различными. Слабое электрическое поле постоянного и переменного тока вызывает у рыб оборонительную реакцию: рыбы возбуждаются и стремятся выйти из поля. Эта реакция использована нами для предотвращения случайных заходов рыб в зону срабатывания датчиков, регистрирующих изменение характера поведения тест-объектов.

При непрерывном и продолжительном контроле токсичности сточных вод рыбы в результате адаптации к примесным веществам могут снизить порог чувствительности к токсикантам. С целью предупреждения снижения чувствительности тест-объектов к токсичным примесным веществам, содержащимся в контролируемых сточных водах, метод предусматривает реадaptацию рыб, позволяющую восстановить их чувствительность. Рeadaptация повышает достоверность и надежность получаемых результатов. С этой же целью в методе предусмотрена регистрация суммарного сигнала от группы тест-объектов, подверг-

нувшихся токсическому воздействию соединений, содержащихся в контролируемой воде.

Подбор тест-объектов осуществляется из тех видов рыб, у которых четко проявляется реакция избегания при действии токсичных веществ. При выборе тест-объектов предусмотрен дифференцированный подход к сточным водам с различным химическим составом. Важным показателем при выборе тест-объектов служит также время получения отклика, так как одним из требований, предъявляемых к инструментальным методам оценки токсичности сточных вод, является оперативность получения информации.

Длительность латентного периода реакции избегания рыбами токсикантов и получение сигнала о токсичности контролируемой воды при использовании данного метода составляют от 2—3 до 40 мин и зависят от видовой принадлежности тест-объектов, природы и концентрации токсичных веществ, а также от условий, в которых осуществляется контроль.

Метод реализуется с помощью устройства, состоящего из блока водоподготовки, измерительных резервуаров, блока управления и сигнализации.

Блок водоподготовки обеспечивает постоянную скорость потока контролируемой воды через измерительные резервуары независимо от давления воды в подводящих магистралях. При установке устройства биотестирования на безнапорных выпусках сточных вод подача контролируемой воды осуществляется посредством, входящим в состав блока. В блоке водоподготовки предусмотрена стабилизация температуры контролируемой воды.

Из блока водоподготовки вода поступает в измерительные резервуары, которые выполнены в виде проточных емкостей. В емкостях установлены электроды, создающие слабое электрическое поле, датчики, фиксирующие попадание рыб в зону электрического поля, а также элементы жизнеобеспечения рыб (кормушки, аэраторы). Для создания ламинарного потока жидкости измерительные резервуары имеют узлы ввода контролируемой воды.

Каждый измерительный резервуар имеет 3 зоны. В зоне предпочтительного пребывания рыбы находятся при отсутствии в контролируемой воде токсичных примесей. Нахождение тест-объектов в этой зоне обеспечивается наличием у рыб положительного реотаксиса и наиболее оптимальными условиями для жизнедеятельности, создаваемыми элементами жизнеобеспечения.

При поступлении в измерительный резервуар вод, содержащих токсичные примеси, рыбы покидают зону предпочтительного пребывания, и, пересекая зону действия отпугивающего поля, попадают в зону чувствительности датчика. В случае гибели тест-объекты также попадают в эту зону под действием потока воды. Как в первом, так и во втором случае датчик вырабаты-

вает электрический сигнал, который поступает в блок управления и сигнализации. Здесь он преобразуется в звуковой или световой сигнал, свидетельствующий о наличии токсичных примесей в контролируемой воде. Помимо сигнализации, блок управления производит регулировку температуры воды, напряжения на электродах отпугивающего поля, включение аэраторов и других операций, связанных с работой устройства.

На лабораторном макете описанного устройства отработывался режим тестирования и проводился подбор тест-объектов, чувствительных к определенным токсичным веществам. Разрешающая способность метода устанавливалась получением регистрируемых реакций рыб на воздействие различных концентраций испытуемых веществ. Изучались также индивидуальные различия в проявлении реакции избегания у особей одного и того же вида.

В качестве тест-объектов были использованы годовики и сеголетки карпа *Cyprinus carpio* (Linne), белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes) и окуня *Perca fluviatilis* (Linne).

Исследуемыми веществами были 7%-ный раствор сернистого железа, 6%-ный водный конденсат, применяемые для промывки конденсаторов турбин теплоэлектростанций, и сульфат меди, используемый для подавления «цветения» воды в водосм-охладителе.

В предварительных экспериментах устанавливалось остротоксичное действие испытуемых веществ на тест-объекты. Влияние на рыб сернистого железа изучалось в разбавлении от 20 до 2 мл/л, водного конденсата от 200 до 0,5 мл/л и сульфата меди в концентрации (по иону меди) от 50 до 2,5 мг/л. Опыты проводились при температуре 20°С, концентрация растворенного в воде кислорода составляла 7,2—7,8 мг/л, концентрация исследуемых веществ в каждой серии опытов уменьшалась в 2 раза. В опыт брали по 4 экз. рыб. Каждый опыт имел 4—5 повторений.

Установлено, что остротоксичное действие 7%-ного раствора сернистого железа на изученные виды рыб проявляется в разбавлении 4 мл/л, водного конденсата — в разбавлении 1,5 мл/л и сульфата меди в концентрации 50 мг/л.

Эти концентрации являлись исходными при установлении размещающей способности метода.

Предлагаемый метод позволяет улавливать токсичность ионов меди в концентрации от 50 мг/л до 2,5 мг/л за 30 мин с момента поступления их в измерительный резервуар. Токсичность сернистого железа может быть определена в разбавлении от 5 до 0,5 мл/л за 30 мин. Водный конденсат вызывает реакцию избегания у окуня в разбавлении 1 мл/л в течение 5 мин, а в разбавлении больше 4 мл/л за 3 мин.

Наиболее чувствительным тест-объектом к исследованным

веществам является окунь, менее чувствителен толстолобик, и наименьшей чувствительностью обладает карп.

Время получения сигнала о токсичности контролируемой воды зависит не только от вида тест-объекта, но и от индивидуальных различий в проявлении реакции избегания у особей одного и того же вида.

Наибольшие индивидуальные различия присущи карпам, а наименьшими индивидуальными различиями в проявлении реакции избегания характеризуется окунь. Установлено также, что с повышением концентрации токсиканта индивидуальные различия в реагировании на его действие уменьшаются у всех изученных видов рыб. Так, при действии водного конденсата в разбавлении 0,5 мл/л на сеголетков толстолобика время получения регистрируемой реакции избегания у различных особей отличается на 3—5 мин, а в разбавлении 2 мл/л всего на 1 мин.

Таким образом, инструментальный экспресс-метод оценки токсичности по реакции ухода рыб может быть рекомендован для непрерывного контроля сточных вод, содержащих токсичные примесные вещества, обладающие отпугивающим действием.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лаздик А. В., Протасов В. Р. Электричество в жизни рыб. М., 1977, 86 с.
2. Лукьяненко В. И. Токсикология рыб. М., 1967. 216 с.
3. Флеров Б. А. Сравнительное изучение реакции избегания токсических веществ у водных животных. — В кн.: Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979, с. 81—87.

Л. А. Васильков, А. Н. Крайнова, А. Я. Маларовская

## **ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЛАЗМЫ КРОВИ РЫБ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ**

Поливалентность системы крови, ее высокая реактивная лабильность обусловили разработку множества тестов для выявления различных патологий в организме. В качестве одного из тестов, определяющих биологическую полноценность крови и ее компонентов, надежного показателя тонких физико-химических изменений при воздействии повреждающих агентов используется измерение пассивных электрических параметров ткани.

В литературе приводятся обширные сведения об электрических характеристиках крови и ее компонентах в норме и патологии [1, 3, 8—10, 19, 25, 33]. Однако вопросу изучения электропроводности крови при интоксикации до сих пор не уделялось должного внимания.

Данная работа ставит целью изучить некоторые особенности электропроводности одного из компонентов крови плазмы при токсикозах у рыб.

Измерение электрических параметров плазмы крови рыб производилось на установке, сконструированной по принципу мостовой схемы. Источниками питания мостов МПП-300 Е-10-2 были генераторы переменного тока ГЗ-33 и ГСС-6. Индикатором служил селективный индикатор нуля Ф-510. Измерения производились в спектре частот  $5,10^2$  —  $10^7$  гц. Входное напряжение не превышало 0,25 В.

Плазма, полученная от сеголеток карпа, окуня и толстолобика естественным осаждением форменных элементов, переносилась пастеровской пипеткой в специально изготовленную ячейку объемом 0,2 мл из молибденового стекла со впаянными вертикальными платиновыми, черненными электрогальваническим методом электродами.

Изучение динамики выхода электролитов из эритрона проводили по методике, описанной в [10]. Концентрацию ионов К и Na определяли на пламенном фотометре [2].

В качестве токсиканта использовался раствор соли сернистой меди в концентрациях 1—10 мг/л. Время экспозиции — от 30 мин до 3 ч.

Несмотря на большое количество работ по диэлектрическим свойствам крови различных животных [25, 33], мы не обнаружили сведений о плазме крови рыб при различных физико-химических воздействиях и патологиях, а также в норме. Поэтому первым этапом работ было изучение удельной электропроводности плазмы крови клинически здоровых рыб.

В результате исследований было определено, что наибольшую электропроводность имеет плазма окуня по сравнению с плазмой карпа и толстолобика. Различия в значениях показателей достигают 30%. На рис. 1 представлены результаты измерений

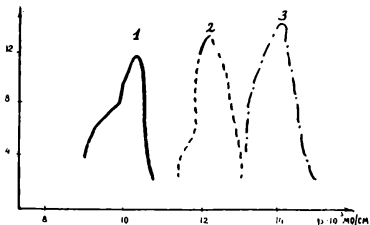


Рис. 1 Удельная электропроводность плазмы крови карпа (1), толстолобика (2), окуня (3)  
По оси ординат — количество образцов

удельной электропроводности образцов плазмы указанных выше видов рыб. Предельные значения удельной электропроводности плазмы окуня равны  $14,82 \pm 0,86 \cdot 10^{-3}$  и  $13,10 \pm 0,59 \cdot 10^{-3}$  мо/см, толстолобика —  $12,71 \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$  и  $11,52 \pm 0,13 \cdot 10^{-3}$  мо/см, карпа —  $10,74 \pm 14 \cdot 10^{-3}$  и  $9,03 \pm 0,06 \cdot 10^{-3}$  мо/см. Довольно большая погрешность связана с индивидуальными особенностями крови рыб. Среднеквадратичные отклонения от среднего значения примерно 10%.

Изучение образцов плазмы в диапазоне частот  $10^2$ — $10^7$  гц показало отсутствие дисперсии удельной электропроводности. Частотный спектр аналогичен для раствора электролита (NaCl) той же проводимости, что согласуется с литературными данными по электрическим свойствам плазмы других животных и человека [1, 25].

Исследование диэлектрических параметров плазмы крови рыб, находящихся в растворе токсиканта, показало увеличение ее удельной электропроводности по сравнению с плазмой ин-



тактичных животных. Показательно увеличение электропроводности плазмы в зависимости от концентрации токсиканта (рис. 2). При интоксикации сернокислыми солями меди 1 мг/л (экспозиция 1 ч) удельная электропроводность плазмы увеличилась по сравнению с контролем у окуня —  $15,7 \pm 1,1\%$ , толстолобика —  $12,25 \pm 0,6$ , карпа —  $10,8 \pm 0,8$ . Значительно увеличила от-

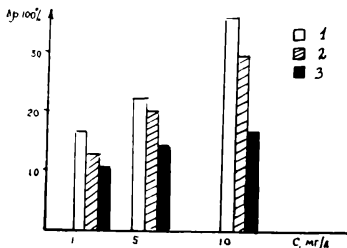


Рис. 2 Изменение удельной электропроводности (ρ) плазмы окуня (1), толстолобика (2), карпа (3) в зависимости от концентрации токсиканта

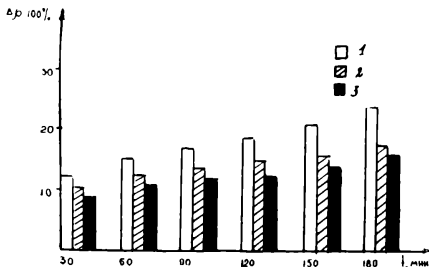


Рис. 3 Изменение удельной электропроводности (ρ) плазмы окуня (1), толстолобика (2), карпа (3) в зависимости от времени воздействия токсиканта.

ветную реакцию системы крови интоксикация 10 мг/л. У окуня величина показателей увеличилась на  $36,3 \pm 0,8\%$ , толстолобика —  $28,1 \pm 0,3$ , карпа —  $15,3 \pm 0,6$  по сравнению с показателями интактной группы.

Отчетливо прослеживается зависимость токсического эффекта тяжелых металлов от экспозиции (рис. 3). Заметный скачок наблюдается уже через 30 мин интоксикации сернокислой медью в концентрации 1 мг/л. Через 90 мин значение удельной электропроводности увеличивается у окуня на  $17,3 \pm 0,2\%$ , толстолобика  $13,7 \pm 0,2$ , карпа  $11,3 \pm 0,40$ . Токсичность ионов меди еще более четко выражена при трехчасовой экспозиции. Величина показателей изменяется на  $24,1 \pm 0,8$ ,  $17,5 \pm 0,4$  и  $15,2 \pm 0,03\%$  соответственно для различных видов.

Необходимо отметить, что у окуней зафиксирован более высокий уровень отклонений в величинах показателей от контроля, чем у остальных групп, вместе с тем, окунь — более чувствительный к токсикантам вид, чем, например, карп [21]. Эти данные подтверждают положение о том, что видовая чувствительность к действию токсических веществ определяется видовыми особенностями биохимических структур, на которые воздействуют яды [22].

Изменение электропроводности плазмы, с одной стороны, рассматривается как критерий нарушения структуры эритроцитов, показатель степени повреждения клеток, а с другой, как мера проницаемости для ионов [8]. Увеличение удельной электропроводности плазмы крови рыб, подвергшихся интоксикации, мы относим за счет накопления в ней проникающих ионов при нарушении транспортной функции мембраны.

Изучение электролитного состава плазмы крови рыб, находящихся в растворе токсиканта, подтвердило наши предположения. Содержание ионов калия в плазме у окуней повысилось с  $12,5 \pm 0,2$  до  $33,6 \pm 0,1\%$ , у толстолобика с  $10,9 \pm 0,5$  до  $24,7 \pm 0,2\%$ , у карпа с  $8,6 \pm 0,5$  до  $13,7 \pm 0,5\%$  по сравнению с контрольной группой животных.

Накопление в плазме электролитов часто расценивается только как результат нарушения функции почек, [7, 24]. Большинство исследователей, уделяющих внимание изучению почки как органа, выводящего яды из организма, показано, что при хронических отравлениях в почечной ткани наблюдается значительное кровенаполнение, развиваются дистрофические изменения, характеризующиеся зернистой дистрофией, атрофией эпителия почечных канальцев, истощением гемопозитической ткани, гемосидерозом. Изменения охватывают все отделы нефрона и межтубулярную ткань. Цитоплазма извитых канальцев претерпевает зернистую дистрофию. Просветы части канальцев сужены, иногда наполнены белковым содержимым [15]. Разумеется, что такие патологические изменения почечной ткани не могут не сказываться на реабсорбционной

функции канальцев. Однако, на наш взгляд, это не единственная причина накопления ионов в плазме. Увеличение концентрации ионов калия в плазме при различных экстремальных воздействиях (рентгеновское,  $\gamma$ -излучение, стресс, действие повышенной или пониженной температуры и др.), в том числе и при интоксикациях, отмечается многими авторами [8, 10, 13, 14, 17, 19, 26, 30—32]. Особо необходимо подчеркнуть, что нарушение транспорта иона калия в большинстве случаев рассматривается как наиболее ранний показатель повреждения эритроцитарной мембраны [8, 10, 19].

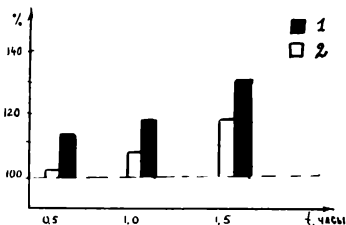


Рис. 4. Динамика выхода ионов калия из эритроцитов урыб, подвергшихся действию токсиканта (1) и контрольных (2).

Для подтверждения правильности предположения об эритроцитарном механизме накопления ионов калия в плазме крови при интоксикации солями меди мы провели ряд опытов по изучению динамики выхода ионов калия из красных клеток. Оказалось, что ионы меди вызывают усиление выхода из эритроцитов в среду ионов  $K^+$ , не содержащую электролиты. При концентрации медного купороса 1 мг/л и экспозиции животных 1 ч из эритроцитов карпа в среду с изотонической сахарозой через 0,5 ч инкубации выделилось на 8% больше ионов калия по сравнению с эритроцитами интактных животных, а через 1,5 ч — на 11% (рис. 4).

Нарушение транспортной функции мембраны при интоксикации ионами меди и другими тяжелыми металлами происходит в результате образования в мембранах так называемых «биосомплексов» с аминокислотами, фосфатами или Н-группами [20, 28, 29, 34]. Это может привести к потере почти 50% ионов калия [31]. Нельзя исключить возможность проникновения ионов металлов в клетку и инактивации ими тех звеньев

ев метаболизма эритроцитов, которые принимают непосредственное участие в поддержании структурной целостности клеток, в частности процессов энергетического обмена [20].

Наряду с этой теорией нарушения клеточных структур существует нейрогенная гипотеза повреждений.

Целостность организма, возможность поддержания гомеостаза внутренней среды осуществляются нервной и гуморальной системами. Всякого рода экстремальные воздействия, к числу которых, несомненно, относятся и токсиканты, вызывают нейротканевую дисбаланс, конечным итогом которого является функциональное и структурное повреждение тканей и органов [5].

Общезвестно, что различного рода стрессы, имеющие место и при интоксикациях [11, 12, 23, 26]), сопровождаются усиленным выходом в кровяное русло адреналина и кортикостероидных гормонов. В присутствии физиологически активных концентраций ( $10^{-5}M$ ) адреналина наблюдается уменьшение осмотической стойкости эритроцитов. Гормоны вызывают изменения структурно-функциональных состояний эритроцитарной мембраны. Эффекты наблюдаются при очень низких концентрациях, когда на одну клетку приходится всего несколько десятков молекул гормона [27]. Ацетилхолин как медиатор изменяет структуру клеточной мембраны и ее проницаемость для различных ионов [4].

На ранних стадиях интоксикации нейрогенная природа повреждений приобретает особое значение. Это подчеркивалось рядом авторов, изучающих характер ранних изменений у гидробионтов в связи с химическим загрязнением водоемов и рассматривающих интоксикацию как неспецифическую физиологическую реакцию на повреждение [6, 16, 18].

Анализ литературных материалов и результатов собственных исследований, а также высокая чувствительность и точность метода измерения пассивных электрических параметров ткани, невысокая стоимость аппаратуры позволяют рекомендовать его для экспресс-диагностики ранних нарушений физиологического состояния организма рыб при оценке токсичности некоторых компонентов сточных вод.

Таким образом, увеличение электропроводности плазмы крови рыб, наблюдающееся на ранних стадиях интоксикации, зависит от концентрации токсиканта и времени экспозиции. Отмечено видовое различие в величине удельной электропроводности плазмы и скорости реагирования системы крови на действие токсиканта. Увеличение электропроводности плазмы крови рыб на ранних этапах интоксикации происходит за счет накопления ионов калия в плазме, поступающих из эритроцитов. Регистрация электропроводности плазмы может быть использована для экспресс-анализа электролитного обмена крови при различных нарушениях водно-солевого обмена в организме рыб.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев В. С. Кондуктометрические методы и приборы в биологии и медицине. М., 1973, 335 с.
2. Баттерова В. Т., Наточин Ю. В. Методы исследования водно-солевого обмена и функции почек у рыб.— В кн.: Типовые методики исследования продуктивности видов рыб в пределах ареалов. Вильнюс, 1976, с. 110—122.
3. Вишняковский В. И. Электрометрия биофизических процессов в сперме быков-производителей при замораживании.— Автореф. канд. дисс., Харьков, 1969.
4. Вишняков С. И. Межклеточный обмен электролитов и его изучение у сельскохозяйственных животных. Воронеж, 1972, 148 с.
5. Заводская И. С., Морева Е. В. Фармакологический анализ механизма стресса и его последствий. Л., 1981, 216 с.
6. Кауфман Э. С. Некоторые вопросы фенольной интоксикации *Enchytraeus albidus* Henle (Oligochaeta) с точки зрения теории стресса.— Гидробиол. журнал, 1975, т. 11, № 5, с. 62—65.
7. Ковтун С. Д., Сокур А. И. Влияние ДДТ на количество натрия и калия в скелетных мышцах и сыворотке крови белых крыс.— В кн.: Гигиена и токсикология пестицидов и клиника отравлений. Киев, 1967, с. 229—235.
8. Кригер Ю. А. Повреждение, проницаемость и электропроводность.— В кн.: VII Всесоюз. съезд физиологов, биохимиков, фармакологов. Доклады, М., 1947, с. 7—8.
9. Кригер Ю. А., Вайсон А. А. Изменение электрического сопротивления эритроцитов при действии  $\gamma$ -лучей.— Научные докл. высш. школы. Биол. науки, 1963, № 4, с. 80—83.
10. Кригер Ю. А., Елховская Е. С. Изменение физико-химических свойств эритроцитов при действии  $\gamma$ -лучей.— Биофизика, 1958, т. 3, вып. 6, с. 711—716.
11. Лукьяненко В. И. Общая характеристика и фазность течения фенольной интоксикации карасей в свете теории «стресса».— Вопр. ихтиологии, 1965, т. 5, № 3 (36).
12. Лукьяненко В. И. Токсикология рыб. М., 1967, 216 с.
13. Маллревская А. Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного затрофирования водоемов. Киев, 1979, 256 с.
14. Марчулене Р. Ф. и др. Кумуляция  $^{210}\text{P}$  в пресноводных растениях.— Гидробиол. журнал, 1978, т. 19, № 6, с. 83—86.
15. Моисеева В. П. Патологическая характеристика изменений внутренних органов и тканей рыб при воздействии некоторых химических агентов, содержащихся в промышленных сточных водах.— Уч. зап. Петрозаводск. ун-та, т. 18, вып. 1, 1972, с. 94—101.
16. Путинцев А. И. Ранние изменения у гидробионтов в связи с химическим загрязнением водоемов. Автореф. Дисс. канд. М., 1980, 20 с.
17. Романенко В. Д., Красильский В. А. Некоторые особенности ионного обмена у рыб при адаптации их к повышенному содержанию  $\text{CO}_2$  в воде.— Гидробиол. журн., 1977, № 2, с. 83—85.
18. Саксонов М. Н., Трипузов Г. В. Электропроводность как метод оценки водных растений при фенольной интоксикации.— В кн.: Проблемы экологии Прибайкалья. Тезисы, Иркутск, 1979, с. 79—80.
19. Свердлов Е. А. Изменение физико-химических свойств эритроцитов при действии повреждающих агентов.— Автореф. канд. дисс., МГУ, 1964, 20 с.
20. Соколовский В. В., Давлетов Э. Г. О механизме гемолитического действия тяжелых металлов.— Цитология, 1974, т. 16, № 5, с. 648—650.
21. Строганов Н. С. Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971, с. 14—60.

22. Тиунов Л. А. Подходы к определению видовой чувствительности экспериментальных животных для токсикологических исследований.— В кн.: Общие вопросы промышленной токсикологии. М., 1967, с. 55—59.
23. Флерова Г. И., Мартеньянов В. И., Запруднова Р. А. Содержание электролитов в сыворотке крови пресноводных рыб.— Научн. докл. высш. школы Биол.-науки, 1980, № 3, с. 46—51.
24. Фудель-Осипова С. И., Ковтун С. Д., Сокур А. И. Биофизические показатели нарушения проницаемости клеток животных при воздействии ДДТ.— В кн.: Гигиена применения, токсикология пестицидов и клиника отравлений. Киев, 1968, с. 797—805.
25. Челидзе Т. Л., Кикнадзе В. Д., Кевлишвили Г. Е., Чхаидзе В. Т. Диэлектрическая спектроскопия крови. I Диэлектрические спектры нормальной крови человека.— Биофизика, т. 18, вып. 5, 1973, с. 932—935.
26. Черниченко Л. А. Заміна електропровідності і електролітного складу плазми крові при емоційно-стресовому стані у щурів.— Фізіол. журн. УРСР, 1975, т. 21, с. 367—340.
27. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск, 1981, 216 с.
28. Adams K. E., Lineberger T. H. The effect of erithoryte deformability.— Biochim et biophys. acta, 1979, N 2, 550, p. 279—287.
29. Clarkson Thomas W. Factors involved in heavy metal poisoning.— Fed. Proc., 1977, vol. 36, N 5, p. 1634—1639.
30. Hasband E., Prochnow F. Untersuchungen über die Wirkung von Cadmium s auf das Blutbild, die Leitfähigkeit und das Skelettsystem von Forellen. Veröff. Inst. Kusten und Binnenfisch, 1980, N 73, 28 S.
31. Nakao Toshiko. «Igaku no aumi» 1976, vol. 27, N 2, p. 76—80. Реферат. журнал «Токсикология», 1977, № 2, 275.55.
32. Pritchard J. S. Toxic substances cell membrane function.— Fed. Proceedings, 1979, N 8, p. 2220—2225.
33. Schwan H. P. Electrical Properties of Tissue and Gell Suspensions.— Advances in Biological and Medical Fhisics, N. Y., 1957, vol. 5, p. 119—289.
34. Webb M. Metabolic targets of metal toxicity.— In: Chlm Chem. and Chem. Toxicol. Metals. Amsterdams, 1977, p. 51—64.

