

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. В.И. УЛЬЯНОВА-ЛЕНИНА»

Факультет географии и экологии

**ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО
ПО БИОТЕСТИРОВАНИЮ ХИМИЧЕСКИХ
ВЕЩЕСТВ НА ПЛАНКТОННЫХ ОРГАНИЗМАХ**

Учебно-методическая разработка
к общему курсу
Экологическая токсикология

КАЗАНЬ
2007

Печатается по решению
Учебно-методической комиссии
факультета географии и экологии
Казанского государственного университета

Составитель
д.б.н., доцент В.В. Зобов
к.б.н. А.А. Аслямова

Рецензент
к.б.н., доцент Н.Ю. Степанова

Практическое руководство по биотестированию химических веществ на планктонных организмах: Учебно-методическая разработка. –Казань: КГУ, 2007. -18 с.

Учебно-методическая разработка предназначена для студентов факультета географии и экологии университета и является частью лабораторного практикума по курсу «Экологическая токсикология».

Рассмотрены теоретические аспекты и практические приемы работы, необходимые для оценки уровня химического загрязнения водной среды пестицидами и нефтепродуктами по параметрам острой токсичности на планктонных организмах: лабораторной партеногенетической культуре *Daphnia magna Straus* и микробиотестах Тохкит™.

СОДЕРЖАНИЕ	
ВВЕДЕНИЕ	4
1. БИОТЕСТИРОВАНИЕ НА ДАФНИЯХ	5
1.1. Принципы лабораторного культивирования <i>Daphnia magna</i>	5
1.2. Культивирование хлореллы (корм для <i>Daphnia magna</i>).....	7
2. ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВЕЩЕСТВ НА МИКРОБИОТЕСТАХ ТОХКИТ™	7
2.1. Оценка токсичности веществ на микробиотесте <i>Thamnotoxkit</i>	8
2.2. Оценка токсичности веществ на микробиотесте <i>Rotoxkit</i>	8
2.3. Оценка токсичности веществ на микробиотесте <i>Algotoxkit</i>	8
2.4. Оценка токсичности веществ на микробиотесте <i>Prottoxkit</i>	9
3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ДАФНИЙ К $K_2CR_2O_7$	9
3.1. Материалы.....	10
3.2. Подготовка эксперимента.....	10
3.3. Эксперимент.....	11
3.4. Протокол эксперимента.....	11
4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЭЗЕРИНА	12
5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРОБ ВОДЫ С МНОГОКОМПОНЕНТНЫМ СОСТАВОМ	13
ЛИТЕРАТУРА	14
ПРИЛОЖЕНИЕ	17

ВВЕДЕНИЕ

Биотестированием называют процедуру биологического испытания проб воды (растворов индивидуальных веществ, стоков, элюатов почвы, донных отложений и др.) на токсичность (ядовитость) в лабораторных условиях на специально отобранных изолированных видах, например, на лабораторной культуре рачка *Daphnia magna Straus* или на коммерческих микробиотестах Toxkit™.

Биологические объекты (биогестеры, аналитические индикаторы) чутко реагируют на малейшие изменения химического состава окружающей среды и дают экспресс-информацию о токсичности как отдельных химических компонентов, так и их совокупности.

Биогестерами могут быть самые различные живые организмы, их органы и ткани, физиологические функции, биохимические реакции и др. Ответный сигнал биогестера на изменение химического состава окружающей среды также может быть самым разнообразным: (а) изменение характера поведения, двигательной активности; (б) интенсивности роста и регенерации; (в) скорости метаморфоза; (г) состава крови; (д) биоэлектрической активности органов и тканей; (е) нарушение функции органов пищеварения, дыхания, размножения, (ж) патологоанатомические изменения организма. Каждый из перечисленных сигналов может быть измерен инструментальным методом или оценен визуально. Обобщенным (интегральным) показателем токсичности (эффективности) действия вещества на биогестер является или выживаемость, или смертельный исход, определяемые при оценке параметра острой токсичности (летальная или смертельная концентрация ЛК; LC).

