

РЕФЕРАТ

Отчет содержит - 77 стр., 19 табл., 3 рисунка, Библ 13.

Ключевые слова: биопрепарата «AQUA-EM-1», нитраты, нитриты, аммонийный азот, динамика численности гетеротрофных бактерий в присутствии ЭМ-1, динамика численности микроорганизмов входящих в биопрепарат. органолептические показатели, водоросли, рыбы, хирономиды, дафнии, генотоксичность, ЛПВ, класс опасности, ПДК.

В отчете приведены материалы по определению предельно допустимой концентрации (ПДК), в воде рыбохозяйственных водоемов для биопрепарата «AQUA-EM-1». Испытания проведены в острых и хронических опытах на представительных гидробионтах, моделирующих трофическую структуру биоценоза по следующим показателям: санитарно-токсикологические показатели (нитриты, нитраты, аммонийный азот, динамика численности сапрофитных бактерий и динамика численности бактерий входящих в состав препарата); водоросли сценедесмус (динамика численности клеток в хроническом опыте); дафнии-магна (выживаемость исходных особей и в последующих трех поколений), эмбрионы и личинки рыб (данио рерио), взрослые рыбы (данио, радужная форель), гистология, гематология, генотоксичность, органолептика. За эколого-рыбохозяйственный норматив (ПДК) для биопрепарата а «AQUA-EM-1» в воде рыбохозяйственных водоемов по сухому веществу, следует принять равной 40 мг/л., а титр клеток препарата $4,7 \times 10^5$ кл/мл. Наиболее чувствительные звенья: гидрохимические показатели, сапрофитные бактерии, водоросли, дафнии. Лимитирующее звено органолептика.. ЛПВ – органолептический. Класс опасности - 4.

Список исполнителей темы

1. Пономарева А.Л., к. б. н., руководитель темы, микробиология ТОИ ДВО РАН.
2. Стом Д.И., д.б.н., зав. лабораторией Водной токсикологии НИИ Биологии при ИГУ, гидробиология и токсикология
3. Еськова А.И, к.б.н., биохимик ТОИ ДВО РАН.
4. Лекгодимов А.А., научный сотрудник, эколог.
5. Григоров Р.А. инженер, альгология, экология и биометрия.
6. Сырбу Н.С., к.г-м.н. зав. лабораторией Комплексных исследований окружающей среды и минеральных ресурсов.

Содержание

1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. Методы исследования	6
2.1. Микробиологическая и физико-химическая характеристика биопрепарата «AQUA-EM-1»	6
2.2. Оценка жизнедеятельности бактериального населения	10
2.3. Оценка максимальных допустимых концентраций вещества для пресноводных биологических тест-объектов	14
2.4. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для высших водных растений	20
2.5. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для простейших	25
2.6. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для зоопланктонных ракообразных	28
2.7. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для бентосных организмов	31
2.9. Гистологические исследования ткани рыб и гематологический анализ при воздействии биопрепарата «AQUA-EM-1»	39
2.10. Оценка генотоксичности биопрепарата «AQWAEM-1»	40
2.11. Органолептические свойства бульона и мяса рыб	41
2.12. Статистические методы анализа результатов исследования	41
3. Результаты исследований	43
3.1. Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на органолептические и гидрохимические показатели воды	43
3.1.1. Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на органолептические показатели воды	43
3.1.2. Органолептические свойства бульона и мяса рыб после экспозиции годовиков радужной форели в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1»	44
3.1.3. Влияние препарата «AQUA-EM-1» на pH и содержание растворенного кислорода	44
3.1.8. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на динамику прироста гетеротрофных бактерий	45

3.2. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на первичных продуцентов	50
3.2.1. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на динамику прироста клеток <i>Scenedesmus quadricaudata</i> Turp.....	50
3.2.2. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на биологические показатели у ряски	52
3.3. Действие различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» на дафний.	54
3.4. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на выживаемость и метаморфоз личинок хирономид.....	56
3.5. Действие растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на рыб	57
3.5.1. Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на эмбриональное развитие <i>Brachydanio rerio</i>	57
3.5.2. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на выживаемость предличинок <i>Brachydanio rerio</i>	59
3.5.3. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на выживаемость мальков и взрослых рыб	60
3.5.4. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на гистологические характеристики органов годовиков радужной форели	62
3.5.5. Гематологический анализ крови рыб после воздействия растворов биопрепарата «AQUA-EM-1»	63
3.6. Оценка генотоксичности исследуемых растворов биопрепарата «AQUA-EM-1».....	66
3.7. Перерасчет норматива препарата «AQUA-EM-1» по сухому веществу и установление ПДК по титру клеток в 1 мл.....	70
ЛИТЕРАТУРА	72
АННОТАЦИОННАЯ КАРТА.....	74

1. ВВЕДЕНИЕ

В данной работе проведено установление эколого-рыбохозяйственного норматива ПДК для биопрепарата «AQUA-EM-1» в воде рыбохозяйственных водоемов. Биопрепарат «AQUA-EM-1», представляющий собой консорциум эффективных микроорганизмов: молочнокислых бактерий и дрожжей, предназначается для очистки воды рыбохозяйственных водоемов и для поддержания гидробиоценоза водоема в оптимальных условиях.

Для установления рыбохозяйственного ПДК нами использован метод моделирования в лабораторных условиях воздействия биопрепарата «AQUA-EM-1» на трофическую структуру гидробиоценоза. В этом случае определение максимально допустимых концентраций проводится на представительных гидробионтах по системе «от бактерий до рыб», применяемой в настоящее время в лабораториях, устанавливающих предельно допустимые концентрации в воде рыбохозяйственных водоемов [1]. Установление рыбохозяйственного норматива ПДК для микробиологического препарата «AQUA-EM-1» проведено согласно пункту 5. Требования к разработке ПДК и ОБУВ биологических препаратов Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 22 декабря 2016 года), приказом Росрыболовства от 4 августа 2009 года N 695. Особое внимание нами уделялось взаимодействию гетеротрофных бактерий водоема и микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата.