Т. В. Майко

**САЛАКА *CLUPEA HARENGUS MEMBRAS*  
В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА  
В МОНИТОРИНГЕ ЭКОСИСТЕМЫ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ**

Количество данных о токсических веществах, полученных в мониторинге Балтийского моря, за последние годы значительно возросло. Однако эта информация не поддается экологической интерпретации, если не известно их воздействие на биоту моря. И хотя имеется много сведений о реакциях пресноводных и морских организмов на токсиканты [4, 7] и опубликовано значительное количество соответствующих методик [9], воспользоваться ими с точки зрения регионального подхода оказывается подчас затруднительным и требуются дополнительные опыты [7].

С этой целью с 1976 г. нами поставлен ряд экспериментов, тест-объектом в которых служила салака. Этот карликовый подвид сельди обитает по всей Балтике и находится под сильным прессом промысла. В год вылавливают около 400 тыс. т салаки [13]. Интенсивный промысел сельдевых ведет обычно к омоложению их популяции, в результате чего она становится менее устойчивой по отношению к факторам внешней среды [5, 10]. К последним относится и загрязнение, которое на Балтийском море наиболее распространено в прибрежных участках, т. е. на нерестилищах салаки, где этот вид нерестует на глубине 3,8—10 см [1]. Но запасы салаки остаются все же на высоком уровне [12]. Возможно, что здесь играют свою роль большая экологическая толерантность, во всяком случае по отношению к кратковременным экспериментальным воздействиям факторов среды [4]. Нами, однако, неоднократно обнаруживалась высокая естественная смертность икры в Пярнуской бухте.

Наличие двух сезонных рас (весенне-нерестующая в мае-июне, осенне-нерестующая в сентябре-октябре) делает салаку относительно удобным тест-организмом в изучении оплодотворения и эмбрионального развития под воздействием разных токсикантов (тяжелые металлы, хлорорганические соединения). Салака имеет относительно икрометание, количество икринок колеблется от 3,5 тыс. до 87,5 тыс. [2, 3], что позволяет ставить опыты по многофакторному плану в нескольких повторностях

при одной паре производителей. Это гарантирует генетическую однородность эксперимента. Диаметр икринок колеблется от 1,09 до 1,63 в среднем 1,30 мм, но размер икры не является показателем ее выживаемости [11]. Существуют качественные различия между икринками каудальной и краниальной части гола. Оплодотворяемость в естественных условиях около 95% [1] и приблизительно такая же в контрольных опытах. Между оплодотворяемостью и выживанием обнаружена тесная положительная связь ( $r=0,74$ ) [11]. Наиболее интенсивное икротетание происходит при температуре воды 10°, для эмбрионального развития температурный оптимум находится в пределах 10—12°. Продолжительность эмбрионального развития салаки Рижского залива колеблется от 1400 до 3600 градусо-часов [6]. Неактивированные водой икринки сохраняют способность к оплодотворению в течение четырехчасового пребывания в воде, в теле самки в течение 8 ч. после ее смерти [3]. Гораздо менее устойчивы гаметы самцов. Пребывание сперматозоидов салаки в воде в течение 30 мин уменьшало способность их оплодотворения примерно на 50%.

Исходный материал был доставлен в лабораторию на судне в полиэтиленовой емкости (50 л), вода в которой аэрировалась и при необходимости охлаждалась добавлением в сосуд льда. Опыты были проведены в чашках Петри, куда специальной пипеткой помещали по 150—200 икринок. Малое количество овоцитов в чашках объясняется невозможностью перемешать их достаточно тщательно [8]. Оплодотворение сухое, по методу Врасского [9]. В чашках аэрация производилась путем диффузии. Слой рабочего раствора над икринками 0,5 см, растворы меняли ежедневно. В течение суток содержание кислорода остается на уровне насыщения, рН 8,3. Известно, что изменение реакции среды на 0,2 единицы от нормы значительно повышает пороговую концентрацию кислорода для салаки [4]. Оплодотворение и развитие эмбрионов проходило при 12°. При температуре 16° оплодотворяемость была менее 30%. В случае благоприятных метеорологических условий эксперименты ставили на судне, но инкубацию икры производили в лабораторном боксе. Прозрачная крышка последнего обеспечивала похожий на естественный суточный ход освещенности.

Подсчет оплодотворенных икринок производили на фазе бластулы. Для увеличения точности и скорости подсчета во время опыта икринки из каждой чашки были сфотографированы. Повторные снимки отмеченных эмбрионов позволяли судить о характере эмбриогенеза салаки под влиянием различных токсикантов (Zn, Pb, Cu, гербицид Т22К). Расчетные концентрации тяжелых металлов в рабочих растворах, соответственно 0,1, 1,0 и 10,0 мг/л совпадали с действительными удовлетворительно (атомно-абсорбционная спектроскопия).

Показателями токсичности служили снижение оплодотворе-



мости и количество вылупленных личинок. Выяснилось, что металлы токсичнее гербицида, а их совместное действие носит антагонистический характер. Установленная санитарная норма тордона в воде (10,0 мг/л) может снизить оплодотворяемость салаки на 10—12%, а обнаруженные нами концентрации металлов в воде Рижского залива вряд ли имеют существенное влияние на ее оплодотворение. Используемые нами концентрации токсикантов не вызвали партеногенетического эффекта.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гриценко О. Ф., Шалин Н. И. Экология размножения сельди Ныйского залива (Сахалин).— Биология моря, 1979, № 1, с. 58—65.
2. Казанова И. И. Определитель икры и личинок рыб Балтийского моря и его заливов.— Тр. ВНИРО, т. 26, 1953, с. 221—264.
3. Крыжановский С. Г. Материалы по развитию сельдевых рыб.— Тр. Ин-та морфологии животных им. А. Н. Северцова, вып. 17, 1956.
4. Лукьяненко В. И. Токсикология рыб. М., 1967.
5. Михайленко В. Г. Устойчивость сельди в раннем онтогенезе к экстремальным воздействиям.— В кн.: Экологическая физиология и биохимия рыб, т. 2. Астрахань, 1979, с. 137—138.
6. Оявер Э. А. Зависимость характера эмбрионального развития группировок салаки от температурного режима и солености.— В кн.: Вопросы раннего онтогенеза рыб. Киев, 1978, с. 53—54.
7. Патин С. А. Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность мирового океана. М., 1979.
8. Печкуренков В. Л., Орлов Э. В. Критика оценки результатов инкубации икры рыб в эксперименте.— Тр. ВНИРО, 1974, с. 128—132.
9. Строганов Н. С. Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971.
10. Тюрнин Б. В. О причинах снижения запасов охотской сельди и мерах по их восстановлению.— Биология моря, 1980, № 2, с. 69—74.
11. Шалиро Л. С. Влияние качества самок на икру у салаки Вислинского залива.— В кн.: Рыбохозяйственные исследования в бассейне Балтийского моря. Рига, 1970, № 7, с. 66—84.
12. Dementyeva T. F. On the causes responsible for changes in fish production of the Baltic Sea.— In: Soviet-Swedish Symposium on the pollution of the Baltic. Stockholm, 1971.
13. Härmäläinen T. Man and the Baltic. Sea. Forssa, Forssan Kirjapaino Oy. 1977.

О. О. Ротс, Э. А. Пейкре

### **САЛАКА — БИОИНДИКАТОР ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

С 1976 г. начато изучение вопросов распределения и переноса токсических хлорорганических пестицидов (ХОП) и полихлорированных биофенилов (ПХБ) по пищевой цепи гидробионтов Балтийского моря. С этой целью исследовали уровни ХОП и ПХБ в различных видах рыб, донной фауны и планктона. Наряду с этими проблемами мы пытались выявлять подходящий вид гидробионтов (биоиндикатор) для оценки современного состояния загрязненности морской среды Балтики хлорорганическими углеводородами [3—5].

При изучении загрязнений морей поля загрязнения хлорорганическими углеводородами формируются в основном у побережья и распространяются в открытые районы моря. Поэтому в прибрежных районах, являющихся местами активного питания и нереста рыб, обычно отмечаются максимальные концентрации загрязняющих веществ. Миграции рыб способствуют перемещению токсикантов.

При выборе тест-объекта — салаки мы исходили из следующих основных положений. Салака (сельдь) имеет высокую численность и является самой важной промысловой рыбой Балтийского моря. Она распространена по всей акватории Балтийского моря и служит хорошим индикатором локального загрязнения моря. Районы обитания локальных популяций салаки отделены от соседних перестиглих районами (из-за недостатка корма), что исключает генетическое смешение отдельных популяций между собой. Наконец, салака является последним звеном в системе морская вода — планктон — рыба — человек перед поступлением токсикантов в организм человека.

Для выявления рас и группировок салаки, помимо морфологических данных, успешно используются биологические особенности и признаки отолитов. По этим данным в Балтийском море различают 14 популяций весенненерестующей салаки [1, 2].

В прибрежной зоне СССР можно выделить 6 популяций весенненерестующей салаки, различающихся местами нереста в Балтийском море акватории СССР. Исходя из этого были вы-

браны следующие районы для отлова рыб: восточная и западная части Финского залива, Рижский залив, открытая часть Балтики около побережья гг. Лиепая — Клайпеда, открытая часть Балтики от г. Вентспилс до о. Сааремаа, открытая часть Балтики северо-западного побережья о. Сааремаа.

На основе проведенных исследований предложена система контроля с использованием салаки в качестве биоиндикатора для оценки современного состояния загрязнения Балтийского моря (в прибрежной зоне СССР) токсическими хлорорганическими углеводородами, охватывающая 6 районов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Оявеер Э. О различии сезонных рас салаки северо-восточной части Балтийского моря по отолитам.— Изв. АН ЭССР, Биология, 1962, т. 11, № 3, с. 193—207.
2. (Оявеер Э.) Ojaveer E. Räim — Läänemere heeringas.— Eesti Loodus, 1969, N 4, 1 k, 230—235.
3. (Роотс О.) Roots O. Polychlorinated biphenyls and chlororganic pesticides in mollusc of the Tallinn Bay.— In: The Investigation and Modelling of processes in the Baltic Sea, Tallinn, 1981, part 11, p. 137—141.
4. Роотс О., Пейкре Э. О содержании полихлорированных бифенилов и хлорорганических пестицидов в рыбах Балтийского моря.— Изв. АН ЭССР, Химия, 1978, т. 27, № 3, с. 193—196.
5. (Роотс О., Пейкре Э.) Roots O., Peikre E. The study of the Baltic Sea zooplankton pollution with chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls during the 10-th cruise of the R/V, Aju-Dag.— In: The Investigation and Modelling of processes in the Baltic Sea, Tallinn, 1981, part 11, p. 131—137.

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ БИОТЕСТИРОВАНИИ

Многочисленные работы показали, что токсичность вод является фактором, глубоко затрагивающим жизненные функции гидробионтов [3, 10]. При этом в сообществе меняется соотношение мало- и высокоустойчивых видов. Резистентные виды приобретают преимущественное развитие, достигая значительной численности [6].

Экспериментальные исследования по установлению причинной связи между изменением численности гидробионтов и влиянием загрязнителей на них, ведутся на кафедре общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Изучая сравнительную токсичность загрязнителей различной химической природы (металлорганические соединения — МОС, антисептики и сточные воды целлюлозно-бумажной промышленности) на некоторые виды моллюсков — *Anadonta piscinalis*, *Unio pictorum*, *Un. tumidus*, *Planorbis pl.*, *Limnaea stagnalis*, *Radix abata* и представителя низших ракообразных — *Daphnia magna* Str., выявили связь между концентрациями загрязнителя и степенью вызываемых ими нарушений. При этом оценены летальные ( $ЛК_{100}$ ,  $ЛК_{50}$ ), сублетальные (угнетающие) и недействующие концентрации токсикантов. Оценка сточных вод по выживаемости гидробионтов выражена в 4-балльной системе:

Количественная оценка, балл	Продолжительность жизни 50% гидробионтов, сут ( $ТЛ_{50}$ )	Оценка токсичности
1	до 20	слабая
2	до 10	средняя
3	до 5	высокая
4	меньше 2	очень высокая

Поведенческие реакции указанных тест-объектов регистрировали в кратковременных (2—5-дневных) опытах. Обнаруженные изменения сопоставлены между опытом и контролем по следующим показателям: изменение ритма, характера и темпа дви-

жения (фаза возбуждения, фаза угнетения, дафнии, моллюски); открытие сифона и створок, выдвижение ноги (двустворчатые моллюски); отказ от пищи (брюхоногие моллюски); торможение оборонительной реакции, втягивание туловища в раковину (брюхоногие моллюски).

Изменение выживаемости гидробионтов при токсическом воздействии выражено графически линиями регрессии, определяющими величину и остроту эффекта [7]. Для всех исследованных гидробионтов угол наклона «концентрация — эффект» в растворах оловоорганических соединений (ООС) был меньше, чем у свинецорганических (СОС). Этот факт следует учитывать при спуске сточных вод, содержащих данные вещества, так как токсичность ООС при разбавлении уменьшается медленнее в сравнении со свинцовыми соединениями.

Сравнительный анализ выживаемости прудовиков и дафний в растворах МОС показал сходный характер изменения токсичности ( $ЛК_{50}$ ) в зависимости от химической структуры соединений, но выявил более высокую устойчивость прудовиков. Так,  $ЛК_{50}$  в трехсуточных опытах для дафний оказалась равной 0,1, для прудовиков — 1 мг/л. Дафнии гибнут быстрее моллюсков, так как им характерен более высокий уровень обменных процессов, свойственный всем беспозвоночным с коротким циклом развития, а также активный способ передвижения рачков, приводящий к большему контакту с новыми порциями токсиканта.

Двустворчатые моллюски (*Anadonta pisc. Unio pictor*) в сравнении с брюхоногими (*L. stagn., Pl. pl. Rad. ov.*) в экспериментах с теми же токсикантами проявили еще большую устойчивость, для них  $ЛК_{50}$  — 10 мг/л. При воздействии загрязнителя они плотно захлопывают створки раковины, повышая выживаемость в остролетальных концентрациях. Использование двустворчатых моллюсков при анализе токсичности среды в кратковременных опытах не является перспективным.

Выбранные нами тест-объекты по степени устойчивости к токсикантам ( $ЛК_{50}$  3 сут.) можно расположить в следующий ряд: *Un. pictorum*, *Un. tumidus*, *Anadonta piscinalis*, *Radix ovata*, *Planorbis pl.*, *Limnea stagnalis*, *Daphnia magna*.

Различие в устойчивости водных беспозвоночных определяется многими факторами, к важнейшим из которых следует отнести морфофизиологические (толщина наружных покровов, их проницаемость, способность дыхательной системы) и поведенческие (способность к избеганию, подвижность в токсической среде) [1]. Погрешение гидробионтов разных систематических групп по биологическим, физиологическим и другим показателям является основанием элиминации одних видов и усилением численности других в биоценозе. Характер и длительность нарушений зависят от концентрации, длительности действия, и в значительной мере от кумулятивных свойств токсиканта.

На основании литературных данных [8, 11] и собственного экспериментального материала, мы считаем, что дафнии при загрязнении водной среды являются наименее устойчивыми тест-объектами. Поскольку этот факт в настоящее время является общепризнанным, предлагаем ввести оценку опасности кумулятивных свойств токсикантов на дафниях. Как известно [5], накопление яда и токсичных его метаболитов в организме называется материальной кумуляцией, а накопление вызванных ядом изменений — функциональной. Показатель материальной кумуляции — коэффициент накопления, а функциональной — коэффициент кумуляции, рассчитываемый по определенной методике.

Мы предлагаем для исследования функциональной кумуляции 30-суточный опыт, ибо в экспериментах, когда животные на протяжении нескольких недель находятся в среде, содержащей токсикант, организм способен к накоплению токсического воздействия, приводящему к развитию «поломок», вплоть до гибели организма. Метод основывается на установленной связи количественного показателя функциональной кумуляции, так называемого коэффициента функциональной кумуляции ( $K_{кум}$ ), и угла наклона кривой «концентрация — время гибели 50% животных» [9].

Экспериментальная часть методики состоит из 2 этапов.

Первоначально определяется концентрация, вызывающая гибель 50% рачков в течение 3 сут. ( $ЛК_{50}$ ). Для этого в сосудах (200 мл) приготавливают (без повторностей) серию концентраций исследуемого вещества с заранее выбранным коэффициентом разбавления. Затем в каждый сосуд помещают по 6 шт. 4-дневных дафний из синхронизированной культуры, и на 3-и сут. опыта в каждом сосуде отмечают число выживших рачков. Определяют среднелетальную концентрацию ( $ЛК_{50}$ ) либо графическим методом [2], либо расчетным [4].

Второй этап связан с исследованием 6 концентраций (трехкратная повторность) от  $ЛК_{50}$  включительно до 0,00032 мг/л  $ЛК_{50}$ , полученных разбавлением с коэффициентом 5. В каждый экспериментальный сосуд (500 мл) помещают по 10 шт. 4-дневных рачков. Смена растворов производится через каждые 3 сут. Ежедневно в течение 30 дней отмечают число живых дафний. После завершения опыта для каждой концентрации оценивается время гибели 50% рачков [4]. В тех случаях, когда в опытных концентрациях не наблюдается 50%-ная гибель рачков, время гибели считается равным 30 суткам.

Затем оценивается количественный показатель функциональной кумуляции, так называемый коэффициент кумуляции —  $K_{кум}$ .

Вычисления проводятся по формуле

$$K_{кум} = \frac{6}{(10 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 3 \cdot 4 \cdot 5^{-3})} / 17,4387.$$

где  $t_0, t_1, \dots, t_5$  — время гибели 50% рачков ( $TL_{50}$ );  
числа 3 и 17,4387 — нормирующие величины, подобранные та-  
ким образом, чтобы коэффициент принимал  
значения от 0 до 1.

Оценка токсикантов по величине функциональной  
кумуляции выражается по следующей системе

Степень функциональ- ной кумуляции	$K_{\text{кпм}}$
Слабая	Выше 0,889
Средняя	От 0,671 до 0,889
Высокая	Меньше 0,671

Универсальность дафний как тест-объекта позволяет в боль-  
шинстве случаев удовлетворительно оценить токсичность вод-  
ной среды, а также кумулятивные свойства соединений. В то же  
время при определении характера исследуемого вещества опе-  
рируют преимущественно химическими и гидрохимическими ме-  
тодами. Большой интерес в этом плане представляет выявление  
групп животных, специфически реагирующих на определенные  
типы загрязнений. Успешное развитие таких исследований по-  
зволило бы полнее внедрить в токсикологическую практику раз-  
рабатываемые в настоящее время принципы биотестирования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В. А., Антипин Б. Н. Токсикологическая характеристика и сим-  
птомокомплекс острой фенольной интоксикации некоторых пресноводных  
ракообразных и моллюсков — Гидробиол. журн., 1976, т. 17, № 2,  
с. 37—43.
2. Бельский М. Т. Элементы количественной оценки фармакологического  
эффекта. Л., 1963.
3. Веселов Е. А. Патологические функциональные и морфологические изме-  
нения у пресноводных беспозвоночных и рыб под влиянием интоксика-  
ции. Байкальск, 1977, с. 111—114.
4. Закс Л. Статистическое оценивание. М., 1976, с. 598.
5. Каган Ю. С. О количественных критериях вредности химических ве-  
ществ — В кн.: Гигиена и токсикология пестицидов и клиника отравле-  
ний. Киев, 1965, с. 45—59.
6. Камшилов М. М. Экологические аспекты загрязнения водных объектов  
и принципиальные пути борьбы с ним. — Гидробиол. журн., 1979, т. 15,  
№ 1, с. 3—11.
7. Колосова Л. В., Строганов Н. С. Сравнительная токсичность металлор-  
ганических соединений для некоторых гидробионтов. — В кн.: Экология  
и биогеоэкология. М., 1974, с. 138—146.
8. Тесников Л. А. Дафнии как тест-организмы при установлении степени  
и характера влияния сточных вод на рыбохозяйственные водоемы. —  
Автореф. канд. дисс., Л., 1967.
9. Носов В. Н., Колосова Л. В. Кумуляция токсического воздействия вод-  
ными животными — Гидробиол. журн., т. 15, № 2, с. 63—67.
10. Строганов Н. С. Допустимые уровни загрязнения водоемов. — В кн.:  
Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водое-  
мов. Л., 1979, с. 57—65.
11. Строганов Н. С., Исакова Е. Ф., Колосова Л. В. Руководство по био-  
тестированию на дафниях. М., 1981.

Б. А. Флеров, Л. Н. Лапина

**ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ  
ПРИ ПОМОЩИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ  
(ТЕСТ — ОБЪЕКТ — *Hirudo medicinalis*, ПИЯВКА)**

Для оценки токсичности загрязняющих веществ в водоеме недостаточно данных гидрохимического анализа. Требуются интегральные, биологические показатели. Только вред, причиненный живому организму каким-либо веществом, может свидетельствовать о его токсичности. Определение вредного действия токсических веществ на гидробионтов и лежит в основе биотестирования.

Известны способы биологического анализа загрязненности вод, в которых тест-объекты помещают на определенное время в испытуемый раствор и по показателям их смертности судят о токсичности вод. Критерием присутствия в воде ядов являются изменения и других биологических показателей: способности к размножению, плодовитости, качества потомства, роста особей, физиологических и биохимических процессов, поведения. В основе предлагаемой методики лежат патологическое поведение животных и некоторые другие симптомы отравления, позволяющие не только указывать на токсичность испытуемой воды, но и распознавать присутствие определенной группы ядов.

Проведенное авторами сравнительное изучение симптомов отравления водных животных и их устойчивости к действию различных классов токсических веществ (хлор, фосфорорганических пестицидов, фенольных соединений, СПАВ и др. веществ) показало, что у некоторых из них, в частности у пиявок различных видов, проявляется характерная, специфическая для разных ядов картина отравления. Наряду с этим пиявки достаточно чувствительны к различным токсикантам. Наиболее яркие, характерные симптомы отравления наблюдаются у них при действии загрязняющих веществ антихолинэстеразного действия — фосфорорганических соединений и карбаматов.

Известно, что в последние годы происходит замена персистентных хлорорганических пестицидов на быстроразлагающиеся фосфорорганические. Последние высокоэффективны в борьбе с вредителями сельского хозяйства. Но они также представляют большую опасность и для теплокровных животных, включая человека.



Фосфорорганические пестициды попадают в водоем в результате сброса сточных вод промышленных предприятий, производящих ФОС, при авиаобработке сельскохозяйственных угодий и лесных массивов, неорганизованного стока с полей, подвергаемых обработке пестицидами, с водами дренажных систем и поверхностным стоком с заводских территорий.

Большое количество форм ФОС, а также большой объем их производства и применения вызывает необходимость быстрого обнаружения фосфорорганических соединений в водоемах при помощи методов биотестирования. Существующие методы (например, дафниевая проба) указывают только на токсичность загрязненной воды каким-либо веществом (включая и ФОС) для используемого тест-объекта. При этом принадлежность яда к той или иной химической группе веществ не устанавливается и, следовательно, трудно прогнозировать его влияние на других гидробионтов. Предлагаемый метод, использующий в качестве тест-объекта медицинскую пиявку, позволяет определять в воде конкретную группу токсикантов, а именно вещества антихолинэстеразного действия (ФОС и карбаматы). Использование этого метода расширяет возможности биоконтроля за сточными водами.

**Характеристика тест-объекта.** Выбор тест-объекта среди пиявок разных видов пал на медицинскую пиявку *Hirudo medicinalis* из сем. *Hirudinidae*. Эта пиявка достаточно чувствительна к действию ФОС (хлорофоса, армида), карбаматов (прозерина, эзерина, севина). Она проявляет в присутствии десятых долей мг/л этих веществ яркий, сугубо специфический симптомокомплекс отравления, отличный от такового в ХОС, феноле, СПАВ и других группах веществ. В европейской (южной) части СССР пиявку можно отловить в стоячих водоемах. Если такой возможности нет, их приобретают в аптеке. Размеры червей (длина 60—80 мм, вес 1—2 г) удобны для наблюдений за их поведением при токсикологических испытаниях. При этом требуется небольшой объем исследуемой воды (100—200 мл на особь).

Пиявки крайне неприхотливы к условиям содержания. Они месяцами могут обходиться без корма и находиться в воде без дополнительной аэрации. Содержать пиявок желательно в стеклянной посуде, заполненной на одну треть отстоянной водопроводной водой и плотно закрытой крышкой.

**Оборудование:** стеклянные сосуды емкостью 2—3 л для содержания пиявок, стеклянные банки на 200 мл с закручивающимися крышками для проведения опытов, сачки и пинцеты для ловли и переноса пиявок. Весы аналитические, фильтровальная бумага для обсушки червей, фотоаппарат зеркального типа «Зенит» с кольцами для микросъемки, термометр, мерные цилиндры, отстоянная не менее 24 ч водопроводная вода.

**Симптомокомплекс отравления пиявки антихолинэстеразными веществами.** При действии различных токсических веществ

у пиявки развиваются как специфические, так и общие симптомы отравления. Степень выраженности тех и других зависит от конкретного токсиканта, его концентрации, индивидуальной устойчивости подопытного животного.

К характерным специфическим симптомам отравления пиявки антихолинэстеразными веществами (ФОС и карбаматами) относятся следующие: подворачивание задних сегментов (рис. 1, позы 1—4), полное скручивание пиявки в спираль (поза 5), сильное сжатие диагональной и продольной мускулатуры (поза 6, 7), открытие глотки, ритмическое движение челюстей, заглатывание воды, увеличение объема и веса пиявки (поза 7—9), перед смертью изгиб червя дугой (поза 11—13).

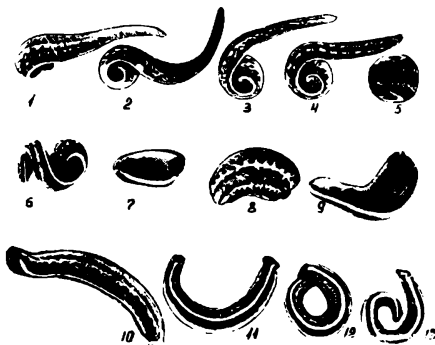


Рис. 1 Последовательность развития симптомов отравления у медицинской пиявки в хлорофосе. Объяснение в тексте.

Длительность латентного периода до момента наступления симптомов скручивания задних сегментов сильно варьирует для различных веществ. Например, в растворе 0,1 мг/л севина этот симптом проявляется через 45 мин, в то время как при такой же концентрации хлорофоса — через 30 ч. Зависимость латентного периода от концентрации токсиканта (хлорофос) показана на

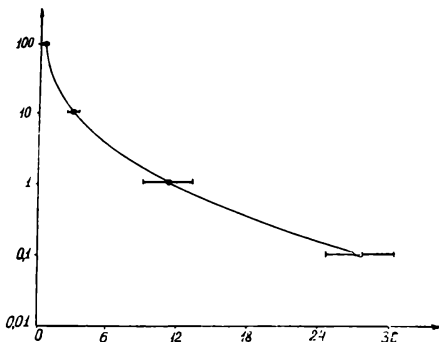


Рис. 2 Зависимость между временем наступления первого симптома отравления у медицинской пиявки и концентрацией хлорофоса  
По оси ординат — концентрация, мг/л, по оси абсцисс — время, час.

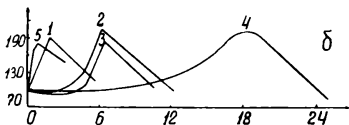


Рис. 3. Изменение веса медицинской пиявки в растворах хлорофоса 1 — 20 мг/л, 2 — 5 мг/л, 3 — 3 мг/л, 4 — 1 мг/л, 5 — Эзерин,  $5 \cdot 10^{-5}$  М.  
По оси ординат — изменение веса, %, по оси абсцисс — время, ч.

рис. 2. Чем выше концентрация яда, тем быстрее проявляется первый специфический симптом отравления — подворачивание и скручивание задних сегментов. На рис. 3 приведены графики изменения веса пиявок при отравлении хлорофосом. Увеличение веса соответствует стадии сжатия продольной мускулатуры, открытию глотки, работы челюстей и засасыванию воды пиявкой (рис. 1, поза 7). Падение веса, обусловленное усиленным

выделением мочи, происходит на стадии расслабления продольной мускулатуры (поза 10). Такое фазное изменение веса характерно только для антихолинэстеразных веществ. При действии же других веществ (фенола, ПХП) наблюдается постепенное нарастание веса.

К общим признакам отравления не только антихолинэстеражными ядами, но и токсикантами других групп относятся усиление дыхательных движений, выделение слюны, отрыгивание крови, появление слизи, гиперемии, очагов кровоизлияний, испражнений.

Регистрируя патологические реакции пиявки в испытуемых растворах, из общей совокупности наблюдаемых симптомов следует отбирать только специфические, характерные для группы ФОС и карбаматов. Именно они служат критерием присутствия этих соединений в испытуемых пробах. О наличии ФОС и карбаматов можно судить на основе даже одного первого симптома — подворачивания задних сегментов (рис. 1, поза 1—4). Проявление пиявкой более глубоких стадий отравления свидетельствует о значительных концентрациях яда в воде.

Прежде чем приступить к проведению биотестационных процедур, следует на практике изучить симптомокомплекс отравления пиявки каким-либо веществом антихолинэстеразного действия. Если в распоряжении экспериментатора имеется хлорофос, рекомендуем составить маточный раствор концентрацией 100 мг/л (по действующему началу) и путем дальнейшего его разведения получить ряд растворов: 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1 мг/л. В каждый из них поместить пиявку, предварительно обсушив ее фильтровальной бумагой и взвесив. В качестве контроля использовать животных, содержащихся в аналогичных условиях, но без токсиканта. Испытание низких разведений (ниже 1 мг/л) желательно проводить в 3—5 повторностях, имея в виду, что глубокие стадии отравления (поза 7, рис. 1) в них наступают редко. Весь симптомокомплекс наблюдается при концентрациях хлорофоса 1 мг/л.

**Проведение биотеста.** В 200-миллилитровые банки с закручивающимися крышками наливается доверху вода из водоема с определенной долей сточных вод, предполагаемых на содержание ФОС или карбаматов, или отстоянная водопроводная вода с определенным количеством испытуемого вещества. Обсушенную на фильтровальной бумаге пиявку взвешивают с точностью до десятых долей миллиграмма и помещают в банку, которую плотно закрывают крышкой. В качестве контроля используются пиявки, содержащиеся в аналогичных условиях, но без токсиканта. Испытание каждой пробы необходимо проводить на 3—5 пиявках при комнатной температуре в условиях рассеянного освещения. Попадание прямых солнечных лучей недопустимо. В момент фоторегистрации или визуального наблюдения освещение можно временно усиливать.

Проявление пиявкой первого симптома — подворачивания задних сегментов под брюшко (рис. 1, поза 1—4) указывает на наличие в испытуемом растворе ФОС или карбаматов. Для каждой подопытной пиявки фиксируется время наступления этого симптома; производится фоторегистрация (в полевых условиях не обязательна) и подсчитывается среднее время его наступления. Если по какой-либо причине первый симптом был пропущен и была зарегистрирована последующая стадия отравления (сжатие диагональной или продольной мускулатуры, рис. 1, поза 6—7), то желательно поместить пиявку в проточную чистую воду для того, чтобы вызвать явление обратимости и вернуть животное на предыдущую стадию отравления. Как правило, интоксикация ФОС необратима на стадии увеличения веса пиявки (рис. 1, поза 8, 9). Интоксикация, вызванная карбаматами, обратима в большей степени.

Если токсикант присутствует в воде в достаточно высоких концентрациях, происходит дальнейшее развитие симптомокомплекса отравления. После подворачивания задних сегментов пиявка не может покинуть банку, поэтому крышку снимают, дают доступ воздуху и продолжают наблюдение с целью получения дополнительных доказательств присутствия в пробе веществ антихолинэстеразного действия. К ним относятся прекращение активных движений, укорочение тела, открытие глотки и захватывание воды, разбухание и т. д. Укорочение тела — сигнал, что через некоторое время начнется увеличение веса пиявки и что необходимо производить взвешивание. Пиявку осторожно вынимают пинцетом из раствора, обсушив фильтровальной бумагой, взвешивают. Эта процедура повторяется через каждый час, пока вес пиявки не начнет падать. Фазное изменение веса — дополнительное доказательство присутствия антихолинэстеразных веществ и указание на их значительные концентрации (выше 1 мг/л). Регистрируется время наступления увеличения веса и подсчитывается прирост веса в процентах. Обычно при действии антихолинэстеразных ядов он увеличивается на 30—100%.

Если ни один из указанных симптомов отравления не проявился у тест-объектов в течение 48 ч его пребывания в испытуемом растворе, то считают, что раствор не содержит веществ антихолинэстеразного действия, по крайней мере в концентрациях, превышающих 0,1 мг/л, которые близки или соответствуют санитарно-гигиеническим ПДК этих веществ в воде.

И. А. Кондратьев

## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ

*Epischura baikalensis* Sars

### ПРИ БИОТЕСТИРОВАНИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

В современных условиях разработка и внедрение биотестов в практику контроля природных и сточных вод становятся одной из важнейших задач. Методы биотестирования требуют специальной разработки для различных регионов страны, так как для обеспечения нормального функционирования водных экосистем необходимо учитывать зоогеографическую и гидрохимическую характеристики водных объектов. В этой связи изучение антропогенного влияния на представительные, а также эндемичные виды гидробионтов актуально.

Наши многочисленные исследования по биондикации промышленных сточных вод проведены на Байкальском целлюлозно-бумажном комбинате (БЦБК) сульфатного типа. Отработанные промстоки предприятия после их трехступенчатой очистки (биологической, химической, механической) поступают в оз. Байкал. Основную биомассу зоопланктона уникального водоема (90%) составляет реликтовый рачок *Epischura baikalensis* Sars (Copepoda, Calanoida), лишь в отдельные годы уступая по численности *Cyclops kolensis* Lill. (Copepoda, Cyclopoida) [4]. Эпишура играет огромную роль в биотическом круговороте пелагиали Байкала, является мощным биологическим фильтром [3].

В ходе исследований предусматривалась разработка схем и методических приемов контроля за кондиционностью очищенного промстока с применением в качестве тест-объекта эпишуры. Задача также состояла в оценке степени токсичности сточной воды БЦБК для реликтовой формы зоопланктона.

Основным методом биотестирования был экспериментально-экологический анализ выживаемости эндемика под влиянием промстока и наблюдения за его метаморфозом. Схема проведения контроля включала варианты острой (48 ч) и подострой (5—40 сут) интоксикации тест-организма неразбавленной очищенной сточной водой и ее разведениями 1:16—1:20—1:32—1:50—1:100—1:200. Острые эксперименты проводились ежедневно и круглосуточно с целью получения экспресс-информации о качестве проводимой очистки. В более длитель-

ных опытах оценивалась пороговая кратность разведения промстока для прогностической оценки его влияния на водоем.

Материалом для опытов служили отловленные из оз. Байкал и адаптированные к лабораторным условиям особи эпишуры. Смена экспериментальных сред производилась ежедневно. Объем среды на 1 особь — 100 мл. Опыты проводились в полупроточных условиях. Колебания температуры составили 2—10° С. Гидрохимический состав сточной воды был известен по стандартным показателям. В качестве контроля и растворителя использовалась вода оз. Байкал.

Критериями оценки влияния промстока на эпишуру служили выживаемость разных возрастных групп эндемика (науплий, старших копепоидов, зрелых рачков) и метаморфоз личинок. Определение стадий развития личинок проводили путем их измерения до и после экспозиции в опытных средах, а также по морфологическим признакам [1].

Установлена нестабильность биокондиций очищенной сточной воды БЦБК. Однако устойчивость эпишуры к промстоку определялась не только степенью его токсичности. Выявлена различная норма реакции эндемика в экстремальных условиях среды в зависимости от его численности в водоеме по годам, а также в сезонной динамике. Отмечено повышение токсикорезистентности особей эпишуры к сточной воде в период массового развития вида в Байкале и ее понижение при его малой численности. Так, выживаемость эпишуры в пробах стока в год ее массового появления в озере колебалась в среднем за месяц от 20 до 70% при 48-часовой экспозиции. В год небольшой численности эндемика в водоеме регистрировали его гибель в интервале 2—48 ч. Согласно данным многолетних наблюдений, токсикорезистентность старших возрастных групп двух разных поколений эпишуры была наибольшей в июле и октябре, т. е. в период пиков их массового развития в озере 2.

Изучение влияния разбавленной сточной воды на выживаемость эндемика выявило летальность разведения 1:16 ( $CL_{100} = 14 \pm 3$  сут). Сравнительный анализ устойчивости эпишуры к разбавлениям стока 1:20—1:100 больших различий не обнаружил. Выживаемость рачков колебалась в пределах 15—30% при 25-суточной экспозиции. За этот же срок в контроле выживало 20—40% особей. Концентрация сточной воды 1:100, как правило, не оказывала достоверного влияния на выживаемость исследованных возрастных групп эндемика в 25—40-суточных опытах.

Наблюдения за метаморфозом личинок эпишуры свидетельствовали о возможности ее развития в разведениях 1:20—1:100 и контроле.

Таким образом, выявленные различия в степени токсикорезистентности эпишуры к промстоку, связанные с ее биологией и экологией в сочетании с большой индивидуальной чувствитель-

ностью эндемика, не позволили получить на этом тест-объекте результаты, объективно отражающие ход колебаний биокондиций протоста. В связи с этим рекомендовать эпишуру в качестве тест-организма для повседневного биоконтроля за качеством очистки протвод нецелесообразно. Исследования с эпишурой необходимо проводить для получения общей оценки токсичности сточной воды и корректировки предельно-допустимых концентраций при переносе данных на водоем

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьева Э. Л. Науплиальные стадии *Epiplatys baikalensis* Sars оз. Байкал — Изв. Сиб. отд. АН СССР, 1960, № 8, с. 103—112.
2. Афанасьева Э. Л. Биология байкальской эпишуры. Новосибирск, 1977. 137 с.
3. Галазий Г. И. Экосистема Байкала и проблема ее охраны. Природа, 1978, № 8, с. 44—59.
4. Кожов М. М. Биология оз. Байкал. М., 1962, 313 с.



О. П. Данильченко, Н. А. Тумалова

### **ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ ПО ФУНКЦИОНАЛЬНОМУ СОСТОЯНИЮ ИНФУЗОРИЙ СПИРОСТОМ**

Методика позволяет установить токсичность водной среды в течение первого часа наблюдений. Оценка функционального состояния спиростом после их часового пребывания в исследуемой воде выявляет концентрации (разведения) на уровне 5—10 ПДК, а после 2-дневного воздействия — на уровне ПДК для воды рыбохозяйственных водоемов.

В качестве тест-объекта используются спиростомы *Spirostomus ambiquum* Ehrbg. var. major, культивируемые в лабораторных условиях. Показатели функционального состояния спиростом: способность продольного сокращения в ответ на вибрационное раздражение и уровень двигательной активности [2—6].

Показателем уровня спонтанной двигательной активности служит число пересечений визира окуляра лупы МБС-1 в единицу времени (мин) — индекс двигательной активности. Способность инфузорий к продольному сокращению в ответ на вибрационное раздражение характеризуется двумя параметрами — относительным и абсолютным порогами возбудимости. Относительный порог — это напряжение, необходимое для первого сокращения, абсолютный порог — напряжение, при подаче которого с интервалом 12—15 с регистрируются 3 последовательных сокращения.

Среда для культивирования спиростом:  $\text{KCl}$  4 мг/л,  $\text{NaCl}$  30,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  7,5 мг/л. Культуру ведут в больших пробирках, пересевают один раз в неделю. В каждую пробирку после пересева добавляют 5 мг порошка пивных дрожжей.

Оборудование: установка для нанесения дозированного вибрационного раздражения [1], плексигласовая камера диаметром 6 мм, глубиной 0,4 мм и объемом 0,001 см<sup>3</sup>, укрепленная в лупе МБС-1 (4×12); пробирки (50 и 5 см<sup>3</sup>), часовые стекла, глазные пипетки, секундомер.

Параметры раздражения: частота 60 гц, длительность импульса 500 мкс, интервал между раздражениями 12—15 с.

**Проведение опыта.** Для проведения опыта инфузорий отсаживают в часовые стекла: контрольных — в ту же культуральную среду, подопытных — в исследуемую воду (раствор). Если изучается не вода, а химическое соединение, его растворы следует готовить на культуральной среде. Через час определяют функциональное состояние инфузорий по 10 особей из контроля и из исследуемой воды (раствора). В маленькие пробирочки отсаживают часть инфузорий для экспозиции в течение 2 сут.

Исследование функционального состояния спиростом проводят по следующей схеме: адаптация к условиям камеры (5 мин); определение уровня спонтанной двигательной активности (3—5 мин); определение относительного порога возбудимости; определение абсолютного порога возбудимости.

Для каждой исследуемой спиростомы все наблюдения записываем отдельно.

Для оценки функционального состояния из часового стекла пипеткой берем одну спиростому и помещаем ее в камеру под бинокулярный микроскоп. В первую очередь визуально изучаем внешний вид. В норме спиростомы имеют форму узкого вытянутого серпа. В условиях сильной интоксикации форма становится колбо- или грушевидной. Такие инфузории обычно неподвижны. Спиростомы, внешне не отличающиеся от контрольных, движутся по камере. По секундомеру определяем число пересечений визира окуляра лупы в течение 3—5 мин. Записываем точно время, в течение которого шло наблюдение.

С медленным нарастанием начинаем подавать напряжение, вызывающее вибрационное раздражение камеры и жидкости в ней. Записываем величину напряжения, при которой происходит первое сокращение инфузорий в ответ на подаваемый сигнал. Даем 3 таких сигнала с интервалом 12—15 с. Если нет 3 последовательных сокращений, увеличиваем напряжение. Регистрируем минимальное напряжение, вызывающее 3 последовательных сокращения.

Такие же исследования после истечения срока экспозиции проводим со спиростомами, помещенными в пробирочки на 2 суток. Показания можно снимать и в динамике с интервалом 12 ч. Параллельно изучаем и подопытных, и контрольных особей.

**Обработка экспериментальных данных.** Для каждой спиростомы определяем индекс двигательной активности в минутах. После этого вычисляем среднюю величину и выписываем минимальное и максимальное значение (размах изменчивости признака). Среднюю и размах изменчивости получаем для относительного и абсолютного порогов сокращения. Эти данные сводим в таблицу.

**Оценка результатов.** Токсичность исследуемой воды или раствора конкретного вещества может проявиться в ряде нарушений функционального состояния в зависимости от степени токсичности.

1. Изменение формы инфузории (обычно набухание), сопровождающееся потерей подвижности.

2. Отсутствие сокращения даже при подаче сигнала относительно большой силы. Например, у контрольных особей относительный порог сокращения равен 0,8 В, а абсолютный — 1,6 В. Подопытные особи не сокращаются даже при 10 В. Одновременно имеет место резкое уменьшение двигательной активности подопытных спиростом (в 1,5—2 раза по сравнению с контролем).

3. Снижение уровня возбудимости по сравнению с контролем. В этом случае увеличиваются (в 2 и более раз) относительный и абсолютный пороги сокращения, возрастает размах изменчивости. Двигательная активность подопытных особей тоже меньше, чем у контрольных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бресткина М. Д., Тушмалова Н. А., Хазен И. М. Зависимость выработки привыкания к вибрационному раздражению у *Hydra attenuata* от исходного функционального состояния. — Научн. докл. высш. школы. Биол. науки, 1978, № 5, с. 60—63.
2. Серавин Л. Н. Влияние химических агентов на двигательную и сократительную системы спиростом. — Научн. докл. высш. школы. Биол. науки, 1961, № 3, с. 65—67.
3. Серавин Л. Н. Особенности развития общего наркоза инфузорий спиростом. — Цитология, 1962, № 4, с. 52—58.
4. Серавин Л. Н. Двигательные системы простейших. Л., 1967. 332 с.
5. Серавин Л. Н. Контрактильные системы простейших. — В кн.: Движение и поведение одноклеточных животных. Л., 1978, с. 3—11.
6. Тушмалова Н. А., Доронин Ю. К. Анализ реакции привыкания как пример элементарной памяти. — Научн. докл. высш. школы. Биол. науки, 1971, № 4, с. 28—32.

М. Д. Бресткина, Н. А. Тушмалова, О. П. Данильченко

**ЭКСПРЕСС-МЕТОД  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ  
ПО РЕГЕНЕРАЦИИ . ПРЕСНОВОДНОЙ ГИДРЫ  
*Hydra attenuata***

В основу метода положена способность гидры к регенерации. Гидры прикрепляются к субстрату при помощи слизи, которую выделяют клетки, расположенные на подошве. После отсечения подошвы животные не способны прикрепляться и свободно лежат на дне. Критерием полной регенерации дистальной части тела служит вновь обретенная способность прикрепления к субстрату. В норме этот процесс завершается через 2 сут. Чувствительность данных, получаемых в результате 2-дневного эксперимента, находится на уровне ПДК вещества для воды рыбохозяйственных водоемов.

**Условия выращивания гидр.** В лаборатории гидр содержат при комнатной температуре (18—20° С) в кристаллизаторах, заполненных на высоту 2—3 см стандартной средой. Для предотвращения испарения жидкости его необходимо прикрывать крышкой или плоским стеклом.

**Состав среды для культивирования гидр:** хлористый кальций — 50 мг, хлористый магний — 50, бикарбонат натрия — 100, трилон Б — 50 мг, дистиллированная вода — 1 л. Такая среда обеспечивает оптимальные условия для жизнедеятельности гидр, но их можно содержать и в отстоянной водопроводной воде.

Кормят гидр живыми науплиусами *Artemia salina*, циклопами или дафниями 2—3 раза в неделю. Порцию корма (10—15 рачков на одну гидру) промывают на сачке чистой водой и вносят в кристаллизатор с гидрами. Через 1,5—2 ч, когда захваченные циклопы и дафнии уже находятся в гастральной полости гидры, необходимо сменить среду в кристаллизаторе, чтобы удалить погибших рачков. На следующий день среда меняется повторно для удаления непереваренных остатков. Признаком хорошего состояния культуры является почкование животных.

**Аппаратура.** Кристаллизаторы объемом 0,5—1,0 л. Бюксы объемом 20—30 мл. Микроскоп МБС-1. Микроманипулятор ММ-1. Стеклянные палочки диаметром 2 мм, длиной 50 мм.

Из этих палочек изготавливают операционные инструменты (рис. 1). Стеклянная палочка берется за оба конца и нагревается на пламени газовой или спиртовой горелки до состояния плавления стекла, затем быстро разводится, вытягивается до толщины конского волоса и разрывается. Для придания инструменту формы крючка тонкий конец палочки быстро проносят через пламя горелки, в результате чего он изгибается.

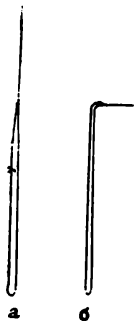


Рис. 1. Операционные инструменты.  
а — стеклянная палочка, б — стеклянный крючок.

**Проведение опыта.** Для опыта используют взрослых непочкующихся животных приблизительно равного размера с одинаковым уровнем пищевой возбудимости (последнее кормление за сутки до опыта). У гидр отсекают дистальную часть тела (стебелек с подошвой). Для этого гидру в капле среды помещают на предметное стекло и добавляют с целью обездвиживания каплю 3%-ного уретана. Через 3—5 мин, когда гидра ослабилась, стекло помещают под лупу (МБС-1) и при помощи микроманипулятора стеклянной палочкой прижимают к стеклу. При этом волосок располагается поперек тела гидры на границе стебелька и гастральной области (рис. 2). Проведя острым концом стеклянного крючка вдоль волоска, отсекают дистальную часть тела гидры. После отсека стебелька и подошвы животных необходимо поместить на 10—15 мин. в кювету с обычной средой, чтобы отмыть от уретана.

Гидр без подошвы и стебелька помещают по 10 шт. в бюксы с чистой средой (контроль) и исследуемой водой (раствором). Если готовится раствор или разведение сточной воды, для разведения используют культуральную среду. Опыт ведут в 3 повторностях.

В течение 72 ч наблюдают за состоянием и поведением контрольных и подопытных животных.

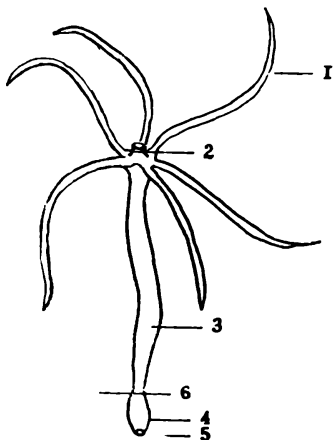


Рис. 2. Общий вид гидры.  
1 — щупальце, 2 — гиростом, 3 — гастральная полость, 4 —  
стебелек, 5 — подошва, 6 — линия отреза.

Гидры, регенерирующие в культуральной среде (контроль), в первое время свободно лежат на дне. Тело и щупальца у них вытянуты. Изредка можно наблюдать спонтанные сокращения щупалец и тела. Через 24 ч после отсечения подошвы больше половины животных оказываются прикрепленными к субстрату.

Все особи, и завершившие регенерацию и не завершившие ее, способны активно захватывать и заглатывать пищу. Кормить гидр можно через 24 ч после отсечения подошвы. Через 2—3 сут. после начала опыта у 90—100% контрольных животных происходит полная регенерация подошвы, и они прикрепляются ко дну и к стенкам бюкса или к поверхностной пленке воды.

Необходимо помнить, что скорость регенерации гидр зависит от температуры среды (при высокой температуре она идет быстрее), уровня питания животных и общего состояния культуры.

**Оценка результатов.** Через 12, 24, 48 и 72 ч после постановки опыта просматриваем бюксы и регистрируем состояние гидр в контроле и в исследуемой воде (растворе).

Показатели токсического действия при разной токсичности.

1. Через 1 ч после постановки опыта тело и щупальца гидр резко сокращены, они практически не реагируют на внешние раздражители. В дальнейшем происходит набухание и лизис тела и щупалец.

2. Через 1 ч — частичное сокращение тела и щупалец, в дальнейшем — набухание и лизис щупалец. Гидры не способны захватывать добычу.

Регенерация подошвы отсутствует.

3. Через 1 ч гидры не отличаются по виду от контрольных. Через сутки концы щупалец булавовидно утолщены, но животные способны захватывать пищу. Через 2—3 сут. подошва регенерирует лишь у части особей.

4. Внешний вид и питание подопытных гидр не отличаются от контрольных, однако к концу эксперимента подошва регенерирует у меньшего числа особей по сравнению с контролем.

Э. Г. Голубкова

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ПАРАМЕЦИИ

При биологическом нормировании путем определения ПДК предусматривается оценка токсичности препаратов на основные звенья биологического круговорота веществ в водоеме. Существенную часть микропланктона и микробентоса водных экосистем составляют простейшие. Они представляют обязательное звено в пищевых цепях беспозвоночных и промысловых рыб. Велико их значение в процессах самоочищения и искусственной очистки сточных вод. В практике токсикологических исследований до сих пор остаются малонизученными по вопросу воздействия на них различных загрязнителей. Методические рекомендации по использованию простейших отсутствуют.

Для определения токсичности некоторых сляймицидов, применяемых в целлюлозно-бумажной промышленности, мы использовали свободноживущую ресничную инфузорию *Paramecium caudatum*, которая имеет широкое распространение. Тестируемые концентрации от 1 г/л до 0,1 мг/л, показатели: выживаемость, размножение, питание, пульсация сократительной вакуоли.

Предварительные эксперименты были проведены с культурами популяции и клона, выращенными на сенном настое и минеральной среде Лозина — Лозинского. Установлено, что при одинаковых условиях культивирования (сенной настоей), наибольшей токсикорезистентностью по сравнению с клоном обладает исходная смешанная популяция инфузорий, а парамеции клональной культуры из минеральной среды гибнут в 2 раза быстрее особей из сенного настоя. Мы полагаем, что наибольшая устойчивость инфузорий из сенной культуры определяется свойствами самой среды, которая сглаживает проявление токсического действия органических соединений. Наибольшая устойчивость популяции связана с широким диапазоном варьирования признака и определяется различными генотипами, а у клона индивидуальной чувствительностью особей, так как генотип всех клеток клона идентичен.

Одним из важнейших экологических факторов среды явля-



ется температура. Результаты наших исследований, проведенные при 24—25, 12—13 и 4—5°С, свидетельствуют о том, что температура определяет не только количественные показатели физиологических функций парameций, но и их чувствительность к токсическим препаратам. С повышением температуры возрастает темп клеточного деления, скорость фагоцитоза и интенсивность пульсации сократительной вакуоли.

Методом острых тестов выявлено следующее. В зоне летальных концентраций от 100 до 10 мг/л повышение температуры снижает, а понижение, наоборот, повышает токсикорезистентность парameций, что находит свое выражение во времени выживания. С увеличением срока интоксикации повышается число погибших инфузорий и необратимо подавляются все их жизненные функции. По-видимому, в летальных растворах быстро повышается интенсивность воздействия среды и с самого начала подавляется адаптационный процесс. При необратимом угнетении всех клеточных функций наступает гибель организма.

Простейшие обладают неспецифической формой реагирования при остром отравлении. В летальных концентрациях нами выявлены 4 последовательные фазы интоксикации парameций. Как показали другие исследователи, фазы усиления и замедления движения являются универсальной реакцией простейших на внешние воздействия. Отмеченные нами III и IV фазы отравления (деформация тела, появление сферических вздутий на пелликуре, лизис клетки), описаны и для клеток тканей многоклеточных под влиянием химических агентов или изменений в среде. Следовательно, клеточная организация простейших позволяет проследить на них непосредственную реакцию клетки-организма в различной экологической ситуации. Нами установлено, что с понижением температуры и концентрации продолжительность отдельных фаз растягивается во времени, а обратимый характер имеют только I и II фазы, III и IV — необратимы.

Диапазон хронического действия (до 30 сут.) сляимицидов находится в пределах 5,0—0,1 мг/л. Метод физиологических тестов выявил высокую чувствительность исследованных функций. В слабых растворах парameции проявляют непосредственную реакцию на среду, при этом изменяются все их физиологические показатели. Установлен фазный характер этих изменений. Температурный фактор существенно влияет на реакцию одноклеточных к токсической среде. Обнаружено стимулирующее влияние на функцию размножения и пульсацию сократительной вакуоли при 12 и 24°С, при 4° — временное их торможение. Выявленные отклонения носят обратимый характер. При всех температурах фагоцитоз изменяется трехфазно: угнетение, стимуляция, восстановление. По-видимому, изменение условий существования в определенных пределах вызывает у парameций функциональные перестройки, которые направлены на компен-

ацию нарушений, вызванных воздействием внешней среды. Способность к метаболической компенсации характерна для различных уровней организации биологических систем в отношении многих факторов среды.

По нашим данным, фагоцитоз оказался наиболее чувствительным индикатором на содержание слаймицидов. Уже через 15 мин и в течение последующих часов при всех температурах проявляется подавляющее влияние на скорость формирования пищеварительных вакуолей. Следовательно, такой функциональный тест, как функция питания у парameций, позволяет в более ранние сроки выявить токсичность веществ, чем выживаемость и размножение. Особая чувствительность пищевой реакции парameций, по-видимому, связана с непосредственным раздражающим действием токсических веществ на функцию мембран цитофаринкса, поскольку известно, что значительное количество воды, а следовательно, и токсических веществ проникает в организм простейшего с пищей.

Острые и хронические тесты проведены на двух клонах парameций, взятых из одной популяции. Установлена различная токсикорезистентность инфузорий двух клонов, проявившаяся, особенно четко в острых опытах с препаратами: наиболее устойчивы оказались парameции клона 2. В нелетальных растворах различия проявляются в сроках наступления и продолжительности отдельных фаз усиления, ослабления и нормализации клеточных функций. Выявленные результаты представляют не только методический, но и теоретический интерес. Известно, что природная популяция у свободноживущих простейших возникает в результате преобладающего у них агамного размножения, что приводит к образованию клонов. Установлен феномен полиморфизма популяций по признаку теплоустойчивости. Можно предположить, что популяция парameций является гетерогенной по устойчивости к токсикантам, а различия клонов в токсикорезистентности определяются их генотипическими особенностями. Разные по всей устойчивости клоны могут иметь важное значение в экологии популяций, расширяя границы нормы реакции и усиливая их адаптационные возможности к различным, порой резко изменяющимся экологическим факторам.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют, что парameции обладают рядом очевидных преимуществ по отношению к другим гидробионтам, используемым в качестве тестов для биологического нормирования.

На них могут быть изучены как клеточные, так и организменные формы реакции на токсическое воздействие.

Отработанная методика культивирования парameций в любом заданном температурном режиме делает их доступными для экспериментальных работ в любое время года, что затруднено при использовании других токсикологических объектов.

Парameции характеризуются четкими и легкорегулируемы-

ми количественными показателями целого ряда физиологических тестов, а быстрая их функциональная реакция позволяет непосредственно судить о процессе нитоксикации.

Применение принципа клонирования дает возможность не только получить большое количество генетически однородного материала, но и использовать этот, качественно новый тест для изучения свойств гетерогенности популяции по их устойчивости к токсическим факторам.

Короткий жизненный цикл, быстрота размножения позволяют проследить реакцию на токсическое воздействие в относительно короткий срок в длинном ряду поколений, что значительно сокращает время определения допустимых концентраций для различных реагентов.

Все это позволяет использовать парameций для экспресс-методов при биологическом нормировании загрязняющих веществ.

Акцентируя внимание на необходимости сохранения фауны простейших, мы рекомендуем в комплексе исследований по научному образованию ПДК и токсичности стоков включить *Paramecium caudatum* как представительный организм протистофауны водоемов и очистных сооружений. Легко регистрируемые физиологические показатели могут учитываться не только в эксперименте, но и при оценке состояния инфузорий активно ила.

С. П. Рыбушкин

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОСТЕЙШИХ ПРИ БИОЛОГИЧЕСКОМ ТЕСТИРОВАНИИ КАЧЕСТВА ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ВОД

Роль простейших в природе, несмотря на их незначительные размеры, очень велика при естественной и искусственной очистке воды, в трофических звеньях биоценозов и как индикаторов сапробиости. В санитарно-гидробиологических исследованиях необходимо использовать в качестве тест-объектов организмы, которые широко распространены в природе, участвуют в процессах самоочищения вод и обладают коротким жизненным циклом, что позволит проследить результаты воздействия повреждающих факторов на потомство. Таким требованиям отвечают простейшие, в частности инфузория *Paramecium caudatum*, впервые предложенная как тест токсичности А. Е. Веселовым [1]. Инфузория туфелька относится к  $\alpha$ -мезосапробным индикаторным организмам, и ее присутствие может служить показателем сапробиости природных вод [7]. Парамеция неприхотлива при культивировании и сочетает в себе как черты сильно усложненной клетки, так и особенности самостоятельного организма. Возможность непосредственного наблюдения под микроскопом морфологических и функциональных реакций (синдромно-комплекс отравления, скорость фагоцитоза, осморегуляция) ставит ее в особое положение по сравнению с другими тест-объектами, по чувствительности к ядам она не только не уступает общепризнанному тест-объекту дафнии, но часто и превосходит [1]. Кроме того, как и многие простейшие, инфузории обладают быстрой реакцией на незначительные концентрации ядов, присутствующие в воде. Учитывая вышесказанные преимущества, мы рекомендуем использовать популяцию инфузории *P. caudatum* как тест-объект при биологическом тестировании качества воды.

В ходе исследований по выявлению токсичности воды, загрязненной различными компонентами стоков целлюлозно-бумажных предприятий, были разработаны различные методические варианты содержания культуры парамеций в опытных условиях [3].

Как наиболее эффективные и менее трудоемкие в полевых и лабораторных исследованиях можно рекомендовать варианты культивирования инфузорий на профильтрованной, условно чистой, озерной воде или на минеральной среде Лозина — Лозинского в сочетании с кормлением суспензией хлебных дрожжей. Воздействие загрязненных вод или токсических веществ на популяцию контролировалось по выживаемости, темпу деления, скорости фагоцитоза и работе сократительной вакуоли по общепринятой методике [4, 5].

При проведении острых опытов использовался ранее предложенный нами метод «изъятых капель» [2]. На часовое стекло наливалась среда Лозина — Лозинского в количестве, необходимом для приготовления определенной концентрации вещества. Пипеткой отбрасывалась капля среды, добавлялось нужное количество вещества, и раствор тщательно перемешивался, а затем на часовое стекло заносилась капля среды с густой культурой парameций. Таким образом, концентрация раствора при внесении парameций не изменилась, а «ударный токсический эффект» на особей практически исчезал. При использовании методического варианта постановки острых опытов, рекомендуемого Апостол [6], большое число парameций, в силу микрообъема опыта, вступают в непосредственный контакт с веществом с повышенной (в 10 раз) концентрацией при добавлении его к раствору. При проверке в наших опытах такие парameции часто выбрасывали трихоцисты и теряли подвижность, не возвращаясь в нормальное состояние, тогда как в аналогичных растворах по вышеуказанному варианту иммобилизации особей не происходило.

Большое значение в остром опыте имеет наблюдение симптомокомплекса отравления. При интоксикации сначала проявлялась фаза возбуждения, характеризующаяся быстрыми хаотическими движениями инфузорий, во второй фазе — относительного покоя — парameции обычно опускались на дно или пассивно плавали в поверхностной пленке раствора, иногда возобновляли слабые движения. Биение ресничек у многих особей продолжалось, но их активность и сила удара резко снижались. В третьей фазе — деформации — происходило изменение формы тела, сопровождающееся дополнительной вакуолизацией. В четвертой фазе — плазмолиза — у особей появлялись пузырьвидные выпячивания, а затем клетка разрушалась. Гибель особей констатировалась по полному прекращению биения ресничек и в случае плазмолиза. В острых опытах определялось среднее время гибели парameций через 15 мин, 1, 2, 3, 6, 12 и 24 ч, а также выявлялись сублетальные концентрации, в которых можно вести хронические опыты. Опыты проводились в течение 30 сут, за этот срок удается исследовать большое количество генераций. В хронических опытах популяция содержалась в бюксах. Объем раствора определялся исходя из расчета 0,1 мл

а особь. Для экспериментов целесообразно закладывать 2 ряда бюксов с опытными растворами. При угнетении размножения парамеций из одного ряда можно использовать для регистрации темпа деления и выживаемости, а из другого — для снятия физиологических показателей. В случае интенсивного прироста культуры, каждые сутки отсаживалось определенное количество парамеций, а при ее угнетении в свежий раствор пересаживались все особи. Среднесуточный темп деления определялся по сходному и полученному количеству особей. Скорость питания определялась по числу образовавшихся вакуолей за определенный промежуток времени «кормления» парамеций суспензией туши. Деятельность сократительной вакуоли определяли у инфузорий в микрокаплях по времени между двумя систолами.

Исследование популяций инфузорий в сочетании с одиночно культивируемыми особями в растворах токсикантов дает возможность выявить наличие или отсутствие «защитного эффекта» популяции, а также оценить его величину. Например, отношение числа выживших парамеций в популяции за определенное время к таковому у обособленных особей, при величине, равной единице, свидетельствует об отсутствии указанного эффекта. При значении показателя больше единицы отмечалось положительное проявление эффекта, и наоборот. Аналогично оценивалась функциональная резистентность особей в популяции по скорости питания, осморегуляции и темпу деления. Полученные данные могут быть использованы не только как дополнительный показатель при изучении токсического воздействия, но и при прогнозировании сохранности природных популяций различных гидробионтов в условиях антропогенного воздействия.

Предложенный метод тестирования качества природных вод с помощью популяции инфузории туфельки можно применять для оценки степени токсичности природных вод, загрязненных стоками различных предприятий или отдельными веществами, в санитарно-гигиенических исследованиях, а также при установлении рыбохозяйственных ПДК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Веселов Е. А. Использование инфузории туфельки для теста токсичности. — В кн.: Материалы 5-й медико-биологической конференции, Петрозаводск, 1969.
2. Рябухин В. П. К методике оценки токсичности некоторых компонентов сточных вод целлюлозно-бумажного производства с применением в качестве тест-объекта *Paramecium caudatum*. — В кн.: Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. Сыктывкар, 1977.
3. Рябухин В. П., Блинова М. Ю. Среда и фактор питания в токсикологических экспериментах с *Paramecium caudatum*. — В кн.: Проблемы водной токсикологии Петрозаводск, 1978.
4. Серавин Л. Н. Влияние растворов химических веществ на фагоцитоз *Paramecium caudatum*. — Вестник ЛГУ, 1957, № 3, вып. 1.

5. *Серавин Л. Н.* Изменение деятельности сократительной вакуоли *Paramecium caudatum* в зависимости от условий среды.— Вестн. ЛГУ, 1958, № 3, вып. 1.
6. *Apostol Simona.* Metoda testelor cronice de toxicitate pe protozoare — Stud. si cerc. biol. seria zool., 1972, vol. 24, N 3.
7. *Sladecek V.* System of water quality from biological point of view — Ergebnisse Limnologie (Arch. Hydrobiol.), 1973, vol. 7.

Л. П. Брегинский, С. Д. Бескаравайная

### **КИСЛОРОДНЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ И ДЕСТРУКЦИИ КАК БИОТЕСТ НА ПРИСУТСТВИЕ ТОКСИКАНТОВ**

Современный этап существования гидросферы характеризуется наличием в больших массивах природных вод более или менее отчетливо выраженного токсического фона. Как следствие влияния химического процесса на гидросферу, в водоемах присутствуют пестициды, тяжелые металлы, СПАВ, фенолы и др. токсиканты.

Таким образом, возникает необходимость изучать гидробиологические процессы на фоне присутствия токсикантов, влияющих на все звенья биологической продуктивности. В той мере, в какой это касается беспозвоночных и рыб, такие исследования в области водной токсикологии уже ведутся. Что же касается первичной продукции, то на это звено продукционного процесса, в особенности в пресных водах, с позиций водной токсикологии, обращено очень мало внимания.

Альгологи-фитопланктологи обычно ограничиваются оценкой видового состава, численности и биомассы фитопланктона на фоне традиционных показателей экологического фона (температура, pH, прозрачность и т. д.), не оценивая присутствия токсикантов, а важные экологические аспекты токсического загрязнения вод, необходимые для современной лимнологии, выпадают из поля зрения исследователей.

Целью настоящей работы являлось выяснение возможностей использования валового показателя жизнедеятельности водной экосистемы — первичной продукции и деструкции как биотеста на токсичность химических агентов.

На первом этапе выяснялись следующие вопросы:

- 1) отмечается ли существенное различие в действии на первичную продукцию неорганических и органических токсикантов;
- 2) каковы пороговые концентрации, достоверно снижающие показатели первичной продукции, т. е. могут ли эти показатели рассматриваться как тестовые;
- 3) какие показатели могут быть наиболее характерными для оценки влияния токсикантов на фитопланктон (валовая первичная продукция, деструкция, их соотношение, фотосинтетическая активность биомассы);



4) существует ли зависимость между видовым составом и функциональным состоянием фитопланктона и сдвигами первичной продукции при действии токсикантов.

Для решения указанных задач была использована модификация традиционного кислородного метода, сущность которой состояла в том, что в склянки, экспонируемые по обычной схеме, принятой при определении первичной продукции (светлые и темные), вводились различные концентрации токсикантов (от  $10^{-3}$  до  $10$  мг/л) и прослеживались различия в интенсивности процессов первичной продукции и деструкции в сравнении с контролем (аналогичные склянки) без токсикантов.

Опыты проведены на Тясминской экспериментальной базе Института гидробиологии АН УССР на Кременчугском водохранилище, а также на Киевском водохранилище при различном составе фитопланктона — в период смены сезонных аспектов, характеризующихся преобладанием диатомовых (весенне-летний планктон), а затем протококковых и сине-зеленых водорослей (летний планктон). Численность и биомасса фитопланктона и его отдельных компонентов в водоеме изменялись на протяжении сравнительно кратковременного периода исследований.

Для размещения склянок (объемом 200 мл) использовали небольшой заливчик, через который был протянут металлический трос. На нем с помощью зажимов Кохера подвешивались склянки в поверхностном слое воды. В зависимости от яркости солнечного излучения и др. обстоятельств экспозиция длилась от 6 до 10 ч (с 6 до 16 ч). По полученным данным рассчитывались величины продукции и деструкции за сопоставимое время и вычислялись индексы  $\Phi/D$  и  $\Phi/B$  (отношение фотосинтеза к биомассе). В качестве токсикантов использованы сернокислые соли цинка, меди и марганца, бихромат калия, фенол, хиноны, СПАВ (лаурилсульфат, хлорный сульфатол), СМС. Опыты ставились в 5-кратной повторности.

В приводимом иллюстративном материале результаты представлены в процентном выражении опыта к контролю. Отклонения от контроля порядка  $\pm 25\%$  рассматривались как недопустимые и в качестве индикаторных показателей во внимание не принимались.

Остановимся на основных результатах опытов.

**Тяжелые металлы.** Медь исследована в концентрациях  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ,  $5 \cdot 10^{-1}$  мг/л. В составе планктона в период экспериментов преобладали сине-зеленые, протококковые и диатомовые водоросли. Медь резко снижает интенсивность продуцирования кислорода фитопланктоном и одновременно — интенсивность деструкции: резко снижается фотосинтетическая активность биомассы, что в целом свидетельствует об альтицидном эффекте (табл. 1).

Таблица 1

Показатели первичной продукции и деструкции в опытах с препаратом меди, % к контролю

Показатели	Концентрация, мг/л		
	$10^{-2}$	$10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-1}$
Ф	10,6	4,2	17,3
Д	38,8	11,1	20,0
Ф/Д	27,2	3,8	8,6
Ф/Б	10,7	0,3	1,8

Примечание. Здесь и в табл. 2—7: Ф — фитопланктон, Д — деструкция, Б — биомасса.

Такой результат можно предполагать, поскольку токсическое действие меди на водоросли достаточно хорошо известно, и этот комплекс опытов может служить эталоном для оценки действия других токсикантов на фитопланктон.

Цинк исследован в концентрациях  $10^{-3}$ – $1,0$  мг/л (табл. 2). Из ожидаемым явилось то, что характер его влияния на фитопланктон оказался существенно отличным от характера действия меди.

Таблица 2

Показатели первичной продукции и деструкции в опытах с сернистым цинком, % к контролю

Показатели	Концентрация, мг/л			
	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$	1,0
Ф	58,7	111,1	102,1	31,4
Д	120,0	75,0	550,0	450,0
Ф/Д	48,8	147,9	18,6	6,9
Ф/Б	62,5	112,5	100,0	31,3

Достоверно угнетающее влияние на фотосинтез планктона оказывает только концентрация 1 мг/л, но специфической чертой воздействия цинка оказывалось резкое возрастание интенсивности деструкции — на 450–500%. Фотосинтетическая активность биомассы (Ф/Б) заметно снижается только в пределах концентрации 1 мг/л.

Хром использован в виде бихромата калия. В планктоне преобладали сине-зеленые водоросли (*Microcystis*, *Anabaena*) и др. Бихромат калия при концентрации  $10^{-2}$  мг/л и выше снижает как интенсивность фотосинтеза, так и деструкцию (табл. 3). При 1 мг/л фотосинтетическая активность биомассы составляет не более  $1/3$  контроля.

Таблица 3

Показатели первичной продукции и деструкции в опытах с бихроматом калия, %, к контролю

Показатель	Концентрация, мг/л			
	$10^{-2}$	$10^{-1}$	$10^{-1}$	1,0
Ф	108,6	68,0	46,0	36,9
Д	116,0	0,1	0,1	68,0
Ф/Д	—	—	—	—

Действие марганца (табл. 4) с достаточной достоверностью выявляется только в миллиграммовых концентрациях; ингибируется фотосинтез и возрастает деструкция, соответственно снижается фотосинтетическая активность биомассы.

Таким образом, анализ действия тяжелых металлов на первичную продукцию и деструкцию фитопланктона показал, что оно может выражаться в одновременном угнетении первичной продукции и деструкции, в ингибировании фотосинтеза без существенного изменения деструкции, в резком возрастании деструкции при относительно слабом угнетении первичной продукции.

Таблица 4

Показатели первичной продукции и деструкции в опытах с сернистыми марганцем, % к контролю

Показатель	Концентрация, мг/л			
	$10^{-2}$	$10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-1}$	1,0
Ф	111,9	121,9	77,7	32,8
Д	90,0	100,0	113,6	200,0
Ф/Д	123,2	124,7	68,5	16,7
Ф/Б	55,2	113,3	77,4	33,3

Уровень концентрации тяжелых металлов, при которых эти явления наблюдались, — от  $10^{-2}$  до 1,0 мг/л.

**Органические токсиканты. Фенол.** В опытах с фенолом в планктоне преобладали диатомовые водоросли (*Melosira*, *Stenophanodiscus*), биомасса которых превышала 90% от общей биомассы планктона. Фенол наиболее существенно влияет на показатели деструкции, оказывая своеобразное консервирующее действие на эти процессы при концентрации от  $10^{-2}$  мг/л (табл. 5); возможно, что это связано с его бактерицидностью; процессы деструкции тормозятся вследствие подавления бактериальной активности.

Таблица 5

Показатели первичной продукции и деструкции в опытах с фенолом, % к контролю

Показатели	Концентрация, мг/л			
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	1,0
Ф	66,1	88,9	66,7	66,0
Д	160,0	0	10,0	20,0
Ф/Д	—	—	—	—
Ф/Б	70,0	88,9	66,7	60,0

**Поверхностноактивные вещества.** В качестве эталона поверхностноактивных веществ испытан хлорный сульфанола на основе керосина — основная составная часть синтетических мощных средств.

В отличие от тяжелых металлов, заметное угнетающее действие на фотосинтез планктона проявляется только при миллиграммовых концентрациях, в особенности 5—10 мг/л (табл. 6).

Таблица 6

Показатели первичной продукции и деструкции в опытах с хлорным сульфанола, % к контролю

Показатели	Концентрация, мг/л			
	10 <sup>-1</sup>	1,0	5,0	10,0
Ф	125,0	68,4	41,6	26,3
Д	80,0	50,0	80,0	62,5
Ф/Д	156,2	13,4	52,0	42,1
Ф/Б	150,0	65,0	50,0	25,0

В этом диапазоне не снижается также интенсивность деструкции, но менее выражена, чем интенсивность фотосинтеза. Особенно заметно снижается фотосинтетическая активность биомассы при 10 мг/л хлорного сульфанола.

Специальные опыты на тест-культурах, поставленные с новыми немоногенными ПАВ — производными неонала, показали, что проявление токсического действия этих веществ на водоросли в диапазоне концентраций 1—10 мг/л носят выраженный фазовый характер в зависимости от концентраций и времени воздействия. Но каждое вещество имеет и свои специфические особенности, определенные его структурой. Поэтому подавление фотосинтеза водорослей поверхностноактивными веществами нельзя рассматривать как суммарную характеристику этого типа токсикантов;

среди них могут быть вещества и альгицидные и стимулирующие фотосинтез, причем и тот и другой эффект определяются, как и во всех других случаях, факторами концентрации и времени. Следует подчеркнуть, что параллельность в угнетении фотосинтетической активности (в тест-культуре) не наблюдается.

**Синтетические моющие средства.** Применяемые в быту синтетические моющие средства «Донбасс», «Лотос-71», «Эра», «Чайка» изучались в концентрациях 0,1, 1,0, 10 и 50 мг/л при различном составе фитопланктона.

Угнетающее действие на фотосинтез планктона было отчетливо выражено только при концентрациях СМС «Донбасс», «Лотос-71», «Чайка» 10 и 50 мг/л, тогда как СМС «Лотос» и «Эра» проявили стимулирующее действие особенно отчетливо при 0,1—1,0 мг/л (табл. 7). Однако эти эффекты весьма дина-

Таблица 7

Показатели первичной продукции и деструкции  
в опытах с СМС, % к контролю

Концентрация, мг/л	Ф	Д	Ф/Д
«Лотос»			
10 <sup>-1</sup>	131	174,2	126,3
1,0	160,6	114,2	19,25
10,0	132,1	85,3	86,50
50,0	85,3	86,5	13,2
«Лотос-71»			
10 <sup>-1</sup>	93	131	71
1,0	95,6	106	99
10,0	71,7	142	51
50,0	64,4	210	30
«Эра»			
10 <sup>-1</sup>	88	77	113
1,0	76	80	35
10,0	46	69	66
50,0	21	57	38
«Чайка»			
10 <sup>-1</sup>	94,3	68,5	138
1,0	58,9	113,8	51,8
10,0	28,2	78,5	35,6
50,0	9,7	66,9	140,8
«Донбасс»			
10 <sup>-1</sup>	116,3	31,2	372,0
1,0	86,3	93,4	92,2
10,0	63,5	126,0	62,5
50,0	21,6	62,5	19,0

мичны и зависят от периода исследований. Характер действия СМС, да и других токсикантов на первичную продукцию и деструкцию в значительной мере зависит от видового состава и функциональной активности фитопланктона. В период интенсивного развития диатомовых получают более четко выраженные эффекты, чем при их отмирании (в конце июня).

В равной мере различаются показатели кислородной продуктивности в период нарастания численности сине-зеленых водорослей (в конце июня) и в период их отмирания в июле-августе. На этом этапе фитопланктон практически не реагирует на воздействие токсикантов.

Указанные обстоятельства имеют немаловажное методическое значение и при постановке опытов по изучению первичной продукции фитопланктона и в нетоксичных условиях, что до сих пор недостаточно учитывалось. В периоды старения, массового отмирания и смены доминант фитопланктона интенсивность фотосинтеза фитопланктона резко падает, заметно преобладает деструкция. Эти явления более отчетливо выражены в высокоевтрофных водах, характерных для Днепра. Однако, очевидно, в любом случае при оценке первичной продукции должна учитываться сезонная периодичность фитопланктона, а для правильной постановки и интерпретации эколого-токсикологического эксперимента это имеет решающее значение.

Следует подчеркнуть, что ингибирование фотосинтеза связано с альгицидными свойствами веществ, с одной стороны, и с чувствительностью различных видов фитопланктона к этим веществам — с другой. Поэтому в зависимости от доминирующих компонентов в составе планктона одно и то же вещество может давать неоднозначный эффект.

Как видно из изложенного, наиболее отчетливо выражено влияние на первичную продукцию пресноводного фитопланктона тяжелых металлов и значительно слабее — органических токсикантов. Расхождения достигают 1—2 порядка и, как правило, концентрации, вызывающие эти реакции, выше установленных для этих веществ рыбохозяйственных ПДК. Последнее связано с тем уже, несомненно, доказанным фактором, что животные компоненты водных биоценозов значительно чувствительнее к токсикантам, чем фитопланктон.

Угнетение фотосинтеза планктона в качестве биотеста на токсичность воды должно поэтому рассматриваться преимущественно в связи с возможным влиянием тяжелых металлов, но этот показатель вряд ли может характеризовать присутствие таких токсикантов, как поверхностноактивные вещества или фенолы. Особого внимания заслуживает эффект резкого нарастания интенсивности деструкции, который может свидетельствовать как о разложении отравленного органического материала, так и стимулирующем действии токсиканта на развитие бактериальных компонентов планктонного биоценоза.

По-видимому, возможны несколько путей воздействия токсикантов на фитопланктон: лизис клеток (наиболее яркая форма интоксикации); снижение фотосинтетической активности биомассы вследствие ингибирования клеточных механизмов фотосинтеза; стимуляция деструктивных процессов. В зависимости от механизмов действия проявляется и эффект.

Бесспорно, что фитопланктон реагирует на воздействие токсикантов не как единое целое, и каждая эколого-систематическая группа или даже вид могут проявлять специфическую чувствительность или устойчивость к тем или иным токсикантам. Поэтому изменения первичной продукции под влиянием токсикантов теснейшим образом связаны с сезонной динамикой и экологическими сукцессиями в планктоне, а также с функциональным состоянием доминирующих форм. При анализе этих явлений открывается еще необработанное поле для совместных исследований альгологов-гидробиологов и водных токсикологов, поскольку лишь достаточно тонкий и глубокий анализ токсических эффектов на экологической основе может привести к пониманию роли токсикантов в формировании первичной продукции водоемов, а следовательно, и биопродукционных процессов в целом.

Таким образом, исследование первичной продукции и деструкции фитопланктона может быть использовано на токсичность при наличии в воде ионов меди (при биотестировании сточных вод гальванических цехов, сбросных вод обогатительных фабрик и т. д.). Эффект трактуется однозначно. Воздействие меди на фитопланктон приводит как к подавлению продукции кислорода, так и к глубокому подавлению деструкции, гибели при концентрации  $10^{-2}$  мг/л и выше.

В присутствии цинка характерной чертой является резкое возрастание деструкции; хром в концентрации  $10^{-2}$  — 1,0 мг/л заметно снижает продукцию, в концентрациях  $10^{-2}$  —  $10^{-1}$  мг/л угнетает деструкцию.

Органические токсиканты также проявляют дифференцированное влияние на первичную продукцию и деструкцию; фенол при концентрации  $10^{-1}$  —  $10^{-2}$  мг/л глубоко ингибирует деструкцию. Влияние ПАВ оказывается при концентрации больше 1,0 мг/л как на продукцию, так и на деструкцию.

Токсические эффекты в различной степени зависят от видового состава фитопланктона и степени его жизнеспособности. На стадии отмирания фитопланктона реакции извращены или отсутствуют.

В качестве тестовых показателей могут быть использованы величины валовой первичной продукции, деструкции и отношение Ф/Д.

### **ВОДОРОСЛИ И МАКРОФИТЫ КАК ОБЪЕКТЫ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**

Водоросли и макрофиты играют немаловажную роль в самоочищении природной и сточной воды от всякого рода загрязнителей. В свою очередь, они сами подвержены действию загрязнителей, вследствие чего их биологическая активность и численность зависят от качества и количества загрязнителей, от времени их воздействия.

Увеличение объема бытового стока, стоков промышленных предприятий и стоков с интенсивно удобряемых полей вызывают сильное развитие водорослей и макрофитов и евтрофикацию многих рек, озер, водохранилищ. Обилие развития растений в водоемах неблагоприятно сказывается на качестве используемой воды.

Возникает двойственная проблема: с одной стороны, водоросли и макрофиты участвуют в самоочищении воды и улучшении ее качества, а с другой, при массовом их развитии в присутствии загрязнителей, ухудшают качество воды. В связи с изложенными проблемами методы биотестирования качества вод с помощью водорослей и макрофитов весьма актуальны и являются неслучайным звеном в системе биотестирования сточных вод и оценки качества природных вод.

Организмы фитопланктона и макрофиты используются в качестве индикаторов благополучия или загрязнения водоема. Качественный и количественный состав фитопланктона и макрофитов отражает состояние водоема, тенденции их развития при усиливающемся загрязнении воды.

Биотестирование сточных вод можно проводить в лабораторных условиях на культурах протококковых водорослей (род *Chlorella* или род *Scenedesmus*) и сине-зеленых водорослей (роды *Anabaena* и *Microcystis*), а также на двух видах высших водных растений разного систематического положения — погруженном растении элодее (*Elodea canadensis* Rich.) и полупогруженном растении ряске (*Lemna minor* L.), являющимися наиболее обычными представителями большинства водоемов (рек, озер, водохранилищ) Советского Союза.



При определении влияния сточных вод и загрязнителей на водоросли и макрофиты используют экспресс-метод — достаточно быстрый, но менее чувствительный. Подробное изучение действия загрязнителей на водоросли и макрофиты преимущественно проводят в хроническом эксперименте. Такой подход к биотестированию дает возможность определить не только общую токсичность, но и возможный механизм действия загрязняющих веществ в малых концентрациях при длительном воздействии.

**Аппаратура.** Микроскоп МБИ-3, люминесцентный микроскоп М.1Д-1 (МЛД-2, МЛ-1, МЛ-2), спектрофотометр СФ-16 или СФ-4а, фильтр Зейтца, фильтр Шота № 3 или 4, мерные пробирки с притертой пробкой на 10—20 мл; мембранные фильтры № 5 — 2, камера Горяева, фарфоровая ступка, колбы Эрленмейера на 0,5—0,8 л, пипетки на 10,5, 1 и 0,1 мл, цилиндр на 0,5 л, лезвие, глазной пинцет, ученическая линейка, предметные и покровные стекла, кристаллизаторы и стаканы объемом 1 л.

**Опыты на водорослях.** В качестве экспресс-метода для определения токсичности сточных вод и загрязнителей используют лабораторные культуры водорослей, чаще всего протококковых (*Chlorella vulgaris* Beyer. и *Scenedesmus quadricauda* (Turr.) Gréb.), а также сине-зеленой водоросли *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenk. Длительность опыта 5—10 сут. (для веществ специфического действия — 10—15 сут). Действие ингибиторов фотосинтеза уже проявляется в первые трое суток эксперимента. Оценку действия острой токсичности следует проводить немедленно по визуальному состоянию культуры (побурение, посветление, лизис и т. п.), выживаемости (изменение общей численности клеток водорослей) и определению живых и мертвых клеток методом люминесцентной микроскопии (или с применением цитологических методов). Для детальной оценки токсичности можно рекомендовать дополнительно следующие физиологические показатели: определение фотосинтезирующих пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) и их соотношение; определение интенсивности фотосинтеза по выделению кислорода на свету и интенсивности дыхания по поглощению кислорода в темноте; определение продукции радиоуглеродным методом (или расчетным по кислороду); определение биомассы (весовой или расчетной по размерам клеток водорослей); расчет генерации (скорость размножения); интенсивность замедленного посвещения и др.

Водоросли выращивают в люминостате в колбах Эрленмейера емкостью 0,5—0,8 л (250—300 мл суспензии). Хлореллу и сценедесму следует выращивать на питательной среде Успенского № 1 следующего состава:  $\text{KNO}_3$  — 0,025 г/л,  $\text{MgSO}_4$  — 0,025,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  — 0,1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,025,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  — 0,0345 г/л, а микроцистис на среде Фитцджеральда № 11 в модификации Цендера и Горэма:  $\text{NaNO}_3$  — 0,496 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,039,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  — 0,076,  $\text{CaCl}_2$  — 0,036,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 0,020,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  — 0,058 г/л, желе-

30 лимоннокисл. — 0,006, лимонная кислота — 0,006, трилон «Б» — 0,001, микроэлементы — 0,08 мл/л (добавляются после стерилизации). Раствор микроэлементов:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  — 3,1 г/л,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 2,23,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,287,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,08,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,146,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,033,  $\text{KBr}$  — 0,119,  $\text{KI}$  — 0,083,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,154,  $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  — 0,198,  $\text{VSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,020,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$  — 0,474 г/л.

Водоросли хорошо растут при температуре 18—23° на естественном свете и досвечивании лампами дневного света (ДС-30 или ДС-40) в течение 9—12 ч. (освещенность до 3—5 тыс. лк) при постоянном перемешивании.

Для экспериментов используют альгологически чистые культуры водорослей. Токсиканты (или сточную воду) вносят в культуру водорослей в фазе логарифмического роста после некоторого периода адаптации (1—3 сут). Количество клеток во всех колбах должно быть одинаковое (не менее 1 млн. кл. в мл). Контролем служит та же культура водорослей без добавления токсикантов.

Наблюдения за состоянием водорослей проводятся на 1, 2, 3, 5, 10-е сут. Оценивается общее состояние культуры (посветление, побурение, лизис, изменение размеров, распад ценобиев и т. д.).

Основным критерием токсичности при действии загрязняющих веществ следует считать изменение численности клеток.

Общее число клеток водорослей считают в камере Горяева. При работе с камерой практически оказывается удобным просчитать число клеток водорослей в 25 больших квадратах, а затем провести пересчет на 1  $\text{см}^3$  по формуле  $X = m \cdot 10^6$ , где  $X$  — общее количество клеток,  $m$  — количество клеток (сумма) в 25 больших квадратах, т. е. достаточно общую сумму клеток ( $m$ ) в 25 больших квадратах разделить на 100 и умножить на  $10^6$ , чтобы сразу иметь число клеток в 1  $\text{см}^3$  суспензии водорослей. Одновременно производится подсчет делящихся клеток водорослей, что дает возможность оценить темп деления клеток водорослей при действии токсикантов. Количество клеток выражают в миллионах на 1 мл или в миллиардах клеток на 1 л.

Определение живых и мертвых клеток водорослей производится с помощью люминесцентной микроскопии. Микрокопируется обычный водный препарат, изготовленный на предметном стекле (или на мембранном фильтре). Для просмотра рекомендуется готовить препарат с концентрацией клеток, не превышающей 30—50 экз. в поле зрения. Достаточно для просмотра 0,5—1 мл суспензии водорослей. Более плотные пробы необходимо перед микрокопированием развести, чтобы удобно было вести счет клеток водорослей. В УФ-лучах жизнеспособные особи светятся ярким пурпурно-красным светом, отмирающие — различными оттенками тускло-красного и оранжево-красного тона, мертвые — желтовато-салатовым цветом. Зная процентное соотношение

живых, мертвых и отмирающих клеток и общую численность (счет в камере Горяева), вычисляют количество живых, мертвых и отмирающих клеток. Полученные результаты выражают графически: количество клеток водорослей в зависимости от времени воздействия токсиканта или концентраций.

С помощью метода люминесцентной микроскопии быстро устанавливается жизненное состояние клеток водорослей. Ранжируя клетки по интенсивности свечения, можно установить время воздействия токсикантов на водоросли, степень и скорость отмирания, поскольку лизис у разных видов водорослей проходит с разной скоростью и может зависеть в значительной степени от веществ, попадающих в воду. Степень токсического воздействия на водоросли зависит от времени взаимодействия водорослей с токсикантами, а также от накопления их клетками.

Одним из преимуществ метода люминесцентной микроскопии является быстрота оценки жизненного состояния клеток водорослей без какого-либо их повреждения. Из всех имеющихся и рекомендованных методов определения живых и мертвых клеток он наиболее экономичен во времени и более точен, поскольку позволяет за короткое время просмотреть большое количество препаратов на небольшом по объему материале. Преимущества люминесцентного метода по определению живых и мертвых клеток водорослей по сравнению с другими, например цитологическим, несомненны, особенно при ускоренном методе установления токсичности различных веществ для водорослей.

Токсичным считается такое воздействие, при котором отклонение показателей (численности и количества живых клеток водорослей) от контроля составляет более  $\pm 25\%$ . Для изучения максимальных безвредных концентраций токсических веществ для водорослей надо провести хронические опыты в течение 30—35 сут. с использованием физиологических и биохимических показателей (содержание фотосинтезирующих пигментов, интенсивность фотосинтеза и дыхания—по выделенному и поглощенному кислороду, расчет генераций, изменение размеров клеток, способ размножения и др.). Принцип постановки хронических опытов остается таким же, как и при проведении экспресс-метода. Изменения показателей в пределах  $\pm 5$ — $15\%$  при сравнении с контролем считаются безвредными, а концентрация, при которой наблюдаются эти изменения,— максимально безвредной.

**Опыты на макрофитах.** Высшие водные растения, элодея и ряска, используемые для биотестирования, отлавливаются из природной популяции условно «чистого» водоема, не подвергшегося воздействию загрязнителя. Отбираются жизнеспособные растения, в хорошем физиологическом состоянии: зеленые молодые верхушечные побеги элодеи длиной 4 см, без видимых повреждений, с неповрежденными точками роста, не имеющие боковых отростков и корней; в популяции ряска отбирают одна-

ковые экземпляры, имеющие по одной сформированной и одной развивающейся лопасти, одному корню с неповрежденным корневым чехликом и одинаковой длиной. Элодею (по 5 экз.) помещают в кристаллизаторы с 1 л раствора, ряску (тоже в количестве 5 экз.) помещают в стаканы с 500 мл раствора, приготавливаемого на воде из охраняемого водоема.

Проводится 10-дневный опыт по выживаемости растений для установления остротоксичных концентраций сточной воды или загрязнений ( $LC_{100}$  — для всех опытных растений или  $LC_{50}$  — для 50% растений). Для хронического опыта в качестве исходного раствора берут наименьшую концентрацию, при которой проявляется токсический эффект, так как безвредная концентрация для элодеи и ряски может быть установлена только в длительном хроническом эксперименте.

О степени токсичности веществ судят по следующим биолого-физиологическим показателям жизнедеятельности растений: состоянию растений, (побурение, отрыв листочков, разрушение побега и др.), выживаемости (число растений ряски или элодеи), приросту основного побега у элодеи, числу лопастей у ряски, числу боковых отростков и их длине у элодеи, числу и длине корней у элодеи и ряски, суммарному приросту элодеи (прирост основного побега + боковых отростков).

Воду для проведения опытов с элодеей и ряской берут из «чистого», охраняемого водоема или незагрязненных участков реки в районе выше города. Доставленную в лабораторию воду процеживают через воронку с планктоновым ситом (газ № 68) во избежание попадания простейших, колеровок и других организмов, и заливают в аквариум с постоянной продувкой воздуха. Воду для опыта можно использовать только через 4—5 дней после ее отстаивания.

В день постановки опыта из исходного раствора токсиканта делают 4—5 разведений в убывающем порядке (множитель 1/10), внося в кристаллизатор (стакан) нужное количество исследуемого вещества (мг/л). Предварительно отобранные растения элодеи и ряски помещают в опытные (речная вода + токсикант) и контрольные (речная вода) сосуды и размешают у окон на дневном рассеянном свете с южной стороны с освещенностью не менее 1500 лк. Рядом ставят стакан с термометром для измерения растворов.

Опыты ведут в летний период продолжительностью не менее 30 сут. с 3 повторностями при температуре 17—22° С. Смену опытных растворов проводят через 2—5 сут, одновременно меняют и воду в контроле. Учет и снятие биологических показателей в остром опыте проводят на 1, 3, 5, 7, 10-е сут, далее в хроническом эксперименте — через каждые 5 сут.

Наблюдения за общим состоянием растения проводятся в течение всего опыта. Визуально отмечают, какие растения изменили цвет и приобрели бурый или коричневый оттенок, у каких

произошло повреждение и отмирание точек роста. Так, при остром токсическом воздействии обычно наблюдают следующую картину: распад растений на отдельные мутовки и потерю тургора, что свидетельствует о гибели растений: при длительном токсическом воздействии растения могут частично изменить окраску: иногда цвет меняют только листья, а стебель и точка роста остаются зелеными, или зеленый цвет сохраняет только точка роста и т. д. Все изменения в состоянии растений записываются одновременно с изменениями биологических показателей. Погибшие растения удаляют, оставляют жизнеспособные, за которыми ведут дальнейшее наблюдение.

На основании данных, представленных на графиках или в таблицах, получают картину воздействия токсических веществ на элодею и ряску в диапазоне испытанных концентраций. По выживаемости растений устанавливают остро летальные (гибель в течение 5—10 сут) и хронические летальные концентрации (гибель на 15-е и далее сут). Отрицательным считается воздействие, при котором отмечаются значительные изменения (более чем на 25%) биологических показателей выживаемости растений, прироста основного побега, длины боковых отростков и корней, суммарного прироста растений. Наиболее чувствительными являются суммарный прирост растений и длина придаточных корней у элодеи, а у ряски — число и длина корней. Максимальная недействующая (безвредная) концентрация — концентрация, которая не вызвала в течение всего опыта существенных (более 25%) отклонений от контроля биологических показателей.

На основании проведенных экспериментов с водорослями и макрофитами устанавливаются концентрации веществ (или сточных вод), являющиеся безвредными для первичных продуцентов органического вещества: не наблюдается нарушений процессов фотосинтеза и дыхания, развитие водорослей и макрофитов в водоемах протекает нормально, без изменений.

## ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ КАК ТЕСТ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТОКСИЧНОСТИ ВОД

Одним из современных методов оценки физиологического состояния гидробионтов при воздействии токсикантов является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Явление магнитного резонанса наблюдается при совпадении частоты извне приложенного радиочастотного поля с частотой переходов между уровнями электронных магнитных моментов в постоянном внешнем магнитном поле. ЭПР наблюдается только от веществ, содержащих парамагнитные соединения. К их числу относятся соединения элементов переходных групп, свободные радикалы, молекулы в триплетном состоянии и другие. Длины волн для переходов между уровнями электронных магнитных моментов в обычно применяемых магнитных полях (тысячи, десятки тысяч эрстед) относятся к сантиметровому или миллиметровому радиодиапазону.

Применение метода магнитного резонанса основано на том, что, помимо извне приложенного постоянного магнитного поля, в котором наблюдается резонанс, в веществе существуют внутренние поля. Они могут привести к сдвигу резонанса, его расширению, расщеплению на несколько линий, т. е. к образованию спектра, к изменению формы резонанса, его интенсивности и т. д.

ЭПР позволяет проводить изучение фотоиндуцированных реакций в широком спектральном диапазоне действующего света как при комнатной температуре, так и при охлаждении объекта в тканях растительного и животного происхождения.

Поскольку водные растения содержат большое количество воды, которая, как оказалось, имеет высокую диэлектрическую проводимость, и вызывают значительное поглощение радиоволн сантиметрового диапазона, снижая тем самым чувствительность радиоспектра, необходимо работать с лиофильно высушенными препаратами или с замороженными образцами (диэлектрические потери у льда значительно ниже, чем у воды).

В хлоропластах высших водных растений и водорослях наблюдаются 2 фотоиндуцированных сигнала ЭПР, различающихся по своим параметрам: узкий бесструктурный  $\Delta H = 7-9$  гс, g-фактор — 2,0025 (сигнал I) и более широкий, обладающий

сверхтонкой структурой  $\Delta H = 20$  гс и  $g$ -фактор — 2.0046 (сигнал II). Сигнал I наблюдается только на свету при окислении светом фотоактивного пигмента  $P_{700}$  и быстро (в течение секунд) исчезает после выключения света. Сигнал II, обусловленный наличием в зеленых растениях хинонов и связанный с системой выделения кислорода, наблюдается в темноте, увеличивается на свету и после выключения света сохраняется в течение длительного промежутка времени (десятки минут).

Исследование фотонидуцированных сигналов ЭПР фотосинтезирующих организмов дает ценную информацию об окислительно-восстановительных превращениях молекул фотоактивных пигментов.

Для постановки и проведения опытов необходима следующая аппаратура: радиоспектрометр Е-4 фирмы «Вариан» для измерения суммарного сигнала ЭПР, микроскоп МБИ-3; центрифуга; ртутная лампа Дрш-1000 для освещения образца; колбы Эрленмейера на 0,5 л, кристаллизаторы на 1 л, набор пипеток (10, 5, 1 и 0,5 мл); счетная камера Горяева, пинцет, лезвие.

В качестве тест-объектов используют одноклеточную протококковую водоросль хлореллу — *Chlorella vulgaris* Beyer. и высшее водное растение элодею — *Elodea canadensis* Rich.

Водоросли культивируют в люминостате в колбах Эрленмейера на 0,5 л на среде Успенского № 1 (или на среде Тамня), освещенностью не менее 3000 лк и температуре 22—26° С.

Токсикант вносят в культуру водорослей в начальной фазе логарифмического роста после периода адаптации (1—2 суток). Токсическое действие вещества оценивают по изменению численности клеток в течение первых 5 сут ежедневно, далее — через каждые 5 сут. Счет клеток производят в камере Горяева под световым микроскопом: сначала подсчитывают количество клеток в 25 больших квадратах, а затем пересчитывают на 1 мл суспензии по формуле  $X = m \cdot 10^4$ , где  $X$  — общее число клеток в 1 мл,  $m$  — количество клеток (сумма) в 25 больших квадратах, т. е. общую сумму клеток  $m$  в 25 больших квадратах следует разделить на 100 и умножить на  $10^4$ , чтобы получить количество клеток в 1 мл суспензии водорослей.

Опыты с элодеей ведутся в кристаллизаторах объемом 1 л, на речной воде. Растения длиной 4 см помещают во все опытные и контрольные кристаллизаторы в количестве 5 шт. Смену растворов производят через 2—5 сут.

Токсическое действие вещества оценивают по выживаемости элодеи на 1, 2, 3, 5-е сут, далее через каждые 5 сут и по приросту растений — через каждые 5 сут.

Изменение концентрации свободных радикалов можно наблюдать значительно раньше, чем изменения биологических показателей. Отклонение концентрации свободных радикалов отмечается уже в первый час контакта с токсическим веществом. Поэтому наиболее целесообразно изучать динамику изменения

концентрации свободных радикалов в течение первых суток (часы) после внесения токсиканта.

Клетки водорослей отделяют от среды центрифугированием (1000 g). Для стандартизации размеров образца объекты (водоросли или элодею) помещают в стандартные пластиковые формы (трубки диаметром 3—4 мм), где они замораживаются в темноте при  $-196^{\circ}$ . В темноте измеряют сигнал фотосистемы I с g-фактором = 2,0046 и полушириной  $\Delta H = 19-20$  гс. При освещении образца фокусированным пучком белого света интенсивностью до  $5 \cdot 10^7$  эрг. (ртутной лампой Дрш-1000), регистрируют суммарный сигнал свободных радикалов I и II фотосистемы (на сигнал фотосистемы II накладывается сигнал фотосистемы I с g-фактором = 2,0025 и  $\Delta H = 8-10$  гс). Эти фотоиндуцированные сигналы ЭПР различны по полуширине, g-фактору и ответной реакции на освещение.

Данные ЭПР измерений приводятся в относительных единицах в виде соотношения  $R_{\text{ов}}/R_{\text{к}}$  ( $R_{\text{ов}}$  — концентрация свободных радикалов в опыте,  $R_{\text{к}}$  — в контроле) либо в пересчете на 1 млн. кл. для водорослей, либо на единицу воздушно-сухого веса для элодеи.

По полученным результатам на основании измерения суммарного сигнала ЭПР строятся кинетические кривые: на оси абсцисс — время, сут, на оси ординат — данные ЭПР (относительные единицы).

Форма кинетической кривой изменения концентрации свободных радикалов связана со степенью токсического действия вещества.

Так, при малых концентрациях токсиканта кинетическая кривая имеет 2 выраженных максимума, первый из которых наблюдается уже в первый же час после внесения токсического вещества и связан, видимо, с ответной реакцией клеток на смену среды. Второй наблюдается на 2—3-е сут и указывает на конец латентного периода развития скрытых патологических изменений, на начало необратимых нарушений в растительных клетках и совпадает с изменением биологических параметров под действием токсических веществ.

При более высоких концентрациях форма кинетической кривой другая: изменение концентрации свободных радикалов представлено кинетической кривой с одним максимумом, по времени совпадающим с началом достоверного снижения выживаемости.

Изменение концентрации свободных радикалов является чувствительным тестом для выявления скрытых патологических отклонений растительных объектов при действии токсикантов.

Метод может быть использован для биотестирования остро-токсичных вод.



### **БИОТЕСТИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИКАНТА НА ВОДОРΟΣЛИ ПРИ ПОМОЩИ ДЛИТЕЛЬНОГО ПОСЛЕСВЕЧЕНИЯ**

При попадании в воду токсических веществ у водорослей и макрофитов чаще всего наблюдается нарушение процессов фотосинтеза.

Метод регистрации длительного послесвечения (замедленной флуоресценции) водорослей и макрофитов при действии тех или иных загрязняющих веществ может быть предложен для быстрой оценки загрязненности водонисточников.

Явление фотохемилюминесценции (длительное послесвечение, замедленная флуоресценция) обнаружено у высших растений, водорослей и бактерий. Установлено, что явление длительного послесвечения связано с основными процессами превращения световой энергии при фотосинтезе: со скоростью переноса электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи и электрохимическим потенциалом на тилакоидной мембране. По изменению длительного послесвечения можно судить о величине реакции фотосинтетического аппарата на изменяющиеся условия окружающей среды. Характер этой реакции может быть использован для оценки состояния разных видов водорослей при воздействии на них различных загрязняющих веществ.

Спектр возбуждения длительного послесвечения соответствует спектру возбуждения фотосинтеза, а спектр испускания длительного послесвечения совпадает со спектром флуоресценции хлорофилла, квантовый выход которого, как правило, выше квантового выхода свечения не менее чем на 2—3 порядка. Выделение составляющей свечения из общей люминесценции возможно после некоторого темнового интервала, в течение которого флуоресценция хлорофилла полностью затухает. Послесвечение состоит из нескольких компонент, неодинаковых по природе и связанных с различными реакциями фотосинтеза.

Использование фосфороскопов с вращающимися секторными дисками или цилиндрами со щелевыми отверстиями позволяет измерять как стационарную интенсивность, индукционные явления, так и кривые затухания послесвечения с интервалом  $10^{-4}$  и  $10^{-1}$  с после продолжительного освещения.

Для регистрации послесвечения водорослей и макрофитов используют установку, включающую:

1) флуорескоп Беккереля, позволяющий освещать объект импульсами света длительностью  $1-2 \cdot 10^{-3}$  с с промежутками между ними по  $20-30 \cdot 10^{-3}$  с, в промежутках между импульсами возбуждающего света через  $1-3 \cdot 10^{-3}$  с после прекращения освещения в течение  $15-20 \cdot 10^{-3}$  с производится регистрация послесвечения;

2) осветитель — лампа накаливания 100 Вт, например КГМ-100 (освещенность объекта до 30 000 лк);

3) фотоумножитель, регистрирующий послесвечение в красной области спектра (ФЭУ-79 или ФЭУ-56, ФЭУ-38 и др.);

4) высоковольтный выпрямитель для питания фотоумножителя Б 5-24;

5) усилитель постоянного тока (рН-метр);

6) самопишущий потенциометр (используются портативные установки, включающие весь комплект приборов — п.п. 1—6).

Для подготовки образцов необходимы: микроскоп, лабораторная центрифуга, фильтр Зейтца, планктонная сетка (газ № 77), мембранные фильтры № 5—2, пипетки на 10, 5, 1 и 0,1 мл, цилиндр на 0,5 л, скальпель, ножницы, линейка, камера Горяева для счета клеток водорослей.

Оценку устойчивости водорослей к загрязнителям данным методом можно проводить как на естественном, так и культурном материале. Для определения замедленного послесвечения готовят суспензию водорослей с плотностью не менее 1 млн. кл./мл, если клетки водорослей очень мелкие ( $2-3$  мкм), то плотность должна быть значительно выше (более  $2-3$  млн. кл./мл). В последнем случае проводят уплотнение суспензии водорослей одним из методов: центрифугированием, фильтрованием (через газ № 77 для природного фитопланктона или через мембранный фильтр № 5 или 2 — для мелких культуральных форм водорослей) или отстаиванием (как для природных форм, так и для культур водорослей).

Общее число клеток водорослей считают в камере системы Горяева под световым микроскопом. Просчитывают количество клеток в 25 больших квадратах, а затем проводят пересчет на  $1 \text{ см}^3$  по следующей формуле:  $X = m \cdot 10^4$ , где  $X$  — общее число клеток в  $1 \text{ см}^3$ ,  $m$  — количество клеток (сумма) в 25 больших квадратах, т. е. достаточно общую сумму клеток ( $m$ ) в 25 больших квадратах разделить на 100 и умножить на  $10^6$ , чтобы сразу иметь число клеток в  $1 \text{ см}^3$  суспензии водорослей.

$0,2-0,5$  мл суспензии водорослей (или лист растения площадью  $0,3-0,5 \text{ см}^2$ ) помещают в кзарцевую кювету установки и регистрируют интенсивность длительного послесвечения у контрольного образца. После включения света наблюдают сначала высокий уровень послесвечения, который постепенно снижается (за  $0,5-2$  мин) к некоторому постоянному уровню (индукции).

онная фаза). Через 15—30 мин после введения токсиканта в исследуемой концентрации также регистрируют интенсивность послесвечения у водорослей и макрофитов.

Интенсивность послесвечения в зависимости от освещенности изображают графически.

Если диапазон отклонений стационарной интенсивности послесвечения в опытных вариантах (через 15—30 мин) составляет более  $\pm 21\%$  от контроля, то это указывает на возможность в дальнейшем глубокой поражаемости процессов фотосинтеза при действии токсических веществ. В таких случаях наиболее вероятно необратимость реакций длительного послесвечения и конечным итогом будет гибель водорослей и макрофитов или значительное снижение общей численности клеток водорослей. Изменение интенсивности свечения в 3—4 раза у опытных образцов по сравнению с контрольными обычно свидетельствует о полном подавлении фотосинтеза под действием данного токсиканта. В таком случае в природных водоемах при воздействии загрязняющих (токсических) веществ или сточных вод будет нарушен энергетический баланс, приводящий к нежелательным изменениям трофики водоема и ухудшающим в конечном итоге качество воды.

Описанный метод может быть использован в качестве экспресс-метода для биотестирования вод, содержащих различные окислительные вещества, оказывающие влияние на процессы фотосинтеза (тяжелые металлы, гербициды, фунгициды, альгициды и др.).

О. М. Кожова, С. С. Тимофеева

## ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В СИСТЕМЕ МОНИТОРИНГА

Проблема охраны и рационального использования вод имеет исключительно важное значение для Сибири с ее уникальными водоемами, такими как Байкал, Ангара, Лена, Енисей. Запасы ресурсов и дешевая электроэнергия — реальная основа для развития важнейших отраслей промышленности.

Развитие производительных сил, в том числе водоемких производств и связанное с этим загрязнение водоемов промышленными, сельскохозяйственно-бытового и сельскохозяйственного назначения выдвигает перед учеными Сибири задачи разработки научно обоснованного прогнозирования последствий антропогенных воздействий на водоемы и водные экосистемы с учетом отдаленных генетических эффектов, задачу разработки биологически обоснованных рекомендаций, обеспечивающих охрану и рациональное использование водных ресурсов Сибири.

Для объективной оценки биологических последствий антропогенных воздействий на экосистемы и биоценозы водоемов наряду с традиционными наблюдениями необходимо расширить экспериментальные исследования, позволяющие оценивать различные токсические и генетические эффекты антропогенных воздействий на организменном, популяционном и видовом уровнях.

В научно-исследовательском институте биологии при Иркутском государственном университете им. А. А. Жданова на протяжении 10 лет ведутся исследования по разработке биологических тестов, пригодных для токсикологической и токсикогенетической оценки антропогенных нагрузок на водоемы.

Главным объектом токсикологических исследований являются водоросли, прежде всего байкальские, среди которых исследуются некоторые и эндемические виды [2–4].

Основное внимание сосредоточено на оценке токсического действия сточных вод сульфатцеллюлозных предприятий, как самых плагоемких и представляющих для региона Восточной Сибири наибольшую опасность, а также отдельных наиболее ток-

сичных компонентов протоплазмы — фенольных и сероорганических соединений.

В качестве основных критериев токсичности рассматриваются наиболее чувствительные функционально-динамические характеристики состояния растительной клетки, а именно, движение протоплазмы харовых водорослей и движение клеток зеленых водорослей — дюналиеллы. Эти явления часто используются в физиологии для оценки жизнеспособности и в качестве индикатора, характеризующего ответную реакцию клетки на внешние воздействия.

Экспериментально в специальных исследованиях доказано, что прекращение движения протоплазмы является первичным нарушением по сравнению с другими критериями клеточной физиологии, например изменением вязкости, потерей клетками способности к плазмолизу — деплазмолизу, накоплению прижизненных красителей, изменению интенсивности свечения хлорофилла и многие другие.

Предлагаемые водорослевые биотесты отличаются высокой чувствительностью, простотой технического исполнения, не требующей дорогостоящего оборудования. Культивирование водорослей не представляет больших трудностей, так как дюналиелла весьма неприхотлива.

Используемые биотесты оказались весьма полезными при оценке соотносительной токсичности фенольных соединений и позволили выявить ряды токсичности, доказать факт высокой токсичности многоатомных фенолов и выяснить причину этого явления, подтвердить мнение о том, что во многих случаях опасно не столько само вещество, сколько продукты его трансформации, образующиеся в процессе разрушения токсикантов в воде. В наборе биотестов, применяемых для оценки токсикантов, надо иметь и такие, которые бы позволили оценивать не только сиюминутную токсичность, но и потенциальную токсичность веществ, опосредованную продуктами трансформации. Именно на эти вопросы позволяют ответить предлагаемые нами биотесты.

В частности, показано, что наибольшую опасность для водорослей представляют те фенолы, которые легко трансформируются в хиноны, это прежде всего орто- и пара-изомеры полифенолов. Более того, установлено, что чем выше скорость окисления фенолов, тем он токсичнее для растений. Для водорослей, содержащих фермент, окисляющий о-дифенолы, более токсичны о-диоксibenзола. Мерой токсичности в этих случаях служит величина минимальной концентрации вещества, вызывающая остановку движения протоплазмы харофитов или клеток микроводорослей за определенный интервал времени (15 мин, 3 ч) или время, по прошествии которого отмечалась остановка движения [2—4].

Другое важное направление работ нашего института в плане

оценки отдаленных генетических последствий действия токсикантов разрабатывается в лаборатории токсикологической генетики [1].

Комплекс токсикогенетических и экологогенетических исследований в проблеме охраны окружающей природной среды включает, по крайней мере, следующие этапы:

1) выявление мутагенов среди антропогенных факторов, загрязняющих окружающую природную среду;

2) исследование молекулярно-генетических механизмов действия агентов на прокариотические и эукариотические организмы с учетом их видовой и экологической специфики;

3) исследование концентрационных зависимостей токсических и генетических эффектов химических соединений и их комплексов с использованием генетически удобных объектов и представителей конкретных экосистем;

4) экспериментальное и теоретическое моделирование особенностей функционирования популяций и биоценозов в условиях хронического и ограниченного действия агентов в диапазоне концентраций, воздействующих на природные сообщества;

5) прогнозирование биологических последствий антропогенных факторов из популяции, виды и экосистемы с учетом отдаленных генетических последствий.

Для решения намеченных задач необходимо создавать стимулчатые системы тестирования, включающие серию моделей, специально разработанных как на представителях гидробионтов, так и на генетически удобных объектах. Такая система включает бактерии (штаммы ТА 1535 и ТА 1538 — модель Эймса, широко применяемую при скринировании мутагенов), различные штаммы дрожжей — сахаромикетов (штаммы 1511V и 1ПГ61), дафнии и дрозофилы.

На сегодняшний день проведена оценка токсического и мутагенного эффекта фенолов, их смесей, сероорганических соединений, а также стоков БЦБК и показано, что на всех тестовых организмах стоки проявляют слабое мутагенное действие, но обладают широким спектром действия, они индуцируют цитогенетические нарушения и гснные мутации. С увеличением степени разбавления мутагенность промстоков снижается. 100-кратное разбавление промстоков является безопасным в токсическом и генетическом отношении. При определении генетической безопасности исходили из широко практикуемых в токсикогенетике представлений о возможности решения подобных вопросов на основе определения допустимой степени риска [1].

В НИИ биологии предполагается и развитие третьего направления в проблеме биомониторинга, а именно оценка влияния различных токсикантов на бактериальные процессы самоочищения в водной среде. Данное направление работ предусматривает использование в качестве объектов природных популяций микроорганизмов с применением в качестве критериев ток-

сичности общей численности микроорганизмов, количества сапрофитных бактерий, скорости размножения и продукции бактериальной биомассы радиоуглеродным методом.

В институте организована лаборатория биохимии гидрофитов, которая занимается изучением взаимодействия ксенобиотиков — загрязняющих токсичных веществ — гидрофитов, основываясь на молекулярно-биохимическом подходе. Как известно, воздействие всякого токсиканта на гидрофиты определяется его концентрацией, которая условно может быть разделена на метаболическую, угнетающую (промежуточную) и токсичную. Метаболическая концентрация может быть усвоена растениями путем включения в общий метаболизм без каких-либо серьезных последствий. Она может привести к активизации протекания тех или иных сторон обмена, и растение в конечном счете адаптируется к определенному количеству токсиканта.

Угнетающая концентрация вызывает нарушение обмена веществ и проявляется в изменении тех или иных функций, выбранных в качестве тестовых. Летальная концентрация токсиканта вызывает гибель растения сразу или за короткий промежуток времени. Так, например, при изучении действия фенольных токсикантов на харовые водоросли показано, что остановка движения протоплазмы харовых наблюдается через 15 мин при обработке растворами концентрации пирокатехина  $2 \cdot 10^{-3}$  М, гидрохинона  $2.5 \cdot 10^{-2}$  М, резорцина  $5 \cdot 10^{-3}$  М [2]. В то же время в растворах тех же фенолов в концентрациях  $10^{-4}$  —  $10^{-6}$  М и ниже харовые водоросли сохраняют свою жизнедеятельность и активно метаболизируют фенолы. Четко разграничить эти концентрации крайне трудно. Они будут меняться в зависимости от природы токсиканта, от вида и физиологического состояния макрофитов, времени воздействия свойств среды и многих других факторов.

Тем не менее, установив метаболические концентрации, можно мобилизовать внутренние резервы гидрофитов на детоксикацию загрязняющих веществ и использовать эту возможность при разработке новых способов очистки стоков и при выяснении роли флоры в процессах самоочищения вод. Эти исследования предполагается вести с привлечением методов химической ферментативной кинетики, математического планирования экспериментов, биохимических методов, позволяющих исследовать пути и способы детоксикации и ферментные системы, участвующие в этих процессах.

Итогом этих исследований на основе знания биохимических механизмов детоксикации будет разработка методов обезвреживания сточных вод путем создания очистных сооружений с посадками специально подобранных, устойчивых видов гидрофитов или разработка способов регуляции активности ферментных систем, ответственных за детоксикацию, и использование моделей ферментов, участвующих в этих процессах.

Вследствие такого систематического изучения на биохимическом уровне процессов взаимодействия ксенобиотиков и гидрорифитов могут быть рекомендации, обеспечивающие эксплуатацию природных ресурсов с минимальными отрицательными воздействиями на них и создание биологических методов очистки, обеспечивающих в конечном итоге сохранение экологического равновесия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кожова О. М., Павленко В. В. Биологические эффекты антропогенных воздействий, выявляемых в модельных экспериментах и прогнозирование последствий загрязнения водоемов с учетом отдаленных генетических эффектов.— В кн.: Исследование биологического действия антропогенных факторов, загрязняющих водоемы, Иркутск, 1979, с. 4—11.
2. (Стом Д. И.) Stom D. I. Influence of polyphenols and quinones on aquatic plants and their blocking of SH-groups.— *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1977, Bd 5, N. 3, S. 291—298.
3. Стом Д. И., Бобовская Л. П., Тимофеева С. С., Калмычков Г. В., Кожова О. М. Влияние фенолов и продуктов их окисления на водные растения и содержание в них сульфгидрильных групп.— Докл. АН СССР, 1974, т. 216, № 3, с. 698—701.
4. (Стом Д. И., Иванова Г. Г., Башкатова Г. В., Трубина Т. П., Кожова О. М.) Stom D. I., Ivanova G. G., Bashkatova G. V., Trubina T. P., Kozhova O. M. About the role of quinones in the action of some polyphenols on the streaming of protoplasm in *Nitella* sp. cells.— *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1974, Bd 2, N. 5, S. 407—412.



## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГАЗООБМЕНА ВОДОРΟΣЛЕЙ И БАКТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТА В ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДАХ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**

При разработке инструментальных методов биотестирования токсичности сточных вод и отдельных химических веществ в первую очередь важен выбор тест-объекта и тест-реакции на воздействие токсикантов. Поскольку практическая цель приборного биотестирования — быстрое получение сигнала о биологической опасности отводимых сточных вод для принятия мер по устранению причин их токсичности, тест-объект должен быть достаточно чувствительным к токсикантам, а его реакция на токсическое действие иметь короткий латентный период.

В этом отношении бактерии и одноклеточные водоросли являются теми тест-организмами, которые могут удовлетворить указанным требованиям. Они обладают рядом преимуществ перед организмами других систематических групп: многие виды бактерий и одноклеточных водорослей легко культивируются на жидких минеральных средах; их физиологическое состояние можно охарактеризовать достаточно широким набором показателей, многие из которых легко контролируются инструментальными методами; эти объекты имеют короткий цикл развития, что позволяет прогнозировать не только кратковременные последствия действия токсикантов, но и влияние на последующие поколения. Перечисленные особенности позволяют использовать микроорганизмы — бактерии и одноклеточные водоросли — в токсикологических исследованиях при оценке острой и хронической токсичности сточных вод и отдельных химических соединений.

Предлагаемый нами инструментальный метод биотестирования предназначен для оценки острой токсичности биологически опасных соединений. Он основан на регистрации изменения интенсивности газообмена водорослей и бактерий под влиянием токсикантов. Эта реакция широко используется в водной токсикологии [4]. Многочисленные исследования, проведенные на различных видах водорослей и бактерий, показывают, что многие химические соединения являются сильными ингибиторами газообмена микроорганизмов. К таким веществам относятся, прежде всего, тяжелые металлы, пестициды, фенольные соединения и др. Изменение активности газообмена является наиболее

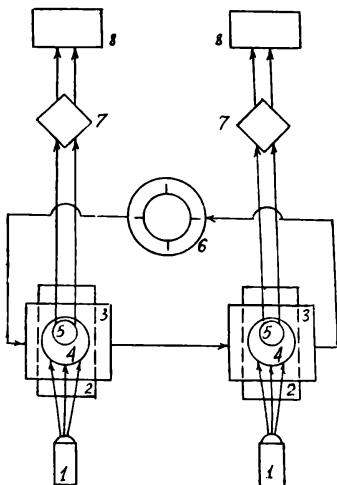


Рис. 1. Схема устройства для измерения скорости газообмена водорослей и бактерий.

1 — источники света, 2 — магнитные мешалки, 3 — термостатированные ячейки, 4 — стеклянные кюветы, 5 — датчики растворенного кислорода, 6 — ультратермостат, 7 — pH-метры, 8 — самопишущие потенциометры.

ранней и чувствительной реакцией на действие неблагоприятных факторов внешней среды [3].

Выбор нами этого показателя в качестве тестовой реакции обусловлен также тем, что технические аспекты измерения интенсивности фотосинтеза водорослей и дыхания бактерий в настоящее время не представляют трудностей. Разработанные электрохимические датчики растворенного кислорода закрытого типа позволяют проводить количественное измерение и регист-

рацию скорости фотосинтеза и дыхания бактерий как в дискретном, так и в непрерывном режимах, что существенно упрощает задачу создания на их основе автоматизированных устройств для оценки токсичности сточных вод и их ингредиентов.

Реализующее данный метод устройство (см. рисунок) включает 2 термостатированные, герметично закрывающиеся кюветы, каждая объемом 10 см<sup>3</sup>, датчики растворенного кислорода, подключенные к рН-метрам или иономерам, работающим в режиме нуль-индикаторов, источники света, магнитные мешалки и регистрирующие приборы [2]. Устройство монтируется из элементов и приборов, серийно выпускаемых отечественной промышленностью, что значительно облегчает применение представленного теста как в лабораториях, так и в производственных условиях.

В качестве тест-объектов в случае измерения скорости фотосинтеза используются чистые культуры водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. или *Chlorella vulgaris* Beyer, при измерении скорости дыхания — чистая культура бактерий *Pseudomonas denitrificans*. Водоросли выращивают в среде Успенского 1, приготовленной на водопроводной воде. Воду предварительно кипятят в течение 10—15 мин для осаждения солей, отфильтровывают осадок через крупнопористый мембранный фильтр и вносят соли в соответствии с рецептом. Объем вносимого в среду инокулята подбирают таким образом, чтобы первоначальная плотность культуры составляла 300—500 тыс. кл./мл. Инкубация длится 5—7 сут при температуре 21—24°С и интенсивности освещения 3—5 тыс. лк. Плотность развившихся культур к концу выращивания составляет 7—10 млн. кл./мл для *S. quadricauda* и 70—100 млн. кл./мл для *C. vulgaris*.

Бактериальную культуру *P. denitrificans* выращивают при температуре 25—27°С на среде следующего состава: MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0,5 г/л, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O — 0,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,1, NH<sub>4</sub>Cl — 2,5, глюкоза — 1,0, дрожжевой экстракт — 2,0 г/л, вода водопроводная, рН до стерилизации 7,4—7,5. Используют 18-часовую культуру с плотностью ~ 10<sup>7</sup> кл./мл.

Скорость фотосинтеза водорослей и дыхания бактерий определяют электрохимическим методом. О токсичности исследуемых веществ судят по снижению скорости фотосинтеза водорослей или дыхания бактерий в опытных пробах по сравнению с контрольными.

В процессе измерения фотосинтетической активности водорослей температуру в измерительных кюветах поддерживают на уровне 22—24°С, а при измерении интенсивности дыхания бактерий — на уровне 26—27°С. Датчики растворенного кислорода предварительно калибруют в мг О<sub>2</sub>/л. Расчеты цены деления диаграммной ленты потенциометров или шкалы рН-метров проводят по граничным значениям калибровочных графиков кислородных датчиков.

Перед проведением анализов культуру водорослей уплотняют путем отстаивания в течение 1,5—2 ч в слабо освещенном месте, после чего сливают 3/5 первоначального объема. К оставшимся в осадке клеткам приливают 70—100 мл свежей питательной среды. Уплотнение культуры можно также произвести путем фильтрации части объема через мембранные фильтры.

Определение скорости фотосинтеза в контрольных и опытных пробах проводят следующим образом. В опытную кювету вводят точно отмеренный объем сточной воды или раствора исследуемого токсичного соединения, в контрольную — такой же объем дистиллированной воды. Затем в обе кюветы приливают равные объемы уплотненной культуры водорослей. Общий объем жидкости в каждой кювете 10 мл. Заполнение кювет происходит при включенных магнитных мешалках.

После подключения датчиков к рН-метрам на лентах самописцев фиксируется первоначальная концентрация растворенного кислорода в опытной и контрольной кюветах. Эту концентрацию условно принимают за нулевую при расчетах скорости фотосинтеза.

Через 1—2 мин после подключения датчиков кюветы освещают источниками фокусированного света интенсивностью 7—10 тыс. лк. Время экспонирования кювет с контрольными и опытными пробами на свету составляет 15—25 мин. Длительность экспозиции определяется экспериментальным путем, исходя из степени токсичности испытываемых сточных вод или растворов химических соединений.

Процесс фотосинтеза фиксируется на лентах самописцев. Получаемые кривые характеризуют изменение концентрации растворенного кислорода, а следовательно, и скорость фотосинтеза в контрольной и опытной пробах.

Анализ скорости дыхания бактерий проводят следующим образом. В контрольную кювету вводят 8—9 мл 1%-ного раствора глюкозы в дистиллированной воде, в опытную — такой же объем раствора глюкозы в сточной воде. Глюкоза в данном случае является дыхательным субстратом, легко поддающимся окислению. На лентах самописцев фиксируют первоначальную концентрацию растворенного кислорода в обеих кюветах. Затем в них вводят одинаковые объемы (по 2 или 1 мл) культуры *P. denitrificans*, после чего концентрация растворенного кислорода в обеих пробах начинает снижаться за счет дыхания бактерий. Кинетика дыхания бактерий фиксируется на лентах самописцев. Процесс измерения дыхания длится до полного потребления кислорода в контрольной кювете.

Оценки результатов проводится по диаграммным кривым, характеризующим изменение концентрации кислорода в контрольных и опытных пробах за принятое время измерения. Скорость газообмена водорослей или бактерий выражают в относительных единицах, например, в мг/л выделенного или погло-

щенного кислорода за единицу времени:  $v = (C_0 - C_n) / t$ , где  $v$  — скорость фотосинтеза или дыхания,  $C_0$  — начальная концентрация кислорода,  $C_n$  — конечная концентрация кислорода,  $t$  — время. Разность  $C_0 - C_n$  учитывается по абсолютной величине.

Критерием токсичности исследуемой сточной воды или отдельных химических веществ считается любое, статистически достоверное снижение скорости газообмена водорослей или бактерий в опытных пробах по сравнению с контрольными.

Удобно выражать скорость фотосинтеза и дыхания в опытных пробах в % в контролю:  $\frac{v_0}{v_n} \cdot 100\%$ , где  $v_0$  — скорость фотосинтеза или дыхания в опытных пробах,  $v_n$  — скорость газообмена в контроле.

Предлагаемый метод позволяет провести оценку острой токсичности сточных вод в течение 15–20 мин в случае измерения скорости фотосинтеза водорослей и за 6–10 мин в случае измерения скорости дыхания бактерий.

Метод был применен нами для оценки токсичности ионов тяжелых металлов:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и сточных вод, содержащих тяжелые металлы, а также некоторых пестицидов (пропанида, пирамины и др.) [1]. Результаты апробации позволяют рекомендовать его для контроля токсичности сточных вод, содержащих тяжелые металлы, и сбросных вод оросительных систем, содержащих пестициды. Исследования по оценке токсичности других классов химических соединений на основе описанного метода продолжаются.

Таким образом, предложен инструментальный метод биотестирования токсичности биологически опасных соединений, основанный на регистрации изменения интенсивности фотосинтеза водорослей и дыхания бактерий. В качестве тест-объектов рекомендуются из водорослей — *S. quadricauda* и *C. vulgaris*, из бактерий — *P. denitrificans*. Разработано устройство, реализующее данный метод. Метод применим для оценки токсичности ионов меди, ртути, свинца, цинка, кадмия и некоторых пестицидов, а также сточных вод, содержащих эти токсиканты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крайнюкова А. Н., Журбенко И. З. Использование показателя фотосинтетической активности водорослей при оценке токсичности химических веществ и сточных вод — В кн.: Оценка и классификация качества поверхностных вод для водопользования. Тезисы. Харьков, 1979, с. 169–172.
2. Тозанский В. Р., Мацковский В. И., Савенко Д. В., Журбенко И. З., Курело Г. А. Устройство фотоактивное электрохимическое для оценки токсичности жидкостей. Заявка № 282 8889/25 от 5.11.1979. Положительное решение от 25.11.1980.
3. Полищук Р. А., Степанченко В. И. О выборе физиолого-биохимических показателей в качестве тест-реакции при токсикологических исследованиях — В кн.: Биология шельфа. Тезисы. Владивосток, 1975, с. 127–128.
4. Унифицированные методы исследования качества воды. Методы биологического анализа воды, ч. 3 М., 1976, 185 с.

## К ВОПРОСУ О БИОТЕСТИРОВАНИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

Концентрация животных в крупных хозяйствах является причиной образования значительного количества полужидкого и твердого субстрата, который (при различных обстоятельствах) поступает в водную среду, загрязняя ее. Сюда присоединяются смывы с территорий хозяйств, в состав которых входят горюче-смазочные вещества, антисептики и пр. Приемниками этих вод чаще всего служат мелкие ручьи и реки. Нагрузка на них по загрязнению значительно возросла. Исторически же сложилось такое явление, что эти водные объекты в определенной степени выпали из поля зрения гидробиологов.

В зависимости от мощности хозяйств количество образующихся стоков колеблется от 200 до 1000 м<sup>3</sup>/сут и более [1].

По ориентировочным подсчетам АН СССР, в хозяйствах страны ежегодно образуется такое количество навоза, которое эквивалентно количеству загрязнений, поступающих от 1,2 млрд человек и только половина его используется для удобрений.

Сточные воды от ферм крупного рогатого скота и свиноводческих содержат большое количество взвешенных веществ, аммиак, хлориды и пр. Они характеризуются высокими величинами БПК<sub>5</sub> и окисляемости.

В эпоху мощного антропогенного воздействия на природу лимитирующими факторами развития экосистем могут оказаться самые неожиданные явления, к которым можно отнести прежде всего токсичность аллохтонных и автохтонных веществ. Этот момент имеет непосредственное отношение к планируемым мероприятиям территориального перераспределения поверхностного стока.

Большое значение приобретают вопросы прогнозирования влияния антропогенных факторов на окружающую среду. Составление прогнозов сопряжено с огромными трудностями. Необходимо учесть различные взаимосвязанные природные и другие факторы.

Уже сейчас можно предполагать, что изменение количества воды будет связано не только с процессами переработки и из-

менения воздействия поверхностных стоков с грунтовыми водами, но и с выносом загрязнений из зоны изъятия. Поэтому в области режима поверхностных вод необходима уточненная оценка изменения их ресурсов под влиянием антропогенных воздействий не только на крупных водоемах, но и на их водосборной площади.

При составлении различных проектов перед предприятиями в настоящее время ставится условие полной биологической очистки от токсических веществ, но, к сожалению, в силу целого ряда факторов (отставание в строительстве очистных сооружений, нарушения режима их эксплуатации, аварийные ситуации) даже на Онежском озере уже сейчас констатируется наличие очагов загрязнения, влияние которых на озеро до сих пор полностью изучено.

Антропогенное изменение Онежского озера, так же как и Байкала, в связи с его уникальностью заслуживает особого внимания. Озеро имеет сложную систему циркуляционных течений, его водные массы гетерогенны, имеют определенные особенности температурного и химического режима.

Природные воды этого водоема характеризуются такими свойствами, как чистота и ультрапресность. В центральной части по содержанию растворенных веществ они пока являются сверхчистыми. Вода такой кондиции уже сейчас является валютой. Не следует забывать тот факт, что имеются и другие особенности. Малая мутность, высокая цветность, почти полное отсутствие щелочного резерва, низкие температуры затрудняют процессы коагуляции загрязнений вод этого водоема. Осложняются они и поступлением в Петрозаводскую губу Онежского озера притоком высокогумифицированных вод р. Шунь.

Известно также, что водоемы в зависимости от степени трофии обладают различной устойчивостью к токсикантам. Северные водоемы, бедные жизнью, особенно ранимы. Озеро в конечном счете является накопительной водной системой, поэтому даже при активных процессах самоочищения полной сбалансированности «прихода» и «расхода» загрязнений не будет, произойдет медленное, но непрерывное накопление, что в конечном итоге приведет к глубоким нарушениям экологической системы.

При прогрессирующем загрязнении водоемов важнейшей задачей остается проблема нормирования поступающих токсических веществ, хотя на фоне сложных экосистемных связей не легко вычленишь тот вклад, который вносят в функционирование экосистем антропогенные факторы.

В последние годы все более очевидной становится необходимость использования биотестов, которые в наиболее интегральной форме характеризуют пригодность водной среды для жизни гидробионтов.

Поскольку степень влияния сельскохозяйственных сточных вод на водоемы и водные организмы очень слабо изучена и не-

обходимо определение нагрузки загрязнений, поступающих не только непосредственно в водоем, но и на водосборную площадь, лаборатория гидробиологии ОВП Карельского филиала АН СССР приступила к изучению степени влияния сточных вод, поступающих на водосборную площадь Онежского озера, и в частности, с водами рек и речек, в которые поступают сточные воды целого ряда специализированных животноводческих комплексов (фермы крупного рогатого скота, свиноводческие, зерноводческие и др.).

На первом этапе работ с целью первичной инвентаризации проводится экспрессное биотестирование. В качестве тест-объекта используются ветвистоусые ракообразные.

Вторая задача исследований — экспериментальное определение влияния на организмы токсических веществ (детергенты, пестициды, нефтепродукты) в условиях различной степени биогенной нагрузки, поскольку вопросы токсикации и эвтрофикации водоемов решаются чаще всего отдельно.

Использование дафний в качестве индикаторов токсичности сточных вод животно-водческих комплексов (острые и хронические эксперименты) позволило констатировать тот факт, что сточные воды, поступающие от ферм крупного рогатого скота (760 коров) и свиноводческих (6300 голов), в ряде случаев не уступают по степени своего влияния сточным водам промышленных предприятий, например, целлюлозно-бумажных. Острые или хроническое действие на организм они оказывают в разбавлениях до 50—100 раз (ферма крупного рогатого скота). Зафиксированы случаи острой интоксикации дафний при 500—1000-кратном разбавлении (от свиноводческих ферм). Характер влияния различен, в ряде случаев наблюдается значительная стимуляция плодовитости рачков. Так, реальная плодовитость дафний в сточной воде от свинофермы при разбавлении 1 : 2000 возросла почти в 15 раз.

Применение биотестов в целях определения пригодности воды для рыбного хозяйства — дело не новое. В разное время использовались самые разнообразные методические подходы, но и на сегодняшний день полного ответа на вопрос, какие организмы и их реакции могут служить биотестами, нет. Это, в первую очередь, можно объяснить теми широкими требованиями, которые предъявляются к биотестам. Они должны быть достаточно информативны, отвечать на определенные практические задачи, быть удобными, доступными и простыми. В последние годы предпринимается попытка использования биотестов для автоматизированного контроля за качеством вод.

Многолетний опыт работы по биотестированию убеждает нас в том, что для получения более или менее достоверной картины о степени и характере влияния токсических примесей необходимо использовать группу представительных организмов, характерных для того или иного региона. Но в связи с тем, что



наиболее доступными и сравнительно легко культивируемыми объектами являются все-таки дафнии, они могут служить единой мерой токсичности или своеобразным эталоном. Нельзя сбрасывать со счета и то, что тест токсичности на дафниях позволяет решать довольно широкий круг биологических, физиологических и др. вопросов, поэтому эти организмы могут служить для токсикологов таким же ценным объектом, как дрозофила для генетиков.

Токсикологи Карелии используют в качестве тест-объектов простейших, олигохет, моллюсков, различных ракообразных, личинок насекомых, рыб. Состояние организмов оценивается по самым разнообразным показателям: выживаемость, пластический и энергетический обмен, изменение репродуктивной функции, тератологические показатели, гематологические, поведенческие реакции и др.

Такой подход дает более гарантированные основания говорить о наличии в воде биологически опасных веществ, оценить степень этой опасности, и в какой-то мере, выяснить механизм интоксикации.

Живой организм освобождается от токсических веществ путем выделения, разрушения, нейтрализации. Процесс этот сложен, и необходимо знание физико-химических реакций на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Организмы и их микроструктуры чрезвычайно динамичны и качественно неоднородны, но есть и общее — это прежде всего дыхательно-энергетические функции. Их поражение оказывается губительным для любого вида живых субстанций. Поэтому при поисках биотестов необходимо использовать реакции организмов, характеризующие изменение именно этой функции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев А. Г. Охрана рыбохозяйственных водоемов от загрязнения. М., 1975.

## БИОТЕСТИРОВАНИЕ ВОД, СОДЕРЖАЩИХ ПЕСТИЦИДЫ

Химические средства сельскохозяйственного производства прочно вошли в его технологию, являясь одним из основных факторов, оказывающих влияние на развитие сельского хозяйства. Это обуславливает неуклонный рост производства и потребления препаратов химического происхождения. В нашей стране в соответствии с «Основными направлениями экономического и социального развития на 1981—1985 гг.» запланирована поставка сельскохозяйственных средств защиты растений в количестве 650—680 тыс. т. Огромные масштабы производства и применения пестицидов приводят к загрязнению ими природной среды. К настоящему времени в окружающей среде обнаружено более 55 тыс. различных химических соединений, из которых 0,9% составляют пестициды, их метаболиты и родственные соединения. Биологически активные вещества с широким спектром действия, постоянно поступающие в окружающую среду, в значительных количествах становятся существенным фактором, воздействующим на природные комплексы. Наиболее уязвимыми оказываются водоемы, в которые пестициды поступают самыми различными путями. Особенно способствуют поступлению пестицидов в открытые водоемы коллекторно-дренажные воды орошаемого земледелия, содержание пестицидов в которых на 1—2 порядка выше, чем в поверхностном стоке [3]. ХОС выносятся до 1,2—11,5%, ФОС — 0,2—0,4%. Значительному загрязнению подвергаются водоемы, расположенные в районах с интенсивным ведением сельского хозяйства, в частности районах рисосеяния. В настоящее время около 80% посевов риса обрабатывается пестицидами, общий ассортимент которых включает до 8 наименований. Кроме того, в последнее время наблюдается тенденция применения пестицидов в комплексе и чередование их в течение вегетации риса. Широкий ассортимент используемых в рисоводстве агрохимикатов, а также возможность выноса их в водоемы рыбохозяйственного значения, что показано многими исследователями, требует интегральной оценки качества сбросных вод. Контроль, основанный

на гидрохимических определениях, довольно дорог и мало информативен, так как не оценивает биологический эффект загрязнения и результат взаимодействия попавших в воду веществ. Кроме того, многие из компонентов химических соединений не могут быть идентифицированы современными химико-аналитическими методами. Усложняет задачу также и то, что взаимодействие пестицидов, и особенно их метаболитов с естественными компонентами вод и между собой в сложных смесях, в большинстве случаев неизвестно и непредсказуемо. В связи с этим возникает необходимость развертывания работ по разработке и внедрению методов биологического тестирования, использующих водные организмы для мониторинга водоемов и оценки качества вод.

Согласно разработанной Всемирной стратегии охраны природы, принятой на 14-й Генеральной Ассамблее МСОП, направленность охраны природы постоянно будет нацелена на предотвращение, а не на устранение отрицательных последствий. В связи с этим большое внимание уделено вопросам мониторинга и планирования. С точки зрения развития менее дорогостоящих, но равным образом надежных систем мониторинга предлагается использовать отдельные виды фауны в качестве тестовых организмов.

В связи с тем, что вегетация риса требует постоянного регулирования уровня воды, включая частые сбросы ее в период прорастания семян, внесения удобрений и т. п. возникает необходимость получения экспресс-информации с целью контроля за качеством сбросных вод. Вместе с тем, действие комплекса препаратов, а также продуктов их распада, которые могут быть более токсичны, чем сами препараты, вступать во взаимодействие друг с другом, оказывая аддитивный или синергический эффект, способен оценить только метод биотестирования.

Несмотря на то, что препараты объединены в один вид загрязнителей согласно своему назначению, они составляют весьма разнородную группу веществ, отличающихся по физико-химическим свойствам, химической активности, стойкости, а главное по степени биологической опасности. Специфика действия пестицидов на гидробионтов заключается в гонадотоксическом, мутагенном, тератогенном эффекте, что чаще всего проявляется при хроническом действии малых концентраций. В связи с этим оценка опасности вредных компонентов сбросных вод для водных организмов и среды их обитания встречает определенные трудности из-за отсутствия достаточно чувствительных методов и критериев, способных дать информацию о токсичности среды, содержащей низкие уровни токсикантов, при экспресс-тестировании. Однако необходимость поиска принципов подхода к решению этого вопроса сегодня очевидна. Система контроля позволит прогнозировать загрязнение водных экосистем пестици-

дами и регулировать их использование. Такая система контроля, по-видимому, должна включать две неразрывные части: слежение за уровнем загрязнения и эксперимент.

При планировании контроля за качеством сбросных вод большое значение имеют данные об ассортименте применяемых пестицидов, их стойкости в водной среде и биологической активности, выбор тестовых организмов и методов исследования. Особую значимость для получения сопоставимых результатов имеет стандартизация методов проведения исследований. Стратегия определения токсичности вод, на наш взгляд, может основываться на анализе общетоксического действия среды на тест-объекты, выявлении характерных особенностей действия и специфических свойств среды, а также установлении коррелятивных связей между ранней реакцией организма при экспресс-тестировании и дальнейшим развитием интоксикации при хроническом действии этой среды. При этом степень токсичности на основании особенностей действия и глубины повреждения организма должна быть выражена в относительных единицах. Поскольку устойчивость гидробионтов зависит от характера действия пестицидов, от систематического положения, экологических особенностей, физиологического состояния, возраста, пола и стадии зрелости гидробионтов, то при биотестировании выбор тест-организмов необходимо проводить с учетом этих факторов.

Наши исследования, проведенные со многими пестицидами, позволили установить, что устойчивость одного и того же тест-объекта к разным препаратам неодинакова. Отмечено, что крупные одновозрастные рыбы (карпы и толстолобики) к прометрину более чувствительны, а к изофосу, напротив, более резистентны, чем мелкие. Самцы ко многим препаратам чувствительнее самок, к прометрину чувствительнее оказались самки. Большинство же полученных данных свидетельствуют о том, что рыбы на ранних стадиях развития более чувствительны к токсикантам, чем взрослые особи. Однако резистентность на ранних стадиях развития также весьма различна. Например, к изофосу наиболее чувствительны были личинки, а к прометрину — икра. При изучении токсичности прометрина для микроорганизмов, планктонных и бентосных организмов и рыб было установлено, что рыбы более чувствительны к этому гербициду, а к изофосу, абату и метатрону — наиболее чувствительны планктонные организмы.

В связи с этим набор тест-организмов должен включать гидробионтов разных таксонов и относящихся к разным группам чувствительности к большинству токсических веществ, что позволит получить предварительную оценку степени токсичности среды. Число тестовых организмов должно быть не менее трех. В полевых условиях для биотестирования воды важно иметь в качестве тест-объекта наиболее доступный и массовый матери-

ал, легко адаптирующийся к лабораторным условиям и быстро реагирующий на токсичность среды. В связи с тем, что реакция организма на воздействие токсиканта на каждой из стадий развития имеет свои особенности, которые проявляются в разной степени чувствительности к токсическому воздействию, при биотестировании следует ориентироваться на чувствительные стадии онтогенеза. Знание особенностей биологии организмов часто определяет направление поиска экспресс-методов, использующих чувствительные стадии их онтогенеза. Например, наши исследования на традиционном тест-организме *Daphnia magna* показали, что в момент линьки или сбрасывания покровов устойчивость рачков к токсическим агентам резко снижается. Как известно, в онтогенезе ракообразных стадия линьки является критической, поскольку в этот период наблюдается резкий сдвиг обменных процессов в организме [4] и, кроме того, меняются физические свойства карапакса [7]. Исходя из повышенной чувствительности дафний на стадии линьки, нами разработан метод биотестирования токсичности среды. Суть метода сводится к следующему. Дафнии незадолго до линьки (гонада и эмбрионы на 4-й стадии развития, по Л. А. Лесникову [6]) или сразу после вымета молодки помещаются в токсикант. Через 24 ч альтернативный ответ рачка «погиб — выжил» может служить показателем летальных или витальных концентраций, через 48 ч — концентраций, нарушающих эмбриогенез, т. е. метод позволяет дать оценку степени токсичности среды.

Кроме того, могут применяться методы, основанные на искусственном повышении чувствительности гидробионтов с применением шоковой нагрузки (например, гипосмотической или тепловой).

При расширяющемся применении ФОС, которые, как известно, подавляют активность АХЭ, может использоваться ацетилхолинэстеразный метод, широкоприменяемый в США в программе мониторинга [2]. Для оценки гонадотоксического действия среды можно использовать метод клеточных культур яичников рыб (разработан и опробован для оценки токсичности пестицидов С. Е. Дятловым [5]). Мутагенный эффект хорошо выявляется при анализе гигантских хромосом хирономид [1].

Оценка токсичности при экспресс-тестировании основывается на широком диапазоне показателей от изменений физиолого-биохимического характера, условнорефлекторных реакций до летальных эффектов. Однако следует выделить интегральные показатели воздействия — реакции на уровне целостного организма, обладающие «биологической значимостью». Для решения этой задачи необходимо изучить динамику подобных изменений, их последовательность возникновения в организме в периоды развития хронического патологического процесса. Стандартизация исследований по биотестированию в целях получения сравнимых данных позволит разработать балльную систему

оценки загрязнения среды, основанную на изменении показателей жизнедеятельности тест-организмов.

Многочисленные сведения о высоком уровне загрязнения сбросных вод рисовых систем определили поиск методических подходов к осуществлению контроля за их качеством. Наш первый опыт биологической экспертизы рисовой системы с использованием набора гидробионтов различных систематических групп был осуществлен в Краснодарском крае от чека до места сброса в рыбохозяйственные водоемы. Работа проводилась на экспериментальной базе ВНИИриса, некоторых лиманах Азовского моря, отдельных чеках и сбросных каналах колхозов и совхозов Краснодарского края в период максимального применения гербицидов. Выбор места проведения исследований на экспериментальной базе ВНИИриса был обусловлен тем, что в 1960 г. применялся один из перспективных противозлаковых гербицидов — сатурн, который сохраняется в воде чека в течение 40—60 дней, способен мигрировать с водой на значительные расстояния, загрязнять рыбохозяйственные водоемы, кумулироваться в тканях и органах рыб. Отбор проб воды для биотестирования проводили по предполагаемому пути миграции сатурна со сбросной водой от чека до р. Кубани, а также из коллектора и лиманов, принимающих значительную часть сбросных вод с рисовых и богарных земель — всего на 20 станциях. Методика биотестирования включала исследования продолжительностью 5—10 сут. Основным показателем была выживаемость. Закономерности на уровне смертельных эффектов поддаются более точному учету, так как самый момент гибели может быть установлен достаточно объективно. В качестве тест-объектов использовались ветвистоусые рачки (*Simosera phalus* sp., *Moina* sp.), водяные ослики, личинки поденок, моллюски (*Planorbis* sp.) и личинки рыб (черный, малоротый, большеротый буффало). В более длительных экспериментах основным тест-организмом была *Daphnia magna*, что позволило получить дополнительные данные по размножению рачков.

Биологическая экспертиза показала, что по степени токсичности вода рисовой системы располагается в убывающем ряду: чек, на том же уровне сбросной канал с ряда карт, затем общий сбросной канал, насосная станция и некоторое повышение токсичности воды в пойме реки, куда поступают сбросные воды системы. Результаты химического анализа остатков сатурна в воде рисовых систем согласуются с материалами по оценке токсичности вод методом биотестирования. Так, наибольшее количество сатурна было обнаружено в чеках, обработанных по сухому ложу из расчета 5 кг/га — 0,87 мг/л сатурна, в сбросных системах отмечалось постепенное снижение препарата и, например, в общем сбросном канале достигало 0,027 мг/л. В воде, сбрасываемой в пойму р. Кубани, определялось небольшое количество сатурна — 0,003—0,005 мг/л. Токсичность воды, по-ви-

димому, была обусловлена накоплением препаратов и продуктов их распада в грунте, что при сбросе создавало вторичное загрязнение воды. Несмотря на низкий уровень содержания сатурна, наибольшей токсичностью обладали воды главного коллектора, которые, вероятно, содержали целый комплекс агрохимикатов, используемых в рисоводстве и на богарных сельскохозяйственных угодьях. Об этом свидетельствовали высокий процент гибели тест-объектов и снижение показателей плодовитости *Daphnia magna* до 66% по сравнению с контролем. Биотестирование воды лиманов показало, что ее токсичность находится в зависимости от удаленности места сброса вод с рисовых и других сельскохозяйственных угодий. Так, вода лимана, принимающего коллекторно-дренажные воды, была токсична для высокочувствительных тест-организмов — *Simoescephalus* sp., личинок поденок, рыб, выживаемость которых на 5—10-е сут снизилась до 40—65% (содержание гербицида превышало ПДК в 20 раз). Вода более отдаленного лимана практически не токсична.

При исследовании качества вод сбросных каналов разных рисовых систем некоторых колхозов и совхозов Краснодарского края отмечалась разная степень токсичности воды для тест-организмов, что приводило к снижению выживаемости *Daphnia magna* от 70 до 30%.

В ходе экспериментов нами были использованы в качестве тест-организмов представители различных систематических групп водных животных. Наиболее чувствительными организмами оказались личинки рыб и ветвистоусые рачки, затем личинки поденок и наиболее устойчивыми — водяные ослики и моллюски. Однако, несмотря на высокую чувствительность, использование личинок рыб для биотестирования воды сопряжено с большими трудностями получения материала и применение последних в качестве биотеста в полевых условиях практически не осуществимо. Из ветвистоусых рачков самой высокой чувствительностью обладали *Simoescephalus* s. Их использование в кратковременных исследованиях на острую токсичность показало хорошую повторяемость и стабильность полученных результатов. Однако при длительной экспозиции в лабораторных условиях у этих организмов прерывалось размножение, снижалась выживаемость. В длительных экспериментах наилучшим тест-организмом оказались *Daphnia magna*, поскольку дополнительно к показателю выживаемости мы имели возможность проследить за их размножением. В ходе экспериментов нами установлено, что удобно использовать в подобных исследованиях также и 2—3-дневную молодежь рачков, так как это позволяет при длительных наблюдениях проследить за сроками наступления половозрелости, плодовитостью, ростом и т. п. Вид *Moina* sp. оказался непригодным для биотестирования, так как плохо адаптируется к лабораторным условиям.

Личинки поденок — чувствительные тест-организмы, их выживаемость в условиях лаборатории составила 90—100%. При этом нужно отметить, что при проведении подобных экспериментов следует отбирать личинок старших возрастов с зачатками крыльев, так как они лучше, чем младшие особи, переносят искусственное содержание.

Водяные ослики и моллюски, как известно, не являются высокочувствительными организмами. Их использование в наших исследованиях было обусловлено тем, что при действии некоторых веществ у этих организмов проявляются поведенческие реакции, связанные с миграцией из токсической среды. Однако при уровнях токсичности воды в наших экспериментах эти реакции не проявлялись.

Исследования показали, что по мере прохождения сбросных вод от рисового чека до рыбохозяйственного водоема токсичность воды постепенно снижается. Наибольшей токсичностью обладают воды, содержащие комплекс агрохимикатов. Оперативный комплексный контроль качества сбросных вод рисовых систем может осуществляться с помощью биотестирования воды. В полевых условиях для биотестирования воды нужно иметь в качестве тест-объектов наиболее доступный и массовый материал из естественных водоемов, быстро реагирующий на токсичность среды.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белянина С. И., Гудкова И. С., Кузьмина К. А., Федотова Е. А. О методах оценки размножения, плодовитости и состояния хромосомного аппарата в водной токсикологии. — В кн.: Проблемы и методы экотоксикологического моделирования и прогнозирования. Пушкино, 1977. Рукоп. деп. в ВИНТИ, № 532—78.
2. Воронова Л. Д., Попова Г. В., Пушкарь И. Г. Загрязнение водоемов пестицидами. — В кн.: Общая экология. Биоценология. Гидробиология (итоги науки и техники), т. 3, М., 1976.
3. Врочинский К. К., Телитченко М. М., Мережко А. Н. Гидробиологическая миграция пестицидов. М., 1980.
4. Голубев А. П. Роль экзувальных отторжений в балансе энергии мизиды *Parameysis lacustris* из Каунасского водохранилища. — В кн.: XIX науч. конф. по изучению и освоению водоемов Прибалтики и Белоруссии. Тезисы. Минск, 1977.
5. Дятлов С. Е. Влияние некоторых пестицидов на черноморских бычков и их клеточные культуры. Автореф. канд. дис. Одесса, 1980.
6. Лесников Л. А. Методика оценки влияния воды из природных водоемов на *Daphnia magna* Straus. — В кн.: Методики биологических исследований по водной токсикологии. М., 1971.
7. Conklin P. J., Rao R. R. Toxicity of sodium pentachlorophenate (Na — PCP) to the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, at different stages of the molt cycle. — Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1978, vol. 20, № 2.



Н. П. Мокеева

### **БИОТЕСТИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ СБРОСА В МОРСКУЮ СРЕДУ**

Морская среда издавна служила местом сброса отходов производства, сточных вод и грунтов, вынутых при дноуглубительных работах в судоходных районах, с целью захоронения. Еще в 1899 г. инспектор Инженерного корпуса в Нью-Йорке определил несколько точек в Нью-Йоркской бухте для сброса грунтов и отходов строительных материалов [4]. И в наше время многие страны, в том числе и СССР, практикуют сбросы материалов в морскую среду, причем около 80% всех отходов составляют грунты, ежегодный мировой объем которых достигает миллиарда м<sup>3</sup> [15].

До недавнего времени сбросы не документировали и не регламентировали. Лишь в 1972 г. в Лондоне на международной конференции была принята «Конвенция по предотвращению загрязнения моря сбросами отходов и других материалов», основная задача которой заключается в разработке научных обоснований регламентированных сбросов отходов, в том числе и грунтов, в отдельные районы морей. В 1979 г. к этой конвенции присоединилась и наша страна.

На Государственный комитет СССР по гидрометеорологии и контролю среды возложены обязанности выдачи по согласованию с Министерством рыбного хозяйства разрешений на сбросы, осуществление наблюдений за состоянием моря в районах сброса в соответствии с условиями конвенции и организация специальных научных исследований в связи с этой проблемой. Государственный океанографический институт является головным учреждением по их проведению.

До настоящего времени в нашей стране практически не изучали последствия сброса для морской биоты. Однако эти исследования необходимы, поскольку сброс материалов может вызывать серьезные нарушения в экосистеме в результате изменений условий жизни гидробионтов, снизить биологическую продуктивность отдельных районов, ухудшить санитарно-гигиенические условия в водах морей и океанов, привести к загрязнению морской среды и эвтрофированию больших акваторий.

Отрицательное воздействие сбросов на гидробионты может длиться годами, десятилетиями, продолжаться даже более ста лет и быть порой непредсказуемо. Во времена индустриализации северо-западной Англии промышленные шламы около г. Уэркингтона сбрасывали на берег, откуда они попадали в воду, опускаясь ниже уровня отлива и покрывая дно ковром. Спустя столетие, уже в наше время, в 60-е годы обнаружили эрозию поверхности этого искусственного покрова и высвобождение высокотоксичных концентраций металлов, сорбирующихся в отложениях вдоль берегов до г. Силлота, расположенного примерно в 30 км севернее Уэркингтона. Биологические исследования, проводившиеся в этом районе в течение 14 лет, показали значительное обеднение нифауны по мере приближения к Уэркингтону [12].

Наше сообщение ставит своей целью познакомить токсикологов с важной в практическом отношении проблемой сбросов отходов в морскую среду и привлечь внимание специалистов к задачам, встающим перед биологами в связи с ней.

Основное внимание в этом вопросе должна привлекать оценка степени токсичности веществ, содержащихся в подлежащих сбросу материалах, для гидробионтов. Обычно и грунт, и различного рода отходы промышленного производства, и отстой сточных вод содержат в себе одновременно целый ряд вредных соединений — тяжелые металлы, нефтяные углеводороды, пестициды, полхлорированные бифенилы и т. д. Предварительная, проводимая до сброса оценка токсичности материалов необходима для определения совместно с океанологами и гидрохимиками объема материала, который может быть сброшен без ущерба для биоты данной акватории. Поскольку грунты составляют большую часть сбрасываемых материалов, в докладе рассматривается вопрос о тестировании только их, хотя описанные приемы пригодны и для оценки токсичности отстоев сточных вод. Но сначала хотелось бы остановиться подробнее на воздействии, оказываемом сбросом грунтов, на гидробионты.

Грунт, извлекаемый при углублении акваторий портов и подводных каналов, обычно содержит в себе металлы, нефтяные углеводороды и другие загрязняющие вещества. При прохождении его через столб воды часть загрязняющих веществ переходит в раствор, изменяя качество воды, другая осаждается вместе с частицами взвеси, сорбируясь на них [2]. Необходимо упомянуть также об одновременном повышении мутности воды как в ее толще, так и в природных слоях при осаждении взвеси. Таким образом, сброс грунта может оказывать отрицательное воздействие на организмы всех биотопов, хотя и в разной степени. Благодаря динамичности условий жизни обитателей пелагиали, быстрому осаждению взвеси, а также в связи с быстрым смешением и разбавлением сбрасываемого материала в водном столбе принято считать, что ущерб этим организмам будет не-

велик [7]. Но при осаждении суспендированного материала на дне образуются ковер или насыпи загрязненного грунта, изменяющие условия обитания представителей бентоса. Загрязненные грунты, лежащие на дне, надолго остаются потенциальным источником поступления в природные слои воды и интерстициальные воды вредных веществ, которые могут стать токсичными для донной фауны, например, при снижении рН среды или содержания кислорода. Эти соединения могут оказать прямое, летальное действие на животных, приводя к выпадению из сообщества чувствительных видов. К прямому воздействию относятся и механическое засыпание бентосных организмов, приводящее их к гибели. Следствием сброса грунта является сокращение площади обитания донных животных в результате изменения характера субстрата, на котором жили местные виды, и разрушение мест икрометания [8].

Известны и иные последствия воздействия вредных веществ, экологическое значение которых пока не ясно и из которых лучше других изучена биоаккумуляция их в тканях животных и растений, приводящая к накоплению токсических веществ в верхних звеньях трофической цепи в концентрациях, опасных для человека. В литературе описано немало случаев аккумуляции в тканях червей, ракообразных и моллюсков тяжелых металлов, полихлорированных бифенилов, пестицидов и других веществ, источником которых являлся загрязненный субстрат [1, 3, 6, 9, 10, 11, 13, 14].

Восстановление донных биоценозов на грунте, сравнимом по своим физико-химическим характеристикам с субстратом на месте сброса, приходит в течение нескольких лет благодаря оседанию пелагических личинок местных форм и боковой миграции взрослых особей [7]. Если сбрасываемый грунт иного характера в отношении физических характеристик по сравнению с тем, на который он ложится, реколонизация замедляется, поскольку местные виды уже не находят для себя здесь подходящих для жизни условий. Поэтому заселение субстратов осуществляется за счет оседания планктонных личинок, попадающих в район сброса из отдаленных районов. Естественно, что при этом изменяются состав данного сообщества и, как следует, величины биомассы и плотности видов.

Но наибольшую опасность представляет сброс загрязненных грунтов, так как известно избирательное отношение оседающих личинок к субстрату, они не приступают к метаморфозу и гибнут вследствие постоянного присутствия в субстрате токсических веществ [2, 16]. В результате этого процесс реколонизации сброшенных грунтов тормозится.

Следовательно, сброс загрязненного грунта оказывает отрицательное воздействие на экосистему морей: нарушается ее равновесие, наблюдается гибель животных, снижается разнообразие видов в сообществе, изменяются численность и биомасса ор-

ганнизмов. Опасность сброса грунта особенно высока в связи с тем, что он производится в прибрежных районах с глубинами менее 30 м, являющихся высокопродуктивными.

Основываясь на принципах токсикологической школы нашей страны и учитывая опыт зарубежных исследователей, Государственный океанографический институт предлагает программу экспериментальных работ по тестированию предназначенного для сброса грунта для применения ее в Гидробиологических лабораторных системы Госкомгидромета и контроля среды, постоянно проводящих наблюдения за состоянием морей нашей страны. Это опыты должны быть достаточно простыми, удобными, но одновременно надежными и давать относительно быстрый ответ о степени токсичности грунта, подлежащего сбросу.

В программу включены опыты по определению острой токсичности исследуемых грунтов для организмов пелагиали и бентоса, критерием которой служит выживаемость, а также эксперименты по оценке биоаккумуляции тяжелых металлов в тканях донных животных. Программа опытов не предусматривает проведения работ, связанных с изучением иных последствий действия загрязненных грунтов в хронических опытах, которые доступны высококвалифицированным специалистам в хорошо оборудованных лабораториях, и требуют, кроме того, много времени.

Основным условием проведения токсикологических экспериментов является использование организмов разных трофических уровней, имеющих экологическое или промысловое значение в данной акватории. В качестве тест-организмов должны служить местные виды из разных таксономических групп или лабораторные формы, близкие в филогенетическом отношении к первым. Например, для Рижского залива Балтийского моря можно рекомендовать использовать *Macoma baltica*, *Mesidotea entomon*, *Pontoporeia affinis*. Для получения надежного результата необходимо брать организмы каждого вида однородные как в фенотипическом, так и идеально — в генетическом отношении. Желательно исследовать формы в наиболее чувствительном периоде их жизни, например, ракообразные в период линьки, и экземпляры в молодом возрасте. При проведении опытов значения температуры, солености, содержание кислорода в воде должны быть такими, какие они ожидаются во время сброса.

Как уже упоминалось, при сбросе грунта часть материала оказывается во взвешенном состоянии — это фаза взвешенных частиц. В столб воды переходит иловая вода и некоторая часть загрязняющих веществ, растворимых в морской воде. Этот раствор именуется жидкой фазой. Обе фазы оказывают воздействие на организмы толщи воды.

Для получения жидкой фазы и фазы взвешенных частиц в экспериментальных условиях пробу грунта, предназначенного для сброса, интенсивно смешивают в течение 0,5 ч с морской

водой, взятой с места предполагаемого сброса, в объемном отношении (грунт — вода) 1:4. Суспензии дают отстояться 1 ч. Недостаточная суспензия является фазой взвешенных частиц. Для получения жидкой фазы фазу взвешенных частиц центрифугируют и фильтруют через фильтр с отверстиями размером 0,45 мкм. Фильтрат представляет собой жидкую фазу. Исходные фазы можно разводить морской водой в разных пропорциях.

В программу экспериментальных работ входит тестирование обеих фаз с использованием планктонных водорослей и беспозвоночных животных (по 3 вида). Эксперименты ставят так, как это обычно принято в токсикологии при тестировании растворенных в воде веществ в острых опытах, длящихся не более 96 ч, позволяющих определить  $ЛК_{50}$ . Расчет безвредной концентрации проводят с использованием переходного коэффициента, равного 0,01. Этот метод позволяет быстро и достаточно просто оценить токсичность грунта для части пелагических организмов.

Однако ввиду долговременности контакта загрязненных грунтов с донными организмами основное внимание в токсикологических экспериментах должно быть уделено тестированию грунтов при использовании представителей бентофауны с разным типом питания детритофагов и сестонофагов, организмов эпи- и инфауны — моллюсков, ракообразных и червей. Эффект действия грунта изучают в экспериментах, длительность которых должна перекрывать, по крайней мере, большую часть жизненного цикла тестируемых видов, имеющих относительно короткое время генерации, или составлять не менее 10 сут.

На дно аквариумов кладут эталонный грунт с места предполагаемого сброса слоем в 30 мм. Аквариумы заполняют водой, и по прошествии 2 ч в них помещают опытные организмы, за исключением представителей отряда Mysidacea, которых пускают в аквариумы позднее, после внесения грунта, предназначенного для сброса. Вес отдельных особей не должен превышать 3 г, величина панциря ракообразных и створок моллюсков — не более 2 см. После акклиматизации животных в течение 48 ч сверху эталонного грунта в опытные аквариумы кладут испытуемый грунт слоем в 15 мм, в контрольные аквариумы помещают эталонный грунт также слоем в 15 мм. Через 10—20 мин. аквариумы заселяют представителями отр. Mysidacea.

Перед закладкой в аквариумы и эталонный и испытуемый грунты просеивают через сито с отверстиями в 1 мм для удаления из них животных.

В опытах лучше использовать проточную систему воды, обеспечивающую полную ее смену каждые 4 ч, или менять  $\frac{3}{4}$  объема воды в аквариумах каждые 48 ч.

Если смертность животных в контроле к концу опыта меньше 10%, то опыт считается действительным и результаты подвергаются статистической обработке. Если уровень гибели

больше 10%, то опыт ставят заново. Более подробно условия проведения экспериментов описаны в руководстве [5].

Главная цель опыта заключается в выявлении статистически значимого среднего снижения уровня выживаемости животных относительно контроля по истечении времени экспозиции. Минимальную разницу в уровне выживаемости в 10% считают достаточной для предсказания неблагоприятного воздействия сброса грунта. Возможно, результаты будущих исследований покажут, что минимальную разницу в 10% необходимо пересмотреть. Однако в настоящее время этот критерий в мировой практике считают самым реалистичным.

Если различия в значении выживаемости между опытом и контролем статистически незначимы, то опыт продолжают для выявления возможного накопления тяжелых металлов в тканях тестируемых животных. Длительность этих экспериментов — не менее 1 мес.

В настоящее время программа предварительной, относительно быстрой оценки степени токсичности предполагаемых для сброса грунтов ограничивается предложенными 3 опытами, вероятно, достаточными для целей практики. Однако изучение последствий сброса материалов в морскую среду в экспериментальных условиях позволяет оценить возможность реколонизации загрязненных субстратов и выявить степень эластичности бентосного сообщества данной акватории, а также исследовать все известные виды эффектов действия сбросов, определить их экологическую значимость и позднее использовать в целях практики.

Таким образом, токсикологические опыты помогут определить емкость района в отношении объема сброса и прогнозировать действие, которое может оказать материал, подлежащий сбросу. Необходимость исследований токсикологов рука об руку с экологами в области, связанной со сбросами отходов в морскую среду, очевидна, и результаты их будут способствовать сохранению чистоты морей и их продуктивности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Boddington M. J., Freitas A. S. W., Miller D. R. The effect of benthic invertebrates on the clearance of mercury from sediments — *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 1979, vol. 3, N 3, p. 236—244.
2. Burks S. A., Engler R. M. Water quality impacts of aquatic dredged material disposal (laboratory investigations). Vicksburg, 1978.
3. Cooke M., Nicklees G., Lawn R. E., Roberts D. J. Biological availability of sediment-bound cadmium to the edible cockle *Cerastoderma edule* — *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 1979, vol. 23, N 3, p. 381—386.
4. Cox G. V. The Davy Jones garbage dump. — *Environmental Science and Technology*, 1975, vol. 9, N 2, p. 108—111.
5. Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters. Vicksburg, 1977. 128 p.
6. Elder D. L., Fowler S. W., Pollicarpo G. G. Remobilization of Sediment —

- associated PCPs by the worm *Nereis diversicolor*.—Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 1979, vol. 21, N 4—5, p. 448—452.
7. Hirsch N. D., Dilalvo L. H., Peddicord R. Effect of dredged and disposal on aquatic organisms. Vicksburg, Miss. 1978.
  8. Johnston R. Mechanisms and problems of marine pollution in relation to commercial fisheries.—In: Marine Poll. L., N., Y., San Francisco, 1976, p. 3—156.
  9. Krebs C. J., Vellela L., Harwey G. R., Teal J. M. Reduction of field population of fiddler crabs by uptake of chlorinated hydrocarbons.—Mar. Poll. Bull., 1974, vol. 5, N 9, p. 140—142.
  10. Nimmo D. R., Wilson P. D., Blackman R. R., Wilson A. J. Polychlorinated biphenyl absorbed from sediments by fiddler crabs and pink shrimp.—Nature, 1971, vol. 231, N 2597, p. 50—53.
  11. Odum W. E., Woodwell G. M., Wurster C. F. DDT residues absorbed from organic detritus by fiddler crabs.—Science, 1969, vol. 164, N 3879, p. 576—577.
  12. Perkins E. J. The evaluation of biological response by toxicity and water quality assessments.—In: Marine Poll., L., N. Y., San Francisco, 1976, p. 505—585.
  13. Roesijadi G., Anderson J. W., Blaylock J. W. Uptake of hydrocarbons from marine sediments contaminated with Prudhoe Bay crude oil: influence of feeding type of test species and availability of polycyclic aromatic hydrocarbons.—J. Fish. Res. Board Canada, 1978, vol. 35, N 5, p. 608—614.
  14. Thompson J. A. J., Paton D. W. Heavy metals in benthic organisms from Point Grey dumpsite.—B. C. Pacific marine science report. Vancouver, 1978, N 78, p. 11.
  15. Van Hook R. S. Transport and Transportation Pathways of Hazardous Chemicals from solid waste disposal.—Environmental Health Perspectives, 1978, vol. 27, p. 295—308.
  16. Wilson D. P. The settlement of *Ophelia bicornis* Cavigny larvae, the 1952 experiments.—J. Mar. Biol. Ass., 1953, vol. 32, N 1, p. 209—233.

## СОДЕРЖАНИЕ

Л. А. Лесников. Основные задачи, возможности и ограничения биотестирования	3
Б. А. Флеров. Биотестирование: терминология, задачи, перспективы	13
Н. С. Строганов, О. Ф. Филенко, Г. Д. Лебедева, А. И. Путинцев, Н. С. Бузинова, А. Г. Дмитриева, Е. Ф. Исакова, Л. В. Колосова, В. М. Король, М. С. Кривенко, О. В. Парина. Основные принципы биотестирования сточных вод и оценка качества вод природных водоемов	21
Л. П. Брагинский, К. П. Калениченко, Э. П. Щербань. Опыт планирования токсикологических биотестов	30
В. И. Лукьяненко. Биохимические тесты в ихтиотоксикологии	38
В. И. Лукьяненко. Экодиагностика токсикозов рыб в ранние сроки	46
А. С. Лукьянов, О. Ю. Фролов. Активность ацетилхолинэстеразы в ранние сроки фенольного отравления карпа <i>Cyprinus carpio</i> L.	53
Т. Р. Руохолайнен, Р. У. Высоцкая, В. С. Сидоров. Влияние смоляных кислот на молекулярную гетерогенность кислой фосфатазы печени форели	60
Л. П. Рыжков. Количественное соотношение процессов обмена веществ — биологический тест функционального состояния рыб	65
Л. П. Рыжков. Определение функционального состояния рыб методом выявления у них количественных соотношений между некоторыми процессами обмена веществ	71
П. И. Побегайло, Т. Г. Новосадова. Применение биотестов для оперативного контроля качества очищаемых и сбрасываемых сточных вод	74
С. А. Соколова, Л. Е. Айвазова. К вопросу об унификации методов проведения токсикологических экспериментов в целях биотестирования	79
Ю. А. Щербаков, С. Г. Котляр. Роль биомониторинга в оценке степени загрязненности водоемов при натурных исследованиях и лабораторном моделировании	82
Б. И. Колупаев. Проблема разработки приборных методов биомониторинга качества сточных вод	87
А. С. Лукьянов, С. С. Сидоров. Определение токсичности водной среды по опомоторной реакции рыб	91
А. Г. Власенко, А. Н. Крайнюкова, Ю. М. Несмеянов, Г. Н. Катриченко. Инструментальный экспресс-метод оценки токсичности сточных вод по реакции улова рыб	100
Л. А. Васильков, А. Н. Крайнюкова, А. Я. Малайревская. Изменение физико-химических свойств плазмы крови рыб при интоксикации	104
Т. В. Кайво. Салака <i>Clupea harengus membras</i> в качестве тест-объекта в мониторинге экосистемы Балтийского моря	112
О. О. Роотс, Э. А. Пейре. Салака — биомонитор химического загрязнения Балтийского моря хлороорганическими углеводородами	115
Л. В. Колосова, В. Н. Носов. Сравнительная устойчивость гидробионтов при биотестировании	117
	193



Б. А. Флеров, Л. Н. Лалкина. Обнаружение антихолинэстеразных веществ при помощи биотестирования (тест—объект— <i>Hirudo medicinalis</i> , пиявка)	121
И. А. Кондратьева. Опыт применения <i>Epischura bairdalis</i> Sars при биотестировании промышленных сточных вод	127
О. П. Данильченко, Н. А. Тушмалова. Экспресс-метод определения токсичности водной среды по функциональному состоянию инфузорий спиростом	130
М. Д. Бресткина, Н. А. Тушмалова, О. П. Данильченко. Экспресс-метод определения токсичности водной среды по регенерации пресноводной гидры <i>Hydra attenuata</i>	133
Э. Г. Голубкова. Теоретические аспекты биотестирования на примере парameций	137
С. П. Рябухин. Использование простейших при биологическом тестировании качества загрязненных природных вод	141
Л. П. Брагинский, С. Д. Бескаравайная. Кислородный метод изучения первичной продукции и деструкции как биотест на присутствие токсикантов	145
Н. С. Строганов, А. Г. Дмитриева, В. М. Король. Водоросли и макрофиты как объекты для биотестирования	153
В. М. Король, Н. С. Строганов, Л. М. Алашева. Изменение концентрации свободных радикалов как тест для оценки степени токсичности вод	159
Н. С. Строганов, А. Г. Дмитриева, Т. И. Веселова, В. А. Веселовский. Биотестирование действия токсиканта на водоросли при помощи длительного послесвечения	162
О. М. Кожова, С. С. Тимофеева. Эколого-токсикологические проблемы в системе мониторинга	165
И. З. Журбенко, А. Н. Крайнюкова, И. П. Ульянова. Использование показателей газообмена водорослей и бактерий в качестве теста в инструментальных методах биотестирования	170
И. В. Помазовская. К вопросу о биотестировании сельскохозяйственных сточных вод	175
Г. В. Попова, М. Г. Трофимова, Ю. В. Шиленко. Биотестирование вод, содержащих пестициды	179
Н. П. Мокеева. Биотестирование материалов, предназначенных для сброса в морскую среду	186

ДЛЯ ЗАМЕТОК

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
Институт биологии внутренних вод

# ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

1

ВЕНЕЦЬ ГРАД 1981