



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2011114744/15, 14.04.2011**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**14.04.2011**

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **14.04.2011**(45) Опубликовано: **27.09.2012** Бюл. № 27(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **БРАГИНСКИЙ Л.П.**

**Гидробиологический журнал. 2000, т.36, №5, с.50-70. SU 1814510 АЗ, 07.05.1993. SU 1789920 А1, 23.01.1993. SU 1698757 А1, 15.12.1991. RU 2258676 С2, 20.08.2005. RU 2242122 С2, 20.12.2004. КРАЙНЮКОВА А.Н. и др. Методы биотестирования вод. - Черноголовка, 1988, с.37-60.**

Адрес для переписки:

**344090, г.Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 198, ГУ ГХИ, вед. научному сотр. Е.Н. Бакаевой**

(72) Автор(ы):

**Бакаева Елена Николаевна (RU),  
Никаноров Анатолий Максимович (RU),  
Игнатова Надежда Анатольевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Государственное учреждение  
Гидрохимический институт (RU)**

**(54) СПОСОБ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области охраны окружающей среды. Способ может быть использован при экологическом контроле токсичности водных сред различной минерализации, а также в случае чрезвычайных ситуаций на водных объектах. В качестве тест-объекта используют коловратку, вид которой экологически соответствует минеральному составу исследуемой водной среды. Помещают маточную культуру коловратки в пробы с исследуемой (опыт) и чистой (контроль) водой, где выдерживают в течение 2,5-3,0 часа. Исследуемую воду относят к токсичной при наличии в ней абортированных яиц коловратки. Для определения степени токсичности исследуемой водной среды осуществляют серию разведений исследуемой

пробы водой, взятой из фонового чистого участка водного объекта, выдерживают в разведенных пробах в течение 2,5-3,0 часа маточную культуру коловраток, фиксируют разведение, снимающее токсическое действие на абортирование яиц, и степень токсичности исследуемой водной среды оценивают по степени разведения пробы чистой водой до снятия абортирования, причем при разведении пробы до 1:1 исследуемую воду относят к нетоксичной; до 1:25 - к слабо токсичной; до 1:50 - к умеренно токсичной; до 1:100 - к остро токсичной; до 1:500 и более - к весьма токсичной. Значительно повышается экспрессность, достоверность способа. Кроме того, возможна оценка степени токсичности исследуемой водной среды. 1 н. и 1 з.п. ф-лы, 7 прим., 8 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 462 707** (13) **C1**

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/18* (2006.01)  
*A01K 61/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011114744/15, 14.04.2011**

(24) Effective date for property rights:  
**14.04.2011**

Priority:

(22) Date of filing: **14.04.2011**

(45) Date of publication: **27.09.2012 Bull. 27**

Mail address:

**344090, g.Rostov-na-Donu, pr. Stachki, 198, GU  
GKhI, ved. nauchnomu sotr. E.N. Bakaevoj**

(72) Inventor(s):

**Bakaeva Elena Nikolaevna (RU),  
Nikanorov Anatolij Maksimovich (RU),  
Ignatova Nadezhda Anatol'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe uchrezhdenie Gidrokhimicheskij  
institut (RU)**

(54) **METHOD FOR BIOTESTING OF WATER ENVIRONMENT TOXICITY**

(57) Abstract:

FIELD: environment protection.

SUBSTANCE: method may be used in ecological monitoring of toxicity of water environments of various mineralisation, and also in case of emergencies at water facilities. A test object is a rotifer, the type of which is ecologically compatible with mineral composition of a survey water environment. The rotifer stock culture is placed into samples with surveyed (sample) and pure (reference) water, where it is maintained for 2.5-3.0 hours. The surveyed water is referred to as toxic whenever aborted rotifer eggs are found in it. To detect an extent of toxicity of surveyed water environment, a series of surveyed sample dissolution is carried out with water taken from a background pure section of a

water area, the rotifer stock culture is maintained in dissolved samples for 2.5-3.0 hours, dissolution that removes toxic effect at eggs aborting is registered, and the extent of toxicity of surveyed water environment is assessed by extent of dissolution of the sample with pure water before aborting stops, besides, if sample dissolution is to 1:1, the surveyed water is referred to as non-toxic; up to 1:25 - to low-toxic; up to 1:50 - to moderately toxic; to 1:100 - to acute toxic; to 1:500 and above - to highly toxic.

EFFECT: higher speed, validity of the method, possible assessment of extent of toxicity of surveyed water environment.

2 cl, 7 ex, 8 tbl

R U 2 4 6 2 7 0 7 C 1

R U 2 4 6 2 7 0 7 C 1

Предлагаемое изобретение относится к области охраны окружающей среды и может быть использовано при экологическом контроле токсичности водных сред различной минерализации путем биотестирования, а также в случае чрезвычайных ситуаций на водных объектах.