Установление норматива ПДК и соблюдение поступления биопрепарата «AQUA-EM-1» в пределах установленной нормы, позволит предохранить биоценозы рыбохозяйственных водоемов от дисбаланса развития организмов в отдельных пищевых звеньях и сохранить трофическую структуру гидробиоценоза.

Особенностью воздействия биопрепарата «AQUA-EM-1» может оказаться его способность влиять на бактериальную микрофлору водоема и на планктонные водоросли. По этой причине нами рассмотрена динамика прироста гетеротрофных бактерий, характерных для рыбохозяйственного водоема, в присутствии различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1».

При установлении ПДК особое внимание мы обращали на массовые виды, к которым относятся представители гидробионтов, включенные в систему, моделирующую трофическую структуру гидробиоценоза [2, 3, 4, 5].

Работа на представительных организмах, входящих в модельную трофическую структуру гидробиоценоза, позволяет также выяснить сравнительную чувствительность тест-объектов к действию биопрепарата «AQUA-EM-1» в хронических опытах. Это, видимо, единственный путь позволяющий проследить за биологическим действием различных разведений биопрепарата «AQUA-EM-1» за достаточно длительный промежуток времени.

Окончательным итогом установления ПДК будет служить разработка максимальных концентраций для каждого моделируемого звена трофической структуры биоценоза, и выявление наиболее чувствительного звена к биопрепарату ЭМ-1, по которому будет определен рыбохозяйственный норматив – ПДК.

2. Методы исследования

2.1. Микробиологическая и физико-химическая характеристика биопрепарата «AQUA-EM-1»

Биопрепарат «AQUA-EM-1» производится на основе консорциума бактерий *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Streptococcus lactis* и *Saccharomyces cerevisiae* и представляет собой жидкий концентрат с незначительным осадком, содержащий комплекс консорциума вышеуказанных бактерий и продуктов их жизнедеятельности. Помимо очистки воды он употреблялся как удобрение и применяется путем полива

(корневая подкормка) или опрыскивания (внекорневая подкормка) растений в период вегетации.

Условное обозначение продукции:

Препарат микробиологический для очистки воды «AQUA-EM-1» ТУ 9291-004-80909463-2013.

Технические требования

Биопрепарат «AQUA-EM-1» должен соответствовать требованиям настоящих технических условий и изготавливаться по технологической инструкции, утвержденной в установленном порядке с соблюдением действующих санитарных норм и правил.

По органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям препарат должен соответствовать нормам, указанным в таблице 1.

Таблица 1.

Наименование показателя	Характеристика или норма	Методы контроля
1	2	3
1 Внешний вид, цвет, запах	Жидкость, темно-коричневая, кисло-сладкая	4.1
2 Кислотность, показатель активности водородных ионов (рН)	3,0-3,5	4.2
3 Титр молочнокислых бактерий, КОЕ/см ³ , не менее	10 ⁸	4.3
4.Титр дрожжей, КОЕ/см ³ , не менее	10 ⁴	4.4
5.Наличие посторонней микрофлоры, %, не более	5	4.5
6 Санитарно-гигиенические показатели		

Наличие патогенной микрофлоры, в том числе сальмонеллы	Не допускается	4.7
--	----------------	-----

При производстве используют следующие сырье и материалы:

- маточные культуры молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F 116 и дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*;

- патоку крахмальную по ГОСТ Р 52060;
- глюкозу по ГОСТ 6038;
- солод пивоваренный ячменный по ГОСТ 29294;
- кислоту уксусную по ГОСТ 6968;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- воду питьевую СанПиН 2.1.4.1074;
- вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556.

Допускается использовать сырье, производимое по другой действующей нормативной документации, не ниже качеством.

Маркировка по ОСТ 6 15-90.3

В маркировке указывают:

- наименование предприятия-изготовителя и юридический адрес;
- наименование продукции;
- назначение продукции и область ее применения;
- условия хранения;
- класс опасности;
- объем;
- срок хранения;
- обозначение настоящих технических условий;
- дату изготовления;
- номер государственной регистрации.

Способ нанесения маркировки: непосредственно на единицу упаковки - печатными машинами; наклейкой бумажных этикеток, липких аппликаций и ярлыков.

Транспортная маркировка - по ГОСТ 14192 с нанесением манипуляционных знаков «Бережь от солнечных лучей», «Ограничение температур» и «Верх».

Разработка ПДК для биопрепарата «AQUA-EM-1» в воде рыбохозяйственных водоемов была проведена по общепринятой методике с соблюдением правил, используемых при установлении ПДК для биологических препаратов [1].

При проведении экспериментов сохраняется общая схема установления ПДК, в которой изучается действие биопрепарата на представительных гидробионтов, моделирующих трофическую структуру гидробиоценозарибохозяйственного водоема. Динамика развития микроорганизмов, входящих в состав «AQWAEM-1» определялась путем посева микроорганизмов на МПА и элективные питательные среды для подсчета микроорганизмов входящих в препарат и определения динамики численности молочнокислых бактерий и дрожжей при различных концентрациях биопрепарата. Мы изучали действие растворов исследуемого биопрепарата на гидрохимические показатели, на динамику прироста гетеротрофных бактерий и динамику численности отдельных групп микроорганизмов, входящих в препарат, водорослей, а также на выживаемость и размножение дафний у исходных особей и в последующих 3-х поколениях. За интенсивностью белкового обмена у дафний следили по количеству сброшенных карапаксов. Помимо этого исследовалось действие биопрепарата «AQUA-EM-1» на бентосные организмы (*Chironomus plumosus*), а также на отдельные стадии онтогенеза рыб (*Brachydanio rerio*). За изменением гистологических, гематологических и органолептических показателей следили по отклонениям биологических показателей у годовиков радужной форели (*Parasalmo mykiss*).

2.2. Оценка жизнедеятельности бактериального населения

Нарушение жизнедеятельности бактериального населения под действием химических веществ может привести к изменению качества водной среды и, в конечном итоге, к деградации экосистемы водного объекта. В связи с этим, при установлении ПДК вещества следует определять его влияние на разные группы бактерий-минерализаторов. Для экспериментального исследования предлагается следующая цепочка объектов:

а) сапрофиты, растущие на мясопептонном агаре (МПА) разведенном в 10 раз (МПА:10);

б) нитрификаторы 1-й фазы;

в) нитрификаторы 2-й фазы.