Цель практикума - привить навыки работы с лабораторной культурой дафний и проиллюстрировать токсические свойства основных поллутантов водной среды такими экспериментами, которые могут быть проведены самостоятельно студентами-экологами.

1. БИОТЕСТИРОВАНИЕ НА ДАФНИИХ

Daphnia magna Straus является наиболее часто используемым видом водных беспозвоночных в оценке острой (см. Приложение) и хронической токсичности проб воды как с известным, так и неизвестным (многокомпонентным) химическим составом. В настоящее время метод биотестирования относительно дафний является международным (в Международной организации по стандартизации ему присвоен номер ИСО 6341), что позволяет сравнивать результаты, получаемые в лабораториях разных стран. Род дафний имеет целый ряд преимуществ:

- ✓ он широко распространен в пресных водах и является ключевым звеном во многих водных пищевых цепях;
- ✓ в течение 1 месяца может дать до 4-х поколений молоди не менее 20 особей в каждом поколении;
- ✓ вследствие прозрачности тела дафнии есть возможность визуального контроля за качеством эмбрионов, скоростью их созревания, темпом размножения и роста животного;
- ✓ есть возможность регулярной оценки качества народившейся молоди по ее морфологическим признакам, а также по выживаемости молоди от поколения к поколению;
- ✓ имеет относительно короткий жизненный цикл, что особенно важно для тестов на плодovitость;
- ✓ чувствителен к большинству водных загрязнений.

1.1. Принципы лабораторного культивирования *Daphnia magna*

Период созревания *Daphnia magna* до вымета молоди при оптимальной температуре и хорошем питании занимает 5-10 суток. Продолжительность жизни 110-150 суток. У молодых дафний число яиц в кладке 10-15, затем оно возрастает до 30-40 и более, снижаясь до 3-8 и до 0 за 2-3 суток до смерти.

Партеногенетическую культуру дафний выращивают в термостатируемом при 18-22°C люминистате (12-14-часовая освещенность с интенсивностью 400-600 люкс). Опыты по биотестированию водных проб проводят в том же люминистате.

Для культивирования дафний используют «биологизированную» аквариумную воду (она же «разводящая» вода - РВ и «контрольная» вода - К) со следующими параметрами: рН 7-8 (граничные значения рН от 6 до 9), жесткость общая 3-4 мг-экв/л, соотношение Са/Mg 4:1, концентрация растворенного кислорода не менее 6-7 мг/л (граничное значение 2 мг/л).

Культуру дафний содержат в стеклянных емкостях объемом 1-5 литров, оптимальная плотность взрослых рачков 25-50 особей на 1 литр. Скорость созревания маточной культуры сильно зависит от ее исходной плотности (чрезмерная численность рачков ведет к исчезновению культуры). Наилучшие условия создаются при суточном вылове 20-30% народившейся молоди.

Каждые 7-20 суток культуру дафний обновляют в обязательном порядке. Для этого отбирают 20 половозрелых самок (яйца в выводковой камере) и помещают в индивидуальные сосуды, заполненные водой из расчета 10 мл на одну особь. Выметанную самками одновозрастную молодь изымают из сосудов, часть используют для биотестирования, а оставшуюся продолжают культивировать.

Кормом для дафний служат зеленые водоросли (хлорелла или сценедесмус), хлебопекарные дрожжи. Суспензию водорослей периодически вносят в среду для культивирования дафний в количестве, дающем светлое зеленое окрашивание. В природе ведущее значение в питании рачков имеют бактерии, поэтому 1-2 раза в неделю дафний нужно подкармливать дрожжевым кормом: 1 г свежих дрожжей (или 0,3 г сухих дрожжей) залить 100 мл дистиллированной воды, после набухания перемешать и отстоять 30 минут; кормить надосадочной жидкостью из расчета 3 мл на 1 л воды.

Фильтрация пищи рачками идет непрерывно. При этом они не способны отсортировать съедобные частицы от несъедобных. Поэтому взмучивание или на дне сосуда с дафниями недопустимо (ил забивает фильтрационный аппарат рачков и они гибнут). Другим неблагоприятным моментом в культивировании рачков является чрезмерное накопление на дне сосуда сброшенных панцирей (карапаксов).

Поскольку пол партеногенетического яйца дафнии определяется всего за 15 минут до его выхода из половой системы самки, то любое кратковременное отклонение от нормальных условий жизни может изменить процесс партеногенетического размножения рачков. Если в этот момент самки испытывают неблагоприятное воздействие (например, температуры, плотности особей), из их яиц выводятся самцы, непригодные для биотестирования.

Для получения исходного материала для процедуры биотестирования 30-40 самок с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей, за 1 сутки до биотестирования пересаживают в емкости объемом 0,5-2,0 л. После появления молоди их отделяют от взрослых особей.

Критерием токсичности при биотестировании является гибель в тестируемой пробе 50% и более особей за период до 96 часов. При

биотестировании важно учитывать, что (а) молодь рачков в 5 раз более чувствительна к действию токсикантов, чем взрослые особи; (б) кормление рачков во время острого опыта уменьшает токсичность пробы в 4 раза.

1.2. Культивирование хлореллы (корм для *Daphnia magna*)

Приготовить маточные водные растворы:

KNO_3 - 25%, KH_2PO_4 - 12,5%, MgSO_4 - 12,2%, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 1%. Приготовить 2 маточных раствора микроэлементов (А и Б). Для этого взвесить и затем последовательно растворить в 250 мл дистиллированной воды 0,71 г H_3BO_3 , 0,45 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,055 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (раствор А).

Взвесить и последовательно растворить в 250 мл дистиллированной воды 4,41 мг MoO_3 и 5,74 мг NH_4VO_3 (раствор Б).

Приготовить 1000 мл среды Тамия путем последовательного приливания в мерную колбу (1 л) следующих объемов маточных растворов:

KNO_3 (25%) 20 мл, KH_2PO_4 (12,5%) 10 мл, MgSO_4 (12,2%) 10 мл, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1%) 1 капля, раствор А 1 мл, раствор Б 1 мл.

Довести объем раствора дистиллированной водой до 1 литра. Разбавить полученную концентрированную среду Тамия в 5 раз. Для этого к 100 мл концентрированной среды Тамия добавить 400 мл дистиллированной воды.

Засеять разбавленную в 5 раз среду Тамия 5-10-дневной хлореллой (до светло-зеленого окрашивания). Разлить приготовленные растворы среды Тамия по колбам емкостью 1-2 литра. Обеспечить непрерывную продувку воздуха через культуру и 12-часовой цикл освещения с интенсивностью 2000-3000 люкс (температура 18-20°C). Через 3-7 суток сгустить культуру (например, путем отстаивания в течение 2-3 суток в холодильнике для получения суспензии клеток).

Хлореллу вносят в культуру дафний ежедневно из расчета 1 мл суспензии на 1 л воды, поддерживая концентрацию клеток в среде на уровне 200 тыс. в 1 мл. Суспензию (концентрат) хлореллы можно хранить в холодильнике не более 3 недель, маточные растворы - до 1 месяца.

2. ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВЕЩЕСТВ НА МИКРОБИОТЕСТАХ ТОХКИТ™

Токсикологическую оценку химических соединений можно проводить также на коммерческих микробiotестах Toxkit Cysts (фирма CREASEL Ltd., Бельгия):

- ✓ веслоногий рачок *Thamnocephalus platyurus* (Thamnotoxkit F™),
- ✓ ракушечный рачок *Heterocypris incongruens* (Ostracodtoxkit F™),

- ✓ коловратка *Brachionus calyciflorus* (Rotokit F™),
- ✓ простейшее *Tetrahymena thermophila* (Protoxkit F™),
- ✓ одноклеточная водоросль *Selenastrum capricornutum* (Algotoxkit F™).

Уровни чувствительности к стандартному токсиканту $K_2Cr_2O_7$ при надлежащем культивировании данных гидробионтов должны составлять для Thamptoxkit ЛК₅₀^{24 ч}=0,07-0,09 мг/л, для Rotokit ЛК₅₀^{24 ч}=10,0-20,0 мг/л, для Protoxkit ингибирующая концентрация ИК₅₀=15,0-25,0 мг/л, для Algotoxkit ИК₅₀=3,0-4,5 мг/л.

2.1. Оценка токсичности веществ на микробиотесте Thamptoxkit

Биотестирование на рачках *Thamnoserphalus platyurus* проводят на ювенильных особях в течение 24 часов. За сутки до тестирования цисты помещают в культуральную жидкость и переносят в инкубатор при 25⁰С и освещенности 2000 люкс. Тестирование на «оживших» рачках проводят в пластмассовых ячеистых плашках, куда помещают по 1 мл водного раствора вещества в 5 разведениях.

2.2. Оценка токсичности веществ на микробиотесте Rotokit

Биотестирование на коловратках *Brachionus calyciflorus* проводят на ювенильных особях в течение 24 часов в специальных пластмассовых ячеистых плашках, куда помещают по 1 мл раствора вещества в 5 разведениях (по 5 коловраток на 1 ячейку). За сутки до тестирования цисты помещают в культуральную жидкость и переносят в инкубатор при 25⁰С и освещенности 3000-4000 люкс. Перенос «оживших» коловраток в опытные ячейки производят в течение 2 часов после инициации (возраст коловраток - не более 2 часов). Подсчет особей через 1 сутки проводят под бинокулярным микроскопом МБС-10. Мертвыми считают иммобилизованные в течение 5 сек организмы. Смертность в контроле не должна превышать 10%.

2.3. Оценка токсичности веществ на микробиотесте Algotoxkit

Культивирование одноклеточных водорослей *Selenastrum capricornutum* проводят в специальных 10 см кюветах. Критерием токсичности служит достоверное снижение коэффициента прироста численности клеток в растворе вещества по сравнению с контролем. Водоросли выращивают на искусственной питательной среде. При биотестировании по 100 мл исследуемой и контрольной пробы в 3-х повторностях помещают в колбы, добавляя по 0,1 мл каждого питательного раствора и по 0,5 мл ступенной

культуры водорослей. После 72-часового инкубирования проводят замер оптической плотности на спектрофотометре 6300 Japway (Великобритания) ($\lambda=670$ нм).

2.4. Оценка токсичности веществ на микробиотесте Protoxkit

Метод биотестирования на инфузориях *Tetrahymena thermophila* основан на уменьшении мутности раствора, свидетельствующем о потреблении пищевого субстрата инфузориями. В присутствии токсиканта происходит угнетение культуры, проявляющееся в уменьшении потребления коммерческого пищевого субстрата и соответственно в сохранении мутности раствора.

Тестирование веществ на Protoxkit F™ производят в течение 24 часов термостатирования при 30⁰С. В водный раствор вещества добавляют 40 мкл пищевого субстрата и 40 мкл раствора с культурой инфузорий определенной плотности; тестирование проводят в 2-х повторностях. О степени ингибирования судят по уменьшению оптической плотности раствора (уменьшение количества пищевого субстрата) в сравнении с контролем (ингибирующая концентрация ИК₅₀) на спектрофотометре 6300 Japway (Великобритания) при $\lambda=440$ нм. Критерием достоверности считают снижение оптической плотности в контроле после 24-часовой инкубации на 75% и более.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ DAPHNIA MAGNA к $K_2Cr_2O_7$

Бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) – эталонный токсикант с механизмом действия, общим для тяжелых металлов – блокада SH-групп жизненно-важных ферментов.

Определение чувствительности дафний к водному раствору $K_2Cr_2O_7$ – необходимая процедура перед началом биотестирования проб воды (или индивидуальных химических веществ), которую производят не реже 1 раза в 3 месяца. Величина ЛК₅₀ (при наблюдении 24 часа) для $K_2Cr_2O_7$ должна лежать в диапазоне 0,9-2,0 мг/л. В этом случае лабораторная культура дафний считается пригодной для биотестирования проб воды.

Контролем служит профильтрованная «биологизированная» аквариумная вода (с рыбками и растениями) – «разводящая вода» (далее «РВ») или контрольная вода (далее «К»). Во время острого опыта (до 96 часов) рачков не кормят.

3.1. Материалы

1. Пластиковая плашка с ячейками на 2 мл (см. рис. 1). При биотестировании в каждую ячейку вводят по 2 мл тестируемого раствора и по 1 дафнии (можно использовать и иные емкости, например, стаканы на 10 или 100 мл, но во всех случаях на 1 дафнию должно приходиться не менее 2 мл жидкости).
2. Пипетки градуированные (мерные) на 2 и 10 мл – по 2 штуки.
3. Стаканы объемом 20 мл – 2 штуки
4. 50 дафний в возрасте 4-24 часа.

3.2. Подготовка эксперимента

1. Приготовить 100 мл маточного (для длительного хранения) раствора $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 1000 мг/л (0,1%) путем растворения 0,1 г $K_2Cr_2O_7$ в 100 мл РВ. Затем из маточного раствора приготовить 50 мл исходного раствора с концентрацией 10 мг/л. Для этого к 0,5 мл маточного раствора $K_2Cr_2O_7$ (0,1%) добавить 49,5 мл РВ (разбавление в 100 раз: 1 часть раствора вещества + 99 частей воды).

1. Из полученного исходного раствора (10 мг/л) приготовить 20 мл раствора с концентрацией 4,0 мг/л. Для этого к 8 мл раствора $K_2Cr_2O_7$ (10 мг/л) добавить 12 мл РВ (разбавление в 2,5 раза: 1 часть раствора вещества + 1,5 части воды).

2. Из исходного раствора (10 мг/л) приготовить 20 мл раствора с концентрацией 2,0 мг/л. Для этого к 4 мл раствора $K_2Cr_2O_7$ (10 мг/л) добавить 16 мл РВ (разбавление в 5 раз: 1 часть раствора вещества + 4 части воды).

3. Из исходного раствора (10 мг/л) приготовить 20 мл раствора с концентрацией 1,0 мг/л. Для этого к 2 мл раствора $K_2Cr_2O_7$ (10 мг/л) добавить 18 мл РВ (разбавление в 10 раз: 1 часть раствора вещества + 9 частей воды).

4. Из исходного раствора (10 мг/л) приготовить 20 мл раствора с концентрацией 0,5 мг/л. Для этого к 1 мл раствора $K_2Cr_2O_7$ (10 мг/л) добавить 19 мл РВ (разбавление в 20 раз: 1 часть раствора вещества + 19 частей воды).

П. 1. Разлить приготовленные растворы $K_2Cr_2O_7$ (4, 2, 1, 0,5 мг/л; см. рис. 1) и контрольный раствор (К) по ячейкам и посадить в каждую ячейку по 1 дафнии:

4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
К	К	К	К	К	К	К	К	К	К	К

Рисунок 1

2. Посадку дафний в ячейки (или стаканы) производят с помощью микропипеток со съемными пластиковыми наконечниками. Концы наконечников необходимо обрезать под величину дафнии одно-двух-дневки.
3. На протяжении всего процесса лабораторного культивирования и биотестирования должны сохраняться одинаковые внешние условия: температура 18-22°C, pH 6,5-8,5, 12-часовой режим освещения (400-600 люкс). Во время биотестирования проб на острую токсичность (до 96 часов) дафний не кормят.

3.3. Эксперимент

- 1) Подсчет погибших (обездвиженных; иммобилизованных) дафний в каждом десятке ячеек производят визуально через 24 часа. Смертность рачков в контроле (К) не должна превышать 10%.
- 2) Результаты оформляются в виде протокола опыта:

3.4. Протокол эксперимента

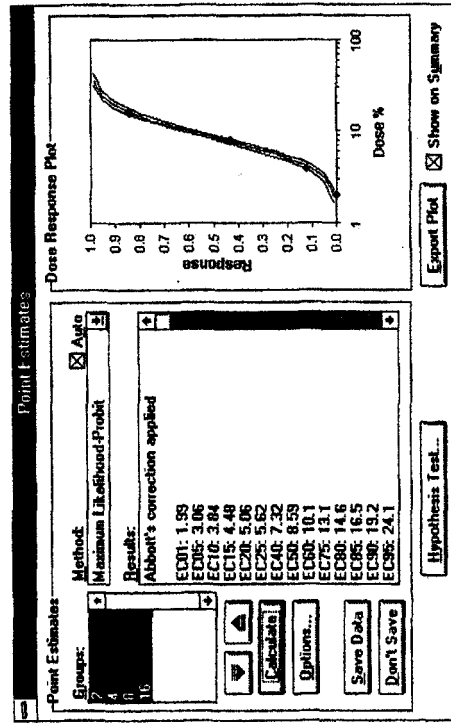
Дата _____ Температура, pH проб (в начале и конце опыта)

Тестируемая проба: растворы бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$).
Каждая концентрация испытана на 10 дафниях.

Время от начала опыта	Количество (%) погибших дафний (смертность в %)			
	4,0 мг/л	2,0 мг/л	1,0 мг/л	0,5 мг/л
24 часа	9 (90%)	7 (70%)	3 (30%)	1 (10%)
				Контроль (К)
				0

3) Полученные результаты опытов наносятся на график – смертность (в %) против соответствующей концентрации $K_2C_2O_7$. Через точки проводят прямую аппроксимирующую линию (линия тренда, регрессионная линия), удовлетворяющую всем экспериментальным точкам. Затем, проведя горизонтальную линию на уровне 50%-й смертности до пересечения ее с линией тренда и опустив перпендикуляр на ось X, находят значение ЛК₅₀ – концентрацию $K_2C_2O_7$, вызывающую гибель 50% дафний (в данном примере ЛК₅₀ ≈ 1,5 мг/л). Аналогичным образом можно получить значения ЛК₁₀ и др.

Аналогичным образом проводят оценку острой токсичности любого иного химического вещества (пробы воды). В среде программы ToxCalc v5.0.23Т Агентства по охране окружающей среды США (EPA USA) расчет величин ЛК_n (EC₁₋₉₅) выглядит следующим образом:



4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЭЗЕРИНА

Эзерин (физостигмин) – яд из группы сложных эфиров карбаминовой кислоты с антихолинэстеразным механизмом действия, общим для соответствующей группы пестицидов (инсектицидов). Для биотестирования можно использовать любой другой промышленный пестицид фосфорорганической или иной химической природы. Схема проведения опыта с пестицидами аналогична вышеописанной для $K_2C_2O_7$. Необходима оценка токсичности не менее 4-х концентраций вещества с тем, чтобы получить достаточно точную линию тренда и соответствующую ЛК₅₀.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРОБ ВОДЫ С МНОГОКОМПОНЕНТНЫМ СОСТАВОМ

Пластовая вода нефтяных скважин Ромашкинского месторождения Республики Татарстан имеет многокомпонентный химический состав: соли, тяжелые металлы, полиароматические углеводороды и др. Перед биотестированием проверяют pH пробы и если необходимо корректируют ее до уровня 6,5-8,5 с помощью покапельного внесения в пробу растворов NaOH или HCl.

Биотестированию подвергают (а) исходную пробу пластовой воды (без разбавления) и (б) разбавление исходной пластовой воды чистой контрольной водой (РВ) в соотношении 1:2 (разбавление в 3 раза), 1:5, 1:10 и 1:20 (возможны и другие варианты разбавления). Время наблюдения – 24 часа.

В качестве показателя безвредности (отсутствия токсичности) проб воды используют параметр NOEC – (no observed effect concentration) – концентрация загрязнителей в пробе, которая не вызывает никакого биологического эффекта. Увеличение концентрации токсиканта в пробе выше NOEC приводит к достижению токсического порога концентрации, т.е. LOEC – lowest observed effect concentration – минимальная концентрация токсиканта, при которой уже наблюдается биологический эффект (концентрация чуть выше NOEC).

Применительно к биотестированию проб воды с многокомпонентным составом (пластовая вода, нефтезагрязненные воды, промышленные возвратные/сточные воды, вода из природных водоемов) значение NOEC определяют по кратности разбавления исходной пробы контрольной водой (РВ) из аквариума.

Исходя из диаграммы 1, величина NOEC протестированной пластовой воды соответствует разведению 1:20, т.е. данная проба становится безвредной (утрачивает острую токсичность) только при разбавлении ее чистой водой в 21 раз. За LOEC может быть принято любое значение разбавления, лежащее между 1:10 и 1:20.

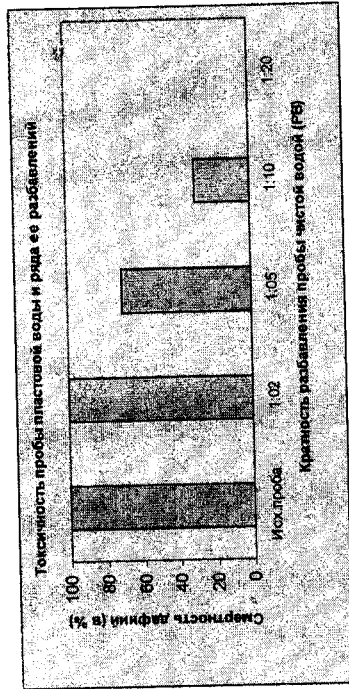


Диаграмма 1

Подвергшиеся процедуре биотестирования вещества (или пробы воды) ранжируют согласно классификации острой токсичности веществ для гидробионтов (см. Приложение; Brooks, 1989; Grasland, Bengtsson, 2001).

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. -Л., 1963. -152 с.
2. Богдановский Г.А. Химическая экология: Учеб. пособие. - М.: Изд-во МГУ, 1994. -237 с.
3. Дмитриева А.Г., Веселова Т.В., Веселовский В.А. Биотестирование сточных вод и их компонентов и биоиндикация природных вод с использованием люминисцентных методов. - В кн.: Методы биотестирования качества водной среды / Под ред. О.Ф. Филленко. -М.: Изд-во МГУ, 1989. -С. 21-34.
4. Исакова Е.Ф., Колосова Л.В. Проведение токсикологических исследований на дафниях. - В кн.: Методы биотестирования качества водной среды /Под ред. О.Ф. Филленко. -М.: Изд-во МГУ, 1989. -С. 51-62.
5. Куценко С.А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание / С.А. Куценко. - СПб: Фолиант, 2004. -720 с.
6. Маслов С.К., Вловин В.Г. Исследование возможности использования *Daphnia magna Straus* для биотестирования высокотоксичных фосфорорганических соединений в воде // Вестник Российской Военно-медиц. академии. -2005. - Т.14, № 1. - С. 244.
7. Методическое руководство по биотестированию воды. РД-118-02-90. - М.: 1991, 48 с.

8. Методика определения токсичности воды по смертности и изменению плодovitости дафний. Токсикологические методы контроля. ПНДФТ 14.1.2:3-4.3.-99. -М., 1999. -31 с.
9. Методические рекомендации по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) загрязняющих веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение / Под ред. О.Ф. Филленко, С.А. Соколовой. -М.: Изд-во ВНИРО, 1998. - 145 с.
10. Микилин А.Е. Живые корма. -М.: Дельфин, 1994. -104 с.
11. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. - М.: Медицина, 2002. - 608 с.
12. Сборник нормативно-методических документов по обращению с отходами производства и потребления. Приложение 1. - Москва: Логус, 1996. - С. 67-68.
13. Тонкопий В.Д. Куценко С.А., Загребин А.О., Шерстнева Л.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование разработки новых методов биодентификации антихолинэстеразных соединений в водной среде / Экологическая химия. - 1993. - № 2. - С. 133-137.
14. Гуманов А.А. Биологические методы анализа // Ж. аналит. химии - 1988. -Т. 43, Вып. 1. -С. 20-36.
15. Унифицированные методы исследования качества вод. Часть 3, том 2, доп. к 4-му изданию, СЭВ. -М.: 1990. -83 с.
16. Филленко О.Ф. Водная токсикология. -М.: Изд-во МГУ, 1988. -188 с.
17. Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам: энциклопедический справочник. -М.: Протектор, 1995. -С. 410-458.
18. Хоботьев В.Г. Стандартизация условий при экспериментальном изучении действия токсических веществ на водоросли // Тез. симпозиума по водной токсикологии. -Л., 1969. - С. 111-112.
19. ASTM Standart. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA. / Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life Cycle Toxicity Tests, NTIS/ASTM-E-1193-97, USA, Philadelphia, -1997. - Р. 765-781.
20. Brooks H.L. Insecticides. Forest Service // Pesticide Background Statements // U.S. Department of Agriculture. Agriculture Handbook. - 1989. - Vol. IV, No 685 (<http://infoventures.com/e-hlth/pesticide/pest-fac.html>).
21. Grasland S., Bengtsson B.E. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment // Sci. Total. Environ. -2001. -V. 280, No. 1-3. -P. 93-131.

22. Persoone G. Standard operational procedures. Crustacean (Thamnotoxkit) toxicity screening test for freshwater; Freshwater toxicity screening test with Ostracodtoxkit; Freshwater toxicity screening test with rotifera (Rottoxkit); Freshwater toxicity test with a ciliate Protozoan (Prottoxkit); Freshwater toxicity screening test with microalgae (Algotoxkit). – Deinze: Creasel Ltd, 2003. – 100 p.
23. Pope C., Karanth S., Liu J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action // Environmental toxicology and pharmacology. – 2005. – V. 19. – P. 433-446.

Классификация опасности веществ по степени воздействия на организм (по Brooks et al., 1989)

Приложение

Класс токсичности	Острая токсичность (острая категория параметры смертельно дозы (концентрации))	Млекопитающие (острая токсичность, пер ос), мг/кг	Млекопитающие (острая токсичность, внутривенно), мг/кг*	Птицы (острая токсичность, пер ос), мг/кг	Птицы (острая токсичность, диетарная), мг/л (ppm)	Липобон-ты (включая лафний), мг/л (ppm)
I	Чрезвычайно токсичные	<10	≤0,2	<10	<50	<0,1
II	Высоко токсичные	10-50	0,3-10	10-50	50-500	0,1-1,0
III	Умеренно-токсичные	51-500	11-100	51-500	501-1000	<1,0-10
IV	Малотоксичные	501-2000	101-1000	501-2000	1000-5000	<10-100
V	Практически нетоксичные; безвредные	>2000	1001-3000; >3000	>2000	>5000	>100

* - по: Измеров Н.Ф. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном введении: справочник / Н.Ф. Измеров, И.В. Саноцкий, К.К. Сидоров, -М.: Медицина, 1977. –С.196-197.

Классификация опасности веществ OECD 1998 (по Grasslund, Bengtsson, 2001)

Острая токсичность I (высокотоксичные)	ЛК ₅₀ (96 ч) для рыб ≤1,0 мг/л	ЖК ₅₀ (48 ч) для ракообразных ≤1,0 мг/л	ЖК ₅₀ (72 ч) для водн. растений 1,0 мг/л
	ЛК ₅₀ (96 ч) для рыб >1,0-≤10,0 мг/л	ЖК ₅₀ (48 ч) для ракообразных >1,0-≤10,0 мг/л	ЖК ₅₀ (72 ч) для водн. растений >1,0-≤10,0 мг/л
Острая токсичность II (умернотоксичные)	ЛК ₅₀ (96 ч) для рыб >10,0-≤100,0 мг/л	ЖК ₅₀ (48 ч) для ракообразных >10,0-≤100,0 мг/л	ЖК ₅₀ (72 ч) для водн. растений >10,0-≤100,0 мг/л
Острая токсичность III (малотоксичные)	ЛК ₅₀ (96 ч) для рыб >100,0-≤1000,0 мг/л	ЖК ₅₀ (48 ч) для ракообразных >100,0-≤1000,0 мг/л	ЖК ₅₀ (72 ч) для водн. растений >100,0-≤1000,0 мг/л

Подписано в печать 26.04.2007.
Форм. 60 x 84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Печать ризографическая.
Печ.л.1,25. Тираж 100. Заказ 147.

Отпечатано с готового оригинал-макета
в лаборатории оперативной полиграфии УМУ КГУ
420045, Казань, Кр.Позиция, 2а
Тел. 231-52-12