5 Существуют различные способы контроля за состоянием водной среды, которая подвергается антропогенному воздействию, связанному с поступлением в водоем комплекса токсикантов.

10 В России оценку острой токсичности вод на основе биотестирования проводят по таким тест-реакциям, как выживаемость и подвижность дафний [1] (авт. свид. СССР №1111270 МПК 5, G01N 33/18; 33/30), двигательная активность бентосных беспозвоночных, например пиявки, моллюски [2] (авт. свид. СССР №1270699, МПК 4 G01N 33/18; 33/32) и др.

15 Например, известен способ определения токсичности водных сред [3] (авт. свид. №1168168, МКИ A01K 61/00), заключающийся в помещении в анализируемую пробу тест-объекта *Daphnia magna* и учете продолжения их выживаемости.

Известен способ оценки качества вод с помощью биотестирования [4] (авт. свид. 2082167 МКИ G01N 33/18), в котором оценивают возникающие в тестируемой воде изменения поведенческих функций (тест-организмов) моллюсков *Ampullaria gigas*, 20 включая их локомоторную и дыхательную активность, а также ряд других физиологических реакций и по результатам оценки определяют параметры, характеризующие функциональное состояние тест-организмов и являющиеся показателями степени токсичности тестируемой воды.

25 К настоящему времени апробированы сотни тест-объектов и биотестов, среди которых не найден универсальный отклик тест-объекта на повреждающее воздействие. Выбрать такой однозначный индикатор - задача сложная.

30 Наиболее важным показателем, определяющим стратегию существования и развития популяции, является размножение, т.к. наличие потомства обеспечивает процветание популяции и сохранность вида в целом.

Известен способ оценки токсичности водных сред [5] (авт. свид. СССР №1234770 МКИ G01N 33/18), включающий выдерживание тест-объекта (дафнии) в тестируемом растворе, регистрацию ответа, в том числе показателя гибели, показателя 35 плодовитости, показателя мутагенности, и сравнение полученных результатов.

Недостатком известного способа является длительность опытов по выявлению токсического действия водной среды и осуществление контроля токсичности только пресных вод.

40 Наиболее близким техническим решением является выбранный за прототип способ [6] (Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) // Гидробиол. журнал 2000. Т.36, №5. - С.50-70), в котором культивируют маточную культуру дафний вида *Daphnia magna* и *Daphnia pulex*, затем помещают в исследуемую 45 среду и по сбросу партеногенетических яиц определяют токсичность среды. Этот способ известен как тест Л.П.Брагинского и является наиболее универсальным откликом тест-объекта на повреждающее воздействие. Известный способ заменяет длительные хронические опыты по выявлению токсического действия вод, растворов химических веществ по воспроизводству потомства. Эту тест-реакцию можно 50 рассматривать как функциональный отклик на отравление и как безусловный (генетически закрепленный) рефлекс спасения потомства. Этот рефлекс проявляется у многих животных при стрессовых состояниях материнского организма и

специфически выражен у партеногенетически размножающихся беспозвоночных: прикрепленные к телу матери (коловратки) или находящиеся в выводковых камерах (ветвистоусые) партеногенетические яйца сбрасываются в окружающую среду. Тест указывает не только на стрессовое состояние материнского организма, но и на перспективу подрыва дальнейшего воспроизводства популяции. Популяция, сбросившая партеногенетические яйца, обречена на вымирание, поскольку абортированные яйца в дальнейшем развиваться во внешней среде вне связи с материнским организмом не могут и погибают.

Недостатком известного способа является недостаточная экспрессность, т.к. необходимо предварительно вырастить маточную культуру дафний, созревание до половозрелости и формирование партеногенетических яиц у которых занимает около 10 суток. Т.е. продолжительность опыта составит более 10 суток. Такая длительность эксперимента приводит к погрешностям определения токсичности исследуемой воды, т.к. за 10 дней вода, взятая для исследования, претерпевает значительные изменения.

Кроме того, в известном способе в качестве тест-объекта используют дафнии вида *Daphnia magna* и *Daphnia pulex*. Это пресноводные дафнии и по экологическим особенностям своей жизнедеятельности не соответствуют гидрохимическим, климатическим и другим характеристикам многих водных объектов. При оценке токсичности природных вод, несоответствующих естественному гидрохимическому составу (минерализации) воды, в которой выращивалась маточная культура тест-объекта, эти тест-объекты всегда будут показывать токсичность исследуемой воды. Т.о. полученные данные при использовании этих видов не всегда будут экологически достоверны. В частности, предложенные тест-объекты непригодны для оценки токсического загрязнения вод водотоков и водоемов различной солености и зон смешения речных и морских вод.

Техническая задача, решаемая изобретением, - повышение экспрессности способа, повышение достоверности информации при оценке токсичности среды, а также расширение вида партеногенетически размножающихся тест-объектов для оценки токсичности загрязнителей водных сред различного минерального состава.

Поставленная задача решается тем, что в известном способе биотестирования токсичности водной среды, заключающемся в выращивании маточной культуры партеногенетически размножающегося тест-объекта, помещение его в пробы с исследуемой (опыт) и чистой (контроль) водой, выдерживание в них в течение 2,5-3,0 часа и отнесение исследуемой воды к токсичной при наличии в ней абортированных яиц, отличающийся тем, что предварительно определяют минеральный состав исследуемой водной среды, в качестве партеногенетически размножающегося тест-объекта используют коловратку, вид которой выбирают экологически соответствующий минеральному составу исследуемой водной среды, а маточную культуру выбранного вида коловратки выращивают в течение 9-12 часов.

Кроме того, проводят серию разведений исследуемой пробы водой, взятой из фонового чистого участка водного объекта, выдерживание в разведенных пробах в течение 2,5-3,0 часа маточной культуры коловраток до получения разведения, снимающего токсическое действие на абортирование яиц, и степень токсичности исследуемой водной среды оценивают по степени разведения пробы чистой водой до снятия абортирования, причем при разведении пробы до 1:1 исследуемую воду относят к нетоксичной; до 1:25 - к слабо токсичной; до 1:50 - к умеренно токсичной; до 1:100 - к остро токсичной; до 1:500 и более - к весьма токсичной.

Использование в качестве партеногенетически размножающегося тест-объекта коловратки, у которой всегда в популяции присутствуют яйценосные партеногенетические самки, а формирование партеногенетических яиц происходит через 9-12 часов, позволит в течение суток определить токсичность среды, что

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
значительно повысит по сравнению с прототипом экспрессность способа. Выбор в качестве тест-объекта вида коловратки, экологически соответствующей минеральному составу (солёности) исследуемых вод, повысит достоверность оценки токсичности исследуемой среды. Использование степени разведений пробы чистой водой до снятия токсического действия токсикантов на абортывание яиц коловраток позволит дать оценку степени токсичности анализируемой воды.

Совокупность отличительных признаков описываемого способа обеспечивает достижение поставленной задачи.

Сравнение прототипа с заявляемым решением показало, что указанные выше признаки являются отличительными, в связи с чем заявляемый способ соответствует критерию "новизны".

Способ осуществляют следующим образом. Предварительно определяют минеральный состав (солёность) исследуемой водной среды. Выбирают вид коловратки, соответствующей экологическому составу исследуемой водной среды. В случае отсутствия маточной культуры тест-объекта с требуемой минерализацией выращивают маточную культуру выбранного вида коловратки в экологическом оптимуме этой воды до формирования партеногенетических яиц. Время выращивания составляет 9-12 часов. Затем помещают яйценосные партеногенетические самки коловратки в исследуемую пробу. При появлении в пробе через 2,5-3,0 часа абортыванных яиц коловраток делают заключение о токсичности исследуемого водного объекта. Для оценки степени токсичности пробы проводят серию разведений исследуемой пробы водой, используемой для контроля (отстоянная водопроводная или из фонового чистого участка водного объекта), помещению в разбавленные пробы тест-объекта, выдерживание в течение 2,5-3,0 часа, нахождение разбавления снимающего токсическое действие на абортывание яиц. Оценку токсичности пробы дают по степени разведения пробы чистой водой, снимающей абортывание яиц коловраток.

Пример 1. Проводили проверку чувствительности тест-объектов пресноводной коловратки *Brachionus calyciflorus* и солоноватоводной коловратки *Brachionus plicatilis* к воде различной солёности (минерализации). Пресноводный тест-объект - коловратка *Brachionus calyciflorus* был выделен из воды фонового (чистого) участка р.Дон путем концентрирования. Солоноватоводный тест-объект - коловратка *Brachionus plicatilis* был выделен из воды Таганрогского залива Азовского моря путем концентрирования. Маточные культуры тест-объектов поддерживались в лаборатории в соответствии с их экологическими особенностями (солёностью воды). Готовили пробы воды солёностью 4‰, 8‰ из морской соли, а также использовали для проб воду из Таганрогского залива солёностью 8‰, воду из Таганрогского залива солёностью 12‰, воду из озера солёностью 4‰, пресную воду из реки Дон, пресную воду из рыбоводного пруда, пресную воду из реки Темерник. Все пробы вод были взяты из экологически чистых районов исследуемых вод. В каждый вегетационный сосуд (чашки Петри) помещали по 20 экземпляров коловраток, т.е. всего по 60 экземпляров коловраток на каждый вариант опыта. Эксперимент проводили в трех повторностях. Экспозиция составила 3 суток. Наличие живых и погибших особей коловраток, а также подсчет их численности проводили под

бинокулярной лупой. Полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1			
Чувствительность тест-объектов к воде с различной соленостью (экспозиция 3 суток)			
№№	Вариант воды	Тест-объект, % от исходного количества	
		<i>Brachionus calyciflorus</i> (пресноводный)	<i>Brachionus plicatilis</i> (солонатоводный)
1	Искусственная солонатовая среда 4‰	гибель в первые сутки	100
2	Искусственная солонатовая среда 8‰	гибель в первые сутки	100
3	Таганрогский залив, 8‰	гибель в первые сутки	100
4	Таганрогский залив, 12‰	гибель в первые сутки	100
5	Озеро, 4‰	гибель в первые сутки	100
6	р.Дон, пресная вода	100	гибель в первые сутки
7	Пруд, пресная вода	100	гибель в первые сутки
8	р.Темерник, пресная вода	100	гибель в первые сутки

Из таблицы 1 следует, что при помещении пресноводного тест-объекта *Brachionus calyciflorus* в воду с искусственной морской солью, озера и Таганрогского залива Азовского моря, в которых соленость достигает 4-12‰, происходит гибель тест-объекта в первые сутки именно от высокой солености, а не от токсичности воды, что подтверждают опыты 1-5. А при помещении солонатоводного тест-объекта *Brachionus plicatilis* в пресные воды (р.Дон, пруд, р.Темерник) также происходит гибель тест-объекта в первые сутки именно от отсутствия солености, а не от токсичности воды, что подтверждают опыты 6-8. Т.о. для биотестирования водной среды необходимо подбирать вид коловратки, соответствующей солености (минерализации) исследуемой водной среды.

Пример 2. Были проведены исследования возможности использования реакции абортирования коловраток для тестирования вод. Для этого была исследована реакция коловраток (абортирование яиц) на содержание токсиканта кадмия в водах различной солености. Маточные культуры тест-объектов пресноводной коловратки *Brachionus calyciflorus* и солонатоводной коловратки *Brachionus plicatilis* поддерживались в лаборатории в соответствии с их экологическими особенностями (соленостью воды).

Готовили пробы воды соленостью 4‰, 8‰ из морской соли, а также использовали для проб воду из Таганрогского залива соленостью 8‰, воду из Таганрогского залива Азовского моря соленостью 12‰, воду из озера соленостью 4‰, пресную воду из реки Дон, пресную воду из рыбоводного пруда, пресную воду из реки Темерник. Приготовленную воду использовали в качестве контроля, а также для приготовления растворов кадмия (ПДК р/х=0,005 мкг/л), соответствующие 5, 10 и 50 ПДК. В вегетационные сосуды с приготовленной искусственной солонатовой водой помещали тест-объекты, в каждый сосуд по 20 экземпляров самок коловратки с партеногенетическими яйцами, т.е. всего по 60 экземпляров коловраток на каждый вариант опыта.

Эксперимент проводили в трех повторностях. В качестве контроля использовали пробы без добавок кадмия. Экспозиция составила 3 часа. Наличие абортированных яиц и подсчет их численности проводили под бинокулярной лупой. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2	
Реакция коловраток (абортирование яиц) на содержание кадмия в воде (экспозиция 3 ч)	

№№	Вариант		Количество абортированных яиц, % от исходного	
	Вода	Вариант эксперимента	Brachionus calyciflorus (пресноводный)	Brachionus plicatilis (соленатоводный)
5	Искусственная соленоватая среда 4‰	контроль*	100	0
		Кадмий 5 ПДК	100	10
		Кадмий 10 ПДК	100	10
		Кадмий 50 ПДК	100	35
10	Искусственная соленоватая среда 8‰	контроль	100	0
		Кадмий 5 ПДК	100	5
		Кадмий 10 ПДК	100	10
		Кадмий 50 ПДК	100	25
15	Таганрогский залив, 8‰	контроль	100	0
		Кадмий 5 ПДК	100	5
		Кадмий 10 ПДК	100	10
		Кадмий 50 ПДК	100	25
20	Таганрогский залив, 12‰	контроль	100	0
		Кадмий 5 ПДК	100	10
		Кадмий 10 ПДК	100	15
		Кадмий 50 ПДК	100	30
25	Озеро, 4‰	контроль	100	0
		Кадмий 5 ПДК	100	8
		Кадмий 10 ПДК	100	15
		Кадмий 50 ПДК	100	35
30	Р.Дон, пресная вода	контроль	0	100
		Кадмий 5 ПДК	8	100
		Кадмий 10 ПДК	20	100
		Кадмий 50 ПДК	40	100
35	Пруд, пресная вода	контроль	0	100
		Кадмий 5 ПДК	10	100
		Кадмий 10 ПДК	35	100
		Кадмий 50 ПДК	50	100
40	Р.Темерник, пресная вода	контроль	0	100
		Кадмий 5 ПДК	25	100
		Кадмий 10 ПДК	30	100
		Кадмий 50 ПДК	45	100

\*Контроль для каждого варианта - вода из фонового (чистого) участка водного объекта

Из таблицы 2 следует, что в вариантах эксперимента с водой, экологически не соответствующей используемым тест-объектам, за три часа наблюдений произошло полное абортирование яиц. Кроме того, из таблицы 2 следует, что при исследовании воды с экологически соответствующим тест-объектом происходит частичное абортирование яиц, причем степень абортирования зависит от содержания кадмия, что указывает на возможность использования коловраток в качестве тест-объектов для определения токсичности водных сред.

Для тестирования токсичности водной среды, а также для определения степени этой токсичности провели опыты с различными концентрациями известных токсикантов ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, фенол. В ходе опытов в пробах контролировали абортирование яиц коловраток. При появлении абортирования яиц для снятия токсического действия проводили серию разведений исследуемых вод и выдерживание в них маточной культуры коловраток. В каждом варианте для разведения брали воду, используемую в качестве контроля, т.е. воду из фонового чистого участка водного объекта или искусственно приготовленную воду из морской соли. Опыт повторяли и фиксировали степень разведения пробы известной токсичности чистой водой снимающей эту токсичность.

Пример 3. Выращивали в экологическом оптимуме контролируемых сред маточные культуры коловраток: пресноводную коловратку *Brachionus calycifloms* и солоноватоводную коловратку *Brachionus plicatilis*. Выращивание проводилось в течение 9-12 часов.

5 На водопроводной отстоянной воде и воде соленостью 8‰, приготовленной из искусственной морской соли, готовили растворы  $K_2Cr_2O_7$  в концентрациях 0,01 мг/л; 0,1 мг/л, 1,0 мг/л; 5,0 мг/л; 10,0 мг/л, что соответствует степени токсичности: нетоксично, слабо токсично, умеренно токсично, остро токсично, чрезвычайно токсично. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций  $K_2Cr_2O_7$ , приготовленных на водопроводной воде, помещали тест-объекты - пресноводную коловратку *Brachionus calycifloms*. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций  $K_2Cr_2O_7$ , приготовленных на искусственной морской воде, помещали тест-объекты - солоноватоводную коловратку *Brachionus plicatilis*. В качестве контроля использовали пробы без токсикантов. Каждый вариант эксперимента проводили в трех повторностях, помещая в каждую чашку Петри по 20 экземпляров коловраток с партеногенетическими яйцами, т.е. всего по 60 экземпляров коловраток на каждый вариант опыта. Экспозиция составила 2,5-3,0 часа. Эксперименты показали, что все варианты с токсикантом  $K_2Cr_2O_7$  оказывают токсическое действие на коловраток. Происходило абортирование яиц. Для снятия токсического действия проводили серию разведений этих растворов водопроводной отстоянной водой для пресноводной коловратки *Brachionus calycifloms* и искусственной морской водой соленостью 8‰ для солоноватоводной коловратки *Brachionus plicatilis*. Опыты повторяли и фиксировали степень разведения, снимающего токсичность по абортированию яиц. Данные сведены в таблицу 3.

30 Таблица 3  
Токсичность концентраций  $K_2Cr_2O_7$  по результатам биотестирования на двух видах коловраток

Токсикант	Вариант		Количество абортированных яиц, %	
	Концентрация токсиканта в воде мг/л	Разбавление растворов водой	<i>Brachionus calyciflorus</i> (пресноводный)	<i>Brachionus plicatilis</i> (солоноватоводный)
$K_2Cr_2O_7$ , (ПДК р/х=0,07 мг/л)	0,00 (контроль)	Без разбавления	0	0
	0,01 (вода не токсична)	Без разбавления	3	5
		1:1	0 нетоксична	0 нетоксична
	1,0 (вода слабо токсична)	Без разбавления	35	35
		1:1	15	18
		1:25	0 слабо токсична	0 слабо токсична
	5,0 (вода умеренно токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	90
		1:25	45	40
		1:50	0 умеренно токсична	0 умеренно токсична
	10,0 (вода остро токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	85	80
		1:50	50	45
		1:100	0 остро токсична	0 остро токсична
	15,0 (вода чрезвычайно токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	100	100
1:50		100	100	
1:100		50	60	
1:500		0 чрезвычайно токсична	0 чрезвычайно токсична	

Пример 4. На водопроводной отстоянной воде и воде соленостью 8‰, приготовленной из искусственной морской соли, готовили растворы  $\text{CuSO}_4$  в концентрациях 0,01 мг/л; 0,1 мг/л, 1,0 мг/л; 5,0 мг/л; 10,0 мг/л, что соответствует степени токсичности: нетоксично, слабо токсично, умеренно токсично, остро токсично, чрезвычайно токсично. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций  $\text{CuSO}_4$ , приготовленных на водопроводной воде, помещали тест-объекты - пресноводную коловратку *Brachionus calyciflorus*. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций  $\text{CuSO}_4$ , приготовленных на искусственной морской воде, помещали тест-объекты - солоноватоводную коловратку *Brachionus plicatilis*. В качестве контроля использовали пробы без токсикантов.

Выращивание маточных культур коловраток проводилось в течение 9-12 часов. Каждый вариант эксперимента проводили в трех повторностях, помещая в каждую чашку Петри по 20 экземпляров коловраток с партеногенетическими яйцами, т.е. всего по 60 экземпляров коловраток на каждый вариант опыта. Экспозиция составила 2,5-3,0 часа. При появлении ответной реакции коловраток - абортирования яиц, проводили серию разведений этих растворов. Опыты повторяли и фиксировали степень разведения, снимающего токсичность по абортированию яиц. Данные сведены в таблицу 4.

Таблица 4

Токсичность концентраций $\text{CuSO}_4$ по результатам биотестирования на двух видах коловраток				
Вариант			Количество абортированных яиц, %	
Токсикант	Концентрация токсиканта в воде, мг/л	Разбавление растворов водой	<i>Brachionus calyciflorus</i> (пресноводный)	<i>Brachionus plicatilis</i> (солоноватоводный)
$\text{CuSO}_4$ , (ПДК $p/x=0,001$ мг/л)	0,00 (контроль)		0	0
	0,01 (слабо токсична)	Без разбавления	15	12
		1:1	10	10
		1:25	0 слабо токсична	0 слабо токсична
		1:50	0 слабо токсична	0 слабо токсична
	1,0 (умеренно токсична)	Без разбавления	35	35
		1:1	15	18
		1:25	10	8
		1:50	0 умеренно токсична	0 умеренно токсична
	5,0 (остро токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	90
		1:25	45	40
		1:50	25	25
	10,0 (остро токсична)	1:100	0 остро токсична	0 остро токсична
		Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	85	80
		1:50	50	45
	15,0 (чрезвычайно токсична)	1:100	0 остро токсична	0 остро токсична
		1:500	0 остро токсична	0 остро токсична
		Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	100	100
		1:50	100	100
	1:100	50	60	
	1:500	10 чрезвычайно токсична	15 чрезвычайно токсична	

Пример 5. На водопроводной отстоянной воде и морской воде соленостью 8‰,

приготовленной из искусственной морской соли, готовили растворы ZnSO<sub>4</sub>. (0,01; 0,1, 1,0; 5,0; 10,0), что соответствует уровням: нетоксично, слабо токсично, умеренно токсично, остро токсично, чрезвычайно токсично. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций ZnSO<sub>4</sub>, приготовленных на водопроводной воде, помещали тест-объекты - пресноводную коловратку *Brachionus calyciflorus*. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций ZnSO<sub>4</sub>, приготовленных на искусственной морской воде, помещали тест-объекты - солоноватоводную коловратку *Brachionus plicatilis*. В качестве контроля использовали пробы без токсикантов. Выращивание маточных культур коловраток проводилось в течение 9-12 часов.

Каждый вариант эксперимента проводили в трех повторностях, помещая в каждую чашку Петри по 20 экземпляров коловраток с партеногенетическими яйцами, т.е. всего по 60 экземпляров коловраток на каждый вариант опыта. Экспозиция составила 2,5-3 часа. При появлении через 2,5-3,0 часа ответной реакции коловраток - абортирования яиц, проводили серию разведений этих растворов. Опыты повторяли и фиксировали степень разведения, снимающего токсичность по абортированию яиц. Данные сведены в таблицу 5.

Таблица 5

Токсичность концентраций ZnSO <sub>4</sub> по результатам биотестирования на двух видах коловраток				
Вариант			Количество абортированных яиц, %	
Токсикант	Концентрация токсиканта в воде, мг/л	Разбавление растворов водой	<i>Brachionus calyciflorus</i> (пресноводный)	<i>Brachionus plicatilis</i> (солоноватоводный)
ZnSO <sub>4</sub> , мг/л (ПДК р/х=0,01 мг/л)	0,00 (контроль)	0	0	0
	0,01 (слабо токсична)	Без разбавления	3	4
		1:1	10	10
		1:25	0 слабо токсична	0 слабо токсична
	1,0 (слабо токсична)	Без разбавления	70	65
		1:1	25	30
		1:25	0 слабо токсична	0 слабо токсична
	5,0 (умеренно токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	90
		1:25	55	45
		1:50	0 умеренно токсична	0 умеренно токсична
	10,0 (остро токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	85	80
		1:50	50	45
		1:100	0 остро токсична	0 остро токсична
	15,0 (чрезвычайно токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	100	100
		1:50	100	100
1:100		40	45	
1:500		0 чрезвычайно токсична	0 чрезвычайно токсична	

Пример 6. На водопроводной отстоянной воде и морской воде соленостью 8‰, приготовленной из искусственной морской соли, готовили растворы фенола (0,01; 0,1, 1,0; 5,0; 10,0), что соответствует степени токсичности нетоксично, слабо токсично, умеренно токсично, остро токсично, чрезвычайно токсично. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций фенола, приготовленных на водопроводной воде, помещали тест-объекты - пресноводную коловратку *Brachionus*

calyciflorus. В вегетационные сосуды (чашки Петри) с растворами различных концентраций фенола, приготовленных на искусственной морской воде, помещали тест-объекты - солоноватоводную коловратку *Brachionus plicatilis*. В качестве контроля использовали пробы без токсикантов. Выращивание маточных культур коловраток проводилось в течение 9-12 часов.

Каждый вариант эксперимента проводили в трех повторностях, помещая в каждую чашку Петри по 20 экземпляров коловраток с партеногенетическими яйцами, т.е. всего по 60 экземпляров коловраток на каждый вариант опыта.

Экспозиция составила 2,5-3 часа

В случае появления через 2,5-3,0 часа ответной реакции коловраток-абортирования яиц проводили серию разведений этих растворов. Опыты повторяли и фиксировали степень разведения, снимающего токсичность по абортации яиц. Данные сведены в таблицу 6.

Таблица 6

Токсичность концентраций фенола по результатам биотестирования на двух видах коловраток				
Вариант			Количество абортированных яиц, %	
Токсикант	Концентрация токсиканта в воде, мг/л	Разбавление растворов водой	<i>Brachionus calyciflorus</i> (пресноводный)	<i>Brachionus plicatilis</i> (солоноватоводный)
Фенол (ПДК р/х-0,001 мг/л)	0,00 (контроль)	0	0	0
	0,01 (умеренно токсична)	Без разбавления	50	45
		1:1	10	10
		1:25	5	5
		1:50	0 умеренно токсична	0 умеренно токсична
	1,0 (умеренно токсична)	Без разбавления	40	35
		1:1	15	12
		1:25	6	5
		1:50	0 умеренно токсична	0 умеренно токсична
	5,0 (остро токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	90
		1:25	50	45
		1:50	25	25
		1:100	0 остро токсична	0 остро токсична
	10,0 (остро токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	75	80
		1:50	35	40
		1:100	0 остро токсична	0 остро токсична
	15,0 (чрезвычайно токсична)	Без разбавления	100	100
		1:1	100	100
		1:25	100	100
		1:50	100	100
		1:100	65	55
1:500		10 чрезвычайно токсична	15 чрезвычайно токсична	

Таким образом, с помощью экспериментов с известными токсикантами была выведена связь между известной степенью токсичности растворов и степенью разведения ее чистой водой до снятия токсичности. Выведенная зависимость была использована для оценки токсичности исследуемых природных вод.

Кроме того, из проведенных экспериментов следует, что коловратку можно использовать в качестве партеногенетически размножающегося тест-объекта для определения токсичности водных объектов. Выращивание маточной культуры, помещение яйценосных партеногенетических самок коловратки в исследуемую пробу

и реакция коловраток на токсичность среды происходит в течение 11,5-15 часов. В прототипе тестирование токсичности водной среды с использованием в качестве тест-объекта пресноводных дафний вида *Daphnia magna* и *Daphnia pulex* составляет более 10 суток. Это указывает на экспрессность предлагаемого способа. По степени разбавления пробы исследуемой воды чистой водой, используемой в качестве контроля при биотестировании (вода фоновое чистого участка или дехлорированная водопроводная вода исследуемого региона), до снятия абортирования яиц коловраток можно определить степень токсичности исследуемой воды.

Пример 7. Был проведен анализ токсичности вод р.Темерник в разные годы, включавшие период до и после мероприятий по очистке р.Темерник. В вегетационные сосуды с водой, отобранной в трех точках реки Темерник, помещали тест-объекты. Использовали пресноводный тест-объект коловратку *Brachionus calyciflorus*, выделенный из воды фоновое (чистого) участка р. Темерник путем концентрирования. Маточная культура тест-объекта поддерживались в лаборатории.

Эксперимент проводили в трех повторностях. В каждый вегетационный сосуд (чашки Петри) помещали по 20 экземпляров коловраток с партеногенетическими яйцами на самку. Всего в эксперименте 60 коловраток. Экспозиция составила 3 часа.

Наличие абортированных яиц и подсчет их численности проводили под бинокулярной лупой.

В случае абортирования яиц проводили поэтапное разведение исследуемых проб воды водой из фоновое (чистого) участка р.Темерник. Использовали разведение 1:1; 1:25; 1:50; 1:100; 1:500. Данные сведены в таблицу 7, в которой приведена динамика токсичности вод р.Темерник до очистки, и в таблицу 8, где приведена динамика токсичности вод р.Темерник после очистки.

Динамика токсичности вод р.Темерник до очистки				
Год	Точка отбора	Разбавление	Абортирование яиц пресноводной коловратки <i>Brachionus calyciflorus</i> , % от исх.	Токсичность воды
1992	Ростовское Море	1:1	10	слабо токсичная
		1:25	0	
	р.Темерник в районе Ж.д. вокзала	1:1	100	чрезвычайно токсичная
		1:25	100	
		1:50	80	
		1:100	60	
		1:500	0	
	Устье р.Темерник	1:1	100	чрезвычайно токсичная
		1:25	100	
		1:50	90	
		1:100	80	
		1:500	0	

Из таблицы 7 видно, что наиболее загрязненные участки (даже визуально) были участки у железнодорожного моста и в устье. Воды здесь были практически сточными. Токсичность вод снималась при разведении 1:500.

Динамика токсичности вод р.Темерник после очистки				
Год	Точка отбора	Разбавление	Абортирование яиц пресноводной коловратки <i>Brachionus calyciflorus</i> , % от исх.	Токсичность воды

5	2007	Ростовское	1:1	5	слабо токсичная
		Море после очистки р. Темерник	1:25	0	
	р.Темерник в районе Ж.д. вокзала	1:1	10	слабо токсичная	
		1:25	0		
	Устье р.Темерник	Без разведения	0	нетоксичная	

Из таблицы 8 видно, что после мероприятий по очистке р.Темерник токсичность вод снималась при разведении 1:1, а в устье реки (после установки очистительных матов) вода была нетоксичной. Предложенный способ отвечает требованиям чувствительности, экологической достоверности результатов, экспрессности получения информации, простоты культивирования тест-объектов, дешевизны, возможности снятия прижизненных параметров.

#### Источники информации

1. Авт. свид. СССР №1111270, МКИ 5 G01N 33/18; 33/30.
2. Авт. свид. СССР №1270699, МКИ 4 G01N 33/18; 33/32.
3. Авт. свид. №1168168, МКИ A01K 61/00.
4. Авт. свид. 2082167, МКИ G01N 33/18.
5. Авт. свид. СССР №1234770, МКИ G01N 33/18.
6. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* и других ветвистоусых ракообразных (критический обзор) // Гидробиол. журн, 2000. Т.36, №5. - С.50-70 - (прототип).

#### Формула изобретения

1. Способ биотестирования токсичности водной среды, предусматривающий выращивание маточной культуры партеногенетически размножающегося тест-объекта, помещение его в пробы с исследуемой (опыт) и чистой (контроль) водой, выдерживание в них в течение 2,5-3,0 ч, и отнесение исследуемой воды к токсичной при наличии в ней абортированных яиц, отличающийся тем, что предварительно определяют минеральный состав исследуемой водной среды, в качестве партеногенетически размножающегося тест-объекта используют коловратку, вид которой выбирают экологически соответствующий минеральному составу исследуемой водной среды, а маточную культуру выбранного вида коловратки выращивают в течение 9-12 ч.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что осуществляют серию разведения исследуемой пробы водой, взятой из фонового чистого участка водного объекта, выдерживание в разведенных пробах в течение 2,5-3,0 ч маточной культуры коловраток, фиксирование разведения, снимающего токсическое действие на абортывание яиц, и степень токсичности исследуемой водной среды оценивают по степени разведения пробы чистой водой до снятия абортывания, причем при разведении пробы до 1:1 исследуемую воду относят к нетоксичной; до 1:25 - к слабо токсичной; до 1:50 - к умеренно токсичной; до 1:100 - к остро токсичной; до 1:500 и более - к весьма токсичной.