Характеристика тест-объекта

Наибольшей физиологической активностью обладают сапрофиты, первыми начинающие процесс минерализации, разлагая азотсодержащую органику до аммонийного азота. Их сменяют нитрификаторы 1-й фазы, окисляющие аммонийный азот до нитритов, а затем - нитрификаторы 2-й фазы, окисляющие нитриты до нитратов.

Для регистрации состояния бактерий в экспериментах применялся следующий набор основных показателей:

а) Численность сапрофитов. Если исследуемое вещество легко усваивается бактериями, их численность значительно возрастает, превышая численность в контроле, а если токсично - количество микроорганизмов снижается. Численность рассчитывалась высевом на плотные питательные среды.

Для этих целей определялось количество бактерий в 1 мл воды, способных расти на мясо-пептонноагаре (МПА). Подсчет колоний в чашках Петри проводили через каждые 24 часа после посева. К одному мл исследуемой воды добавляли 9 мл физиологического раствора, а затем из каждой пробирки переносили 1,0 мл жидкости для получения соответствующего разведения.

Мясо-пептонный агар расплавляли в водяной бане, а затем охлаждали до 40°C. После этого стерильной пробиркой отбиралась соответствующая проба и вносилась в 2 стерильные чашки Петри, затем следовала заливка мясо-пептонным агаром при перемешивании исследуемой воды вращательным движением. После остывания чашки Петри помещались вверх дном в термостат на 24 часа. Через 24 часа производили подсчет колоний на поверхности и в глубине агара. Для исследования были взяты концентрации с растворением в 100, 200, 1000, 2000 и 10000 раз, что соответствует 10; 5; 1,0 0,5 и 0,1 мл/л. Спектр концентраций был взят исходя из практических результатов использования препарата, при указанных концентрациях выявлены положительные эффекты воздействия на гетеротрофные бактерии. Во внимание принимался также расчет количества микроорганизмов в 1 мл препарата (верхняя концентрация растворение в 100 раз, и нижняя концентрация растворение в 10000 раз, когда по расчетам в мл биопрепарата должна содержаться 1 кл. дрожжей).

Для посева и подсчета молочнокислых бактерий и дрожжей нами использовалась элективная среда ЛактоАгара и Сабуро, широко применяемые в микробиологической практике.

б) Дыхание бактерий. Определяется по БПК₅. Этот показатель характеризует физиологическую активность бактерий и не всегда коррелирует с численностью бактерий (в связи с тем, что токсическое действие некоторых ксенобиотиков выражается в увеличении численности бактерий на фоне снижения их физиологической активности). БПК₅ определяли по ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 (ФР.1.31.2007.03796) Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимического потребления кислорода после n-дней инкубации (БПК_{полн.}) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах.

в) Концентрация растворенного кислорода. Показатель аэробного состояния среды (ПНД 0 14.1:2.101-97 Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации растворенного

кислорода в пробах природных и очищенных сточных вод йодометрическим методом).

г) Аммонийный азот. Продукт метаболизма сапрофитов-аммонификаторов (ПНДФ 14.1:2:3.1-95 Методика измерений массовой концентрации ионов аммония в природных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Несслера).

д) Азот нитритов. Продукт метаболизма нитрификаторов 1-й фазы. (ПНДФ 14.1:2:43-95. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации нитрит-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Грисса)

е) Азот нитратов. Продукт метаболизма нитрификаторов 2-й фазы. (ПНДФ 14.1:2:4.4-95. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации нитрат-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с салициловой кислотой)

ж) рН среды. Показатель активной реакции среды.

Длительность наблюдения обусловлена сроком полной минерализации азотсодержащей органики в нормальных условиях до стабильной формы азота в виде нитратов. Момент окончания опыта определяют выходом концентрации нитратов в контрольном экспериментальном сосуде на стационарный уровень (плато), что происходит на 25-30-е сутки.

Проведение исследований

Необходимое оборудование:

термостат-стерилизатор;

термостат с водяной рубашкой для поддержания температуры 20°C;

автоклав;

фотоэлектроколориметр или спектрофотометр;

потенциометр;

мерные колбы на 50, 100, 200, 250, 500 и 1000 см³;

стеклянные кристаллизаторы на 5 дм³;

кислородные склянки вместимостью около 200 см³;

чашки Петри;
пробирки, бюретки.

Предварительный опыт был проведен с 10; 5; 1,0 0,5 и 0,1 мл/л концентрациями исследуемого вещества. Исследование проводили в стеклянных стаканах объемом 1 л, наполовину заполненных природной водой из чистого водного объекта, профильтрованной через мельничное сито N76. Во все стаканы вносили пептон из расчета 3 мг/дм³, который обеспечивает БПК₅, не превышающее 5 мгО₂/дм³, и соответствующее количество исследуемого вещества. В контрольный сосуд исследуемое препарат «AQWAEM-1» не вносили.

В предварительном опыте контролируется только один показатель - численность сапрофитов, растущих на МПА:10. Посевы проводят в трехкратной повторности глубинным методом. Чашки Петри с посевами инкубируют при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение двух суток, после чего просчитывают количество выросших колоний. Отбор проб для посевов проводят ежедневно в течение 4-5 суток. На основании полученных результатов планируют основной опыт.

При работе с искусственной морской водой - в подготовленную искусственную морскую воду вносили в предварительно выращенную на МПА морскую естественную микрофлору из природной морской воды бухты Алексеева о. Попова залива Петра Великого. Выдерживают при комнатной температуре в течение недели (время адаптации) - для размножения бактерий и стабилизации гидрохимических параметров. После этого проводили токсикологический эксперимент.

Основной опыт ставят при тех же условиях, что и предварительный опыт. Оценивают действие вещества в пяти концентрациях, из которых максимальной служит та наименьшая концентрация, которая в предварительном опыте снижала численность сапрофитов по сравнению с контролем более чем на 25%. Другие концентрации различаются не более, чем в 5 раз. Опыт проводят в трех повторностях.

В ходе длительного опыта учитывают следующие показатели:
рН - в исходные, на 10, 20 и 30 сутки;
растворенный кислород - в исходные, на 3, 5, 7, 10 и 15 сутки;
численность сапрофитов, растущих на МПА:10, - в исходные, на 1, 3, 5
и 7 сутки;

БПК₅- в исходные, на 1, 3, 5 и 7 сутки;
азот аммонийный - в исходные, на 1, 3, 5, 7, 10 и 15 сутки;
азот нитритов - на 5, 7, 8, 9, 10, 12 и 15 сутки;
азот нитратов - на 7, 9, 10, 12, 15, 20, 25 и 30 сутки.

Результаты перечисленных определений обрабатывают статистически и оценивают достоверность отклонения опытных величин от контрольных. Допустимыми концентрациями считаются такие, которые не вызывают достоверного отклонения исследуемых показателей от контрольных.

2.3. Оценка максимальных допустимых концентраций вещества для пресноводных биологических тест-объектов

Планктонные одноклеточные водоросли (фитопланктон), как и высшие водные растения, представляют в водных экосистемах группу организмов-продуцентов.

Испытание воздействия биопрепарата «AQWAEM-1» проводили на альгологически чистой культуре протококковых водорослей (*Scenedesmus quadricaudata*). Опыты были поставлены в трех кратной повторности. Для исследования брали следующие концентрации биопрепарата «AQWAEM-1»: 10,0; 5,0; 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л. Спектр концентраций биопрепарата обоснован выше.

Для экспериментов используют культуру водорослей в экспоненциальной фазе роста. Большое значение имеет физиологическое состояние культуры, проверяемое по эталонному (стандартному) веществу.

Оценка влияния вещества на одноклеточные водоросли оценивается по показателям изменения численности клеток водорослей (снижение или увеличение) в опытной среде по сравнению с контролем;

Достоверное снижение численности клеток водорослей в растворе вещества является показателем токсического действия раствора вещества.

Критерием эвтрофирующего эффекта вещества является достоверное увеличение численности клеток водорослей в различных концентрациях вещества. Лимитирующий показатель вредности в данном случае - санитарный.

Наряду с изучением динамики численности водорослей к регистрируемым показателям в опыте следует относить изменение рН; визуальные наблюдения за состоянием культуры водорослей: изменения в окраске, форме клеток и состоянии суспензии (взвешенное, опускание на дно, всплывание к поверхности, гомогенность или агрегация) по сравнению с контролем.

В качестве экспресс-метода оценки токсичности (эвтрофирования) химического вещества можно использовать приборный метод быстрой или замедленной флуоресценции водорослей (Минрыбхоз СССР введены в действие методические разработки ВНИРО от 18 декабря 1987 года N 291-ц "Методические рекомендации по экспрессному биотестированию природных и сточных вод с использованием замедленной флуоресценции одноклеточных водорослей". М.: ВНИРО, 1987). Показания изменения флуоресценции водорослей в растворах вещества по отношению к контролю следует относить к основным показателям, характеризующим процессы жизнедеятельности одноклеточных водорослей. Показания быстрой и замедленной флуоресценции относятся только к живым клеткам, отражают интенсивность процесса фотосинтеза водорослей, по калибровочной кривой позволяют определить количество живых клеток в эксперименте.

Кратковременная оценка токсичности раствора вещества - до 24-96 ч - позволяет определить наличие острого токсического действия вещества на одноклеточные водоросли, а длительное исследование - до 14 суток - его хроническое токсическое действие.

К дополнительным показателям при исследовании следует относить: оценку биомассы водорослей (полученную расчетным методом), оценку скорости и темпа деления клеток (расчет генераций), содержание фотосинтезирующих пигментов (хлорофилла и каротиноидов), соотношение живых и мертвых клеток водорослей (используя люминисцентный микроскоп или различные витальные красители-цитохимический метод).

В качестве стандартного тест-объекта использовали лабораторную альгологически чистую монокультуру одноклеточных зеленых водорослей *Scenedesmu quadricauda*(Turp.) Vreb.

Scenedesmus quadricauda широко распространен в водных объектах России и имеет относительно крупные удлинено-овальные клетки с закругленными концами. Размер клеток 7-43 2,5-16 мкм. Клетки неподвижные, собранные в виде плоских пластинок (ценобии) по 2-, 4-, реже 8, 16 клеток. Размножение автоспорами. Автоспоры в материнской оболочке располагаются пучком, после освобождения разворачиваются в виде пластинки. В условиях культуры вместо ценобиев образуются отдельные клетки.

После пересева культур на новую среду экспоненциальная фаза роста наступает на 4 сутки.

Численность клеток за 3 суток увеличивается не менее чем в 3 раза.

Используется обычное лабораторное оборудование, приборы, посуда и реактивы, в том числе:

фильтровальная установка любого типа;

фильтры мембранные (размер пор 3,5 мкм, 0,45 мкм);

пипетки автоматические-дозаторы объемом 0,1, 0,2 см ;

камера счетная Горяева или Фукс-Розенталя;

предметные и покровные стекла;

климатостат (люминоостат) любого типа, оснащенный лампами дневного света 3000-6000 лк, обеспечивающий поддержание температуры $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$;

спиртовка;

pH-метр;

оксиметр любого типа с погрешностью измерения не более 0,5 мг/дм ;

микроскоп биологический, обеспечивающий увеличение в 100-200 раз;

стаканы стеклянные лабораторные объемом 100, 500, 1000 см ;

колбы конические емкостью 50, 100, 250, 1000 см ;

эталонное (стандартное) химическое вещество: калий двуххромовоокислый (бихромат калия) или стандарт-титр калия двуххромовоокислого для проверки физиологической чувствительности культуры водорослей;

культуры зеленых одноклеточных водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb.

Культивировали водоросли (Таблица 2) на среде Прата (Утверждено Минприродой России от 27 апреля 2001 г. "Руководство по определению методов биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов". М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2002).

Таблица 2. Состав среда Прата

Компоненты среды	Концентрация в среде для культивирования, г/дм	Концентрация исходных растворов для приготовления среды, г/100см
KNO ₃	0,1	10,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	1,0
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,01	1,0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,001	0,1

Питательную среду Прата для культивирования водорослей готовили на дистиллированной воде. Чтобы избежать образования осадка в питательной среде, каждый ее компонент предварительно готовят отдельно в 100 см³ дистиллированной воды (исходный раствор). Исходные растворы хранят в

холодильнике при температуре от +2°C до +4°C в течение месяца, в случае помутнения производят их замену.

Из исходных растворов каждого вещества (кроме солей железа) по 1 см³ добавляют в колбу объемом 1 дм³, наполовину наполненную дистиллированной водой. Доливают колбу дистиллированной водой до объема 1 дм³, перемешивают, после чего питательную среду стерилизуют в автоклаве (30 мин. при 1 атм.) или кипячением на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения стерилизованной среды в нее добавляют соль железа в количестве 1 см на 1 дм³ среды (для среды Прата 1%-й раствор FeCl₃×6H₂O).

Приготовленную среду хранят до использования в темном месте при комнатной температуре.

Культивировали водоросли в люминостате в конических колбах объемом 250-300 см³, закрытых фольгой или ватно-марлевым тампоном. Освещенность 3000-6000 люкс. Соблюдается световой суточный ритм. Культуру водорослей периодически перемешивали, встряхивая 1-2 раза в сутки. Температура при культивировании водорослей 20 ± 2°C.

В опыте использовали начальную плотность клеток 25 тыс.кл/см³. Периодически (не реже 1 раза в месяц) проводили контроль физиологической чувствительности водорослей. Для этого использовали стандартное (эталонное) вещество - двуххромовокислый калий K₂Cr₂O₇ марки химически чистый ("хч") или стандарт-титр калия двуххромовокислого.

При постановке острых и хронических экспериментов в контрольные и опытные колбы емкостью 250 мл наливали по 100 мл (в колбы емкостью 100 мл - по 50 мл) контрольной среды или исследуемой концентрации вещества. Контролем служит культуральная среда, на которой культивируются водоросли (среда Прата). Концентрации веществ также готовили на соответствующей среде.

В опытные и контрольные колбы пипеткой добавляли по 0,5 см³ (0,25 см³) культуры водорослей в экспоненциальной фазе роста.

Колбы инкубировали в люминостане. В эксперименте исследовано не менее 5 концентраций вещества. Повторность трехкратная.

Эксперименты на водорослях проводятся в 2 этапа: предварительный и основной (окончательный).

В предварительном остром эксперименте находили интервал токсичных концентраций. В основном остром и хроническом экспериментах шаг между концентрациями изменяется в 2-5 раз. Исследуют не менее пяти концентраций в трех повторностях.

Подсчет клеток водорослей проводили в остром опыте ежедневно, в хроническом - на 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 сутки.

Основным критерием токсичности действия веществ на тест-объект считали изменение численности клеток водорослей, последовательность прохождения ими всех стадий развития и их способности к размножению.

Для подсчета численности клеток используют счетную камеру Горяева.

По окончании эксперимента рассчитывали численность клеток водорослей в остром и хроническом опытах по сравнению с контролем (в том числе и в процентах).

Рассчитывали численности клеток на 1 см³ среды следующим образом: количество клеток в 25 больших квадратах камеры Горяева умножают на 10, получая количество клеток в 1 см³ суспензии.

Количество клеток также выражают в 1 см³. Расчет клеток производили по формуле:

$$M = \frac{m \cdot 10^3}{n \cdot v},$$

где M - количество клеток в 1 см³;

m - количество просчитанных клеток (сумма);

n - количество просчитанных маленьких квадратов камеры;

V - объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата.

Результаты исследования учитывали, если численность клеток водорослей в контроле увеличивается за 96 ч не менее чем в 3 раза. При изменении численности клеток в контроле менее чем в 3 раза результаты опыта считали недействительными.

Используя приемы статистической обработки, устанавливают достоверность различия (снижение или увеличение) численности клеток между опытом и контролем.

Численность живых и мертвых клеток определяли с помощью люминесцентной микроскопии. Жизнеспособные клетки светились ярким пурпурно-красным светом, отмирающие - различными оттенками тускло-красного или оранжево-красного тона, мертвые - желтовато-салатным. При подсчете клеток водорослей учитывали все три группы - живые, мертвые и отмирающие клетки. В стадии интенсивного роста клеток водорослей в культуре наблюдается минимальное присутствие мертвых клеток.

Измерение pH среды осуществляли с помощью pH-метров начале и конце опыта, при хроническом эксперименте - в дни учета биологических показателей.

2.4. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для высших водных растений

Высшие водные (сосудистые) растения являются важным компонентом сообщества организмов-продуцентов водных объектов. Иногда такие растения называют макрофитами из-за их относительно крупных размеров.

Высшие пресноводные растения образуют основную фитомассу водных объектов, являются основным звеном, создающим первичное органическое вещество и выделяющим кислород, служат основным субстратом для размножения водных животных и местом их укрытия от опасности. Важную роль играет это звено в самоочищении водных объектов.

В схеме определения ПДК вещества это звено представлено (на выбор) двумя видами - укореняющейся *Elodea canadensis* Rich. (элодея), у которой основная часть стебля взвешена в толще воды, и плавающей *Lemna minor* L.

(ряска), у которой в толще воды располагаются только корешки, а основное растение стелется по поверхности.

Элодея (*Elodea canadensis* Rich.) - представитель погруженных растений, широко распространенный в пресноводных водных объектах умеренной зоны.

Размножается вегетативным путем за счет образования густо облиственных боковых отростков, побегов из подземных частей (корневищ) или из нижних частей летних побегов. Теневынослива. Температурная граница выживаемости лежит в пределах от +5°C до 41,5°C.

Для культивирования растения отбирали из естественной популяции условно чистого водного объекта пресноводного озера на территории МЭС «о. Попова» ТОИ ДВО РАН в начале мая 2023г, когда появляется много молодых, наиболее жизнеспособных растений.

У элодеи отбирали зеленые верхушечные побеги длиной 8-10 см без боковых отростков и корней, не имеющие видимых повреждений.

Отобранные растения транспортировали в сосудах с водой, взятой из того же водного объекта.

В лаборатории элодею размещали в больших широких, но не глубокие емкостях (10-15 дм³). Растения проходят акклиматизацию при комнатной температуре в течение 7-10 дней, достаточной освещенности (лучше - в люминистатной установке) и при смене воды каждые 2-3 суток.

Для работы с растениями необходимо следующее оснащение:

- люминистатная установка;
- круглые аквариумы на 10-15 л;
- кристаллизаторы объемом 1 л;
- стаканы объемом 0,5 л;
- люксметр;
- термометр;
- линейка;
- глазной пинцет, лезвие;

воронка, набор пипеток, стеклянная палочка;
планктонный газ N 68, фильтровальная бумага.

Для проведения экспериментов и культивирования растений использовали отстоянную водопроводную воду. Для исследований воду используют через 4-5 дней.

Сосуды располагали у окон на дневном рассеянном свете на протяжении 10-12 ч и при температуре 22-25°C. Для измерения температуры раствора рядом ставили стакан с водой и термометром.

В воду добавляют среду Успенского N 1 (разведение 1:10), которая способствует быстрому образованию боковых отростков и увеличению биомассы растения и дает возможность круглогодичного содержания растений, пригодных для экспериментов.

Таблица 3. Состав среда Успенского 1

Компоненты среды	Концентрация в среде для культивирования, г/дм ³	Концентрация исходных растворов приготовления среды, г/100см ³
KNO ₃	0,025	2,5
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,025	2,5
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	0,144	14,4
KH ₂ PO ₄ × 3H ₂ O	0,025	2,5
K ₂ CO ₃	0,0345	3,45

Предварительно приготовленные основные растворы хранили в холодильнике, затем из них вносили по 0,5 см³ на 1 дм³ дистиллированной воды; рН после стерилизации раствора (равномерным кипячением в течение 0,5 ч) составляет 7,0-7,3.

Для экспериментов брали верхнюю часть побега элодеи длиной 4 см без боковых отростков и корней и по 5 экземпляров помещали в широкогорлые стаканы с растворами исследуемого вещества и с водой без токсиканта объемом по 1 дм³. Для каждой концентрации и для контроля используют по три таких сосуда. Сосуды размещали в люминостане или у окон на дневном

рассеянном свете с досвечиванием лампами дневного света при температуре 17-22°C.

До проведения хронического эксперимента использовали те концентрации, которые были установлены в предварительном 10-дневном опыте. Из раствора, вызывающего гибель половины особей (ЛК₅₀) за 10 суток, для проведения хронического опыта готовили не менее 3-6 разведений, различающихся между собой на порядок.

Опыты продолжительностью не менее 30 суток наиболее удобно проводить в летний период. Смену всех растворов и воды в контроле проводили через 5 суток.

Состояние выборок учитывали каждые 5 суток.

Оценку токсичности веществ для элодеи осуществляли по следующим параметрам:

- а) состояние растений (изменение окраски, потеря тургора, повреждение точек роста и др.);
- б) выживаемость и прирост основного побега;
- в) число боковых отростков и их длина;
- г) число корней и длина.

Прирост основного побега элодеи фиксировали, вычитая исходные 4 см. Суммарный прирост растения составляет сумму прироста основного побега и длины боковых отростков. Прирост выражают в сантиметрах, число боковых отростков и корней - в штуках (экз.).

У элодеи в лабораторных условиях боковые отростки и корни появляются, как правило, на 10-20 сутки. Отмечали время их появления. Прирост, число и длину боковых отростков и корней рассчитывают на одно растение.

Ряска малая

Ряска малая (*Lemna minor* L.) - представитель группы растений с плавающими листьями. Тенелюбива, устойчива к низким температурам. Ее распространение ограничено участками водных объектов с рН от 6,2 до 7,5.

Для культивирования растения отбирали из естественной популяции пресноводного озера в начале мая 2023 г, когда много молодых, наиболее жизнеспособных растений. При отборе ряски выбирают растения с зелеными лопастями и с корнями, не имеющими видимых повреждений.

Отобранные растения перевозили в лабораторию в сосудах с водой, взятой из того же водного объекта.

В лаборатории ряску размещали в широкогорлых стаканах 1 дм³ с отстоянной водопроводной водой. В течение 7-10 дней растения проходили акклиматизацию при комнатной температуре и при достаточной освещенности, со сменой воды каждые 3 суток для удаления продуктов метаболизма.

Для работы с растениями необходимо следующее оснащение:

люминодатная установка;

круглые аквариумы на 10-15 дм³;

кристаллизаторы объемом 1 дм³;

стаканы объемом 0,5 дм³;

люксметр;

термометр;

линейка;

глазной пинцет, лезвие;

воронка, набор пипеток, стеклянная палочка;

планктонный газ N 68, фильтровальная бумага.

Для проведения экспериментов и культивирования растений использовали отстоянную водопроводную воду. Природную воду процеживают через воронку диаметром 150 мм с планктонной сеткой (газ N 68) для удаления взвеси и мелких организмов, заливают в аквариум с постоянной аэрацией воды.

Для исследований воду использовали через 5 дней.

Ряску в количестве 5 растений, имеющих одну сформировавшуюся и одну развивающуюся лопасть и корень с неповрежденным корневым

чехликом, и примерно одинаковой длины, помещали в стаканы объемом 0,5 дм³ и устанавливали в люминостае при температуре 22-25°C. Для измерения температуры раствора рядом ставили стакан с водой и термометром.

До постановки хронического эксперимента следует провести предварительный 10-дневный опыт для установления диапазона действующих концентраций вещества. Для каждой концентрации и контрольной выборки отводят по 3 стакана.

Для проведения хронического опыта из концентрации, вызывающей за 10 суток гибель 50% особей, готовят не менее 3-6 разведений, отличающихся на порядок.

Продолжительность хронических опытов была 30 суток. Растения по 5 экземпляров рассаживали в стаканы (объем 0,5 дм³), которые размещают в люминостае или на рассеянном свете при температуре 22-25°C.

Состояние растений учитывают каждые 5 суток по выживаемости и изменению ряда биологических показателей.

Отмечают общее состояние растений: изменение окраски, размер лопастей, состояние корней), число растений, лопастей и корней в штуках. Общее число лопастей составляет суммарный прирост ряски.

Измерения длины проводят с помощью линейки.

Все результаты измерений пересчитывают на одно растение.

Учитывают сроки образования новых лопастей и корней, а также новых растений, которые приходятся примерно на 10-20-е сутки.

2.5. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для простейших

В токсикологических исследованиях в качестве тест-объектов использовали парамеций (*Paramecium caudatum* Ehrenberg) - свободноживущая широко распространенная ресничная инфузория, предпочитающая альфа-мезосапробные условия. Температурный оптимум лежит в пределах 24-28°C, предпочитает рН, близкую к нейтральной (6,5-7,5).

Основными регистрируемыми показателями являются выживаемость и скорость размножения.

Использовали парameций из чистых культур.

Монокультуру простейших культивируют при комнатной температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ на среде Лозина-Лозинского в чашках Петри при естественном освещении, предохраняя от воздействия прямых солнечных лучей или в люминостате.

Используется лабораторное оборудование, приборы, посуда и реактивы, в том числе:

реактивы для приготовления среды Лозина-Лозинского;

вода дистиллированная;

бумага фильтровальная;

колбы на 1000 см³ ;

градуированные мерные пипетки на 10, 5, 1, 0,1 см³ ;

пипетки для пересадки простейших (Пастеровские пипетки с укороченным концом);

мерные колбы на 100 см³ ;

мерные пробирки на 10 см³ ;

чашки Петри;

микроаквариумы (блок камер из оргстекла);

бинокляр МБС-9 или МБС-10;

pH-метр;

двухромовокислый калий $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ марки "хч" или стандарт-титр калия двуххромоокислого;

культура простейших (*Paramecium caudatum* Ehrenberg 1838) сухие пекарские дрожжи;

Состав минеральной среды Лозина-Лозинского для культивирования *P. caudatum*:

в 1 дм³ дистиллированной воды растворяют:

NaCl - 0,1 г;

KCl - 0,01 г;

CaCl₂ - 0,01 г;

MgCl₂ - 0,01 г;

NaHCO₃ - 0,02 г.

В качестве корма использовали лиофилизированные пекарские дрожжи.

Не реже 1 раза в месяц проводили оценку физиологической чувствительности организмов. Для этого используют эталонное (стандартное) вещество - двуххромовокислый калий K₂Cr₂O₇ марки "хч" или стандарт-титр калия двуххромоокислого.

Перед постановкой опытов культуру простейших выводили в экспоненциальную фазу развития, что достигали пересевом культуры за трое суток до постановки опытов в чашку Петри с добавлением корма.

Эксперименты можно проводить как в чашках Петри объемом 25 см³, так и в камерах с рабочим объемом 4 см³. Плотность посадки в чашках Петри (с рабочим объемом 10 мл) 10 организмов. Повторность - двух или трехкратная.

В качестве показателей токсического действия целесообразно использовать выживаемость и темп деления простейших.

В первом случае в камерах из органического стекла (объем 4 см³) определяли концентрацию вещества, вызывающие гибель (LC(16), LC(50), LC(100)) или любое повреждающее действие (EC(16), EC(50), EC(100)) подопытных организмов за определенный срок. Длительность опыта определяется токсичностью среды и составляет обычно от нескольких часов до 5 суток. Контролем служила культуральная среда. Наблюдения проводят под биноклем каждые сутки.

Эксперименты на простейших проводят в два этапа (предварительный и окончательный).

В качестве показателя действия токсикантов на тест-объект используют показатель выживаемости инфузорий за определенный срок наблюдения или

нарушение темпа деления клеток инфузорий, которое выражается в изменении прироста численности клеток в проценте от контроля. Прирост численности организмов оценивают по формуле: $N = N_t - N_0$, где N_t - численность организмов в конце опыта (или последующие сутки подсчета), а N_0 - численность организмов в начале опыта (или предыдущие сутки подсчета). Результаты обрабатывали методами статистики.

2.6. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для зоопланктонных ракообразных

Ракообразные включены в схему по определению ПДК вещества в качестве типичного представителя звена зоопланктона и важнейшего кормового объекта.

Метод с использованием ветвистоусых ракообразных *Daphniamagna* в качестве тест-объектов является одним из наиболее широко применяемых в практике водной токсикологии у нас в стране и за рубежом.

Для работы с ракообразными необходимы оборудование и материалы:
микроскоп биологический, обеспечивающий увеличение в 100-200 раз;
бинокляр МБС;
рН-метр;
оксиметр;
микрокомпрессоры;
аквариумы для хранения чистой воды (от 50 до 200 л);
камера Горяева;
стаканы химические (на 0,05; 0,1; 0,3 л; 0,5 л);
пробирки;
колбы мерные (на 0,1-2 л);
цилиндры мерные (на 0,5-2 л);
колбы конические (на 0,2-0,5 л);
кристаллизаторы (на 0,5-1,0 л);
пипетки мерные (на 0,1-10 мл);
кюветы для выращивания водорослей;

шелковые мельничные сита, аквариумные сачки, реактивы, входящие в состав сред для выращивания водорослей.

Предлагаемая методика с использованием дафний вошла в состав ряда методических указаний и рекомендаций по установлению токсичности сточных и природных вод (РД 118-02-90, утвержден Госкомприроды СССР от 6 августа 1990 года N 37 "Методическое руководство по биотестированию воды"; утверждено Минприродой России от 27 апреля 2001 года "Руководство по определению методов биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов". М.: РЭФИА, НИИ-Природа, 2002).

Рачки вида *Daphnia magna* Straus (класс *Crustacea*, отряд *Cladocera*) обитают в стоячих и слабопроточных водных объектах, особенно часто - во временных лужах, и распространены повсеместно на территории России.

Этот вид является типичным бета мезоапробом, перенося осолонение до 6‰. Оптимальное содержание кислорода для дафнии составляет 7-8 мг/л, однако рачок способен переносить снижение концентрации O_2 до 2 мг/л.

Оптимальные значения активной реакции среды рН составляют 7,0-8,0, однако временные изменения рН в пределах 5,8-9,0 не подавляют существенно жизнедеятельность дафнии.

Для культивирования дафний используют отстоянную водопроводную воду. Основные гидрохимические показатели воды, используемой для культивирования дафний, должны находиться в следующих пределах:

- а) содержание кислорода 7-8 мг O_2 /л;
- б) рН - 7,0-8,2;
- в) окисляемость по Кубелю 4,2-5,8 мг O /л;
- г) общая жесткость 3,0-6,5 мг экв/л (20 ± 5 мг $CaCO_3$);
- д) соотношение Ca/Mg 4:1;
- е) NH_4^+ , NO_3^- отсутствие, следы.

Требования к тест-объекту. Для токсикологических исследований использовали дафний, начиная с третьего поколения, полученного в

лаборатории. Перед проведением эксперимента оценивали устойчивость рачков к бихромату калия. По величинам ЛК₅₀ за 24 ч определяли соответствие культуры стандарту. Эта концентрация для дафний в возрасте 18 ± 6 ч составляет от 0,9-2,0 мг/л.

Острые опыты по оценке токсичности состояли из двух экспериментов - предварительного и основного.

Длительность предварительного опыта 24-48 ч, он позволяет установить порядок остролетальных концентраций веществ.

Основной острый опыт проводится на основании результатов предварительного варианта с набором около 5 концентраций. Выбирают такой диапазон концентраций вещества, которые вызывают иммобилизацию или гибель 10-90% рачков. Продолжительность основного острого опыта 48 ч.

Опыты проведены на лабораторной культуре дафний (*Daphnia magna* Straus). Содержание культуры соответствует условиям, прописанным в методических указаниях по установлению нормативов ПДК и ОБУВ [1]. Для проверки чувствительности культуры дафний использовали бихромат калия. Двухсуточные дафнии помещались по 10 штук в стаканы объемом 200 мл с раствором бихромата калия при концентрации 1,0 мг/л. В трех повторностях получены данные близкие к LC₅₀ (средняя выживаемость дафний составила: 47%). Полученные данные подтверждают, что лабораторная культура дафний обладает высокой чувствительностью.

Для эксперимента отбирались исходные дафнии в возрасте 2 суток. Опыты проведены с трехкратной повторностью на исходных особях и последующих 3 поколениях. В стаканы емкостью 200 мл с различными концентрациями биопрепарата «AQUA-EM-1» помещалось по 10 особей. Продолжительность острых опытов составила – 24 часа для определения стабильности водных растворов биопрепарата «AQUA-EM-1», 48 часов для определения LC₅₀. Продолжительность хронических опытов 30 дней.

Для нахождения острой летальной концентрации LC₅₀ при 24 и 48 часовой экспозиции дафний в растворах биопрепарата для каждого из

вариантов были взяты одинаковые концентрации биопрепарата «AQUA-EM-1»: 100; 50; 10; 5 и 1 мл/л. Для определения устойчивости вещества в водных растворах, дафний помещали в медиальную летальную концентрацию биопрепарата «AQUA-EM-1» сразу после приготовления раствора, через 2-е, 4 суток и далее через каждые пять дней в течение месяца.

Окончательно спектр исследованных концентраций для других тест-объектов в хронических опытах мы взяли, что и ранее 10; 5,0; 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л.

Для выявления возможного отдаленного токсического эффекта биопрепарата «AQUA-EM-1» исследования проведены на исходном поколении и последующих трех поколениях. Основными показателями служили: выживаемость, половое созревание, плодовитость и количество сброшенных карапаксов, которое указывает на белковый обмен у дафний в норме и при действии различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1».

2.7. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для бентосных организмов

Брюхоногие моллюски играют важную роль в круговороте органического вещества в водных экосистемах. Прудовик болотный (обыкновенный, большой) *Limnea stagnalis* является представителем эпибентоса. Широко распространен в прибрежной зоне стоячих или медленно текущих водных объектов.

Прудовиков отлавливали в мае на мелководьях эвтрофных водных объектов в зарослях высшей водной растительности.

Для содержания моллюсков и для проведения исследований необходимо следующее оборудование:

- микроскоп биологический, обеспечивающий увеличение в 100-200 раз;
- бинокулярная лупа;
- весы аналитические с разновесами;
- весы технические;
- термостат на 150°C;

муфельная печь на 450°C;
кристаллизаторы на 2 л;
стаканы химические на 100 - 500 мл;
колбы мерные на 0,2 - 1 л;
цилиндры мерные на 50 - 1000 мл;
пипетки химические на 1 - 10 мл;
чашки Петри;
респирометры (банки по 0,5 л со стеклянными крышками);
склянки с притертыми пробками на 0,5 - 1 л для растворов;
сифоны с зажимами Мора;
пикнометры;
тигли;
ножницы, пинцеты, часовые стекла;
реактивы для определения кислорода методом Винклера.

Для исследований отбирают половозрелых моллюсков, активно передвигающихся и потребляющих корм. После отбора проводят адаптацию к условиям лабораторного содержания в течение двух недель.

Для каждого опыта выбирают особей одного размера, веса и цвета раковины.

Острый опыт предназначен для определения диапазона концентраций хронического опыта. Продолжительность исследования - 3-5 суток. Моллюсков в опыте не кормят. В каждый кристаллизатор на 1,5-2,5 дм³ раствора помещают 3-5 моллюсков.

Учитывают влияние исследуемого вещества на выживаемость и поведение моллюсков.

Хронический опыт продолжается 45-60 суток. Исходной концентрацией для длительных исследований служит наибольшая безвредная концентрация, определенная в остром опыте. Число повторностей и плотность посадки такие же, как и в остром опыте. В течение опыта моллюсков подкармливают.

Состояние выборок учитывают ежедневно.

Для оценки влияния вещества на процессы размножения в аквариумы помещали по 2-3 взрослых прудовика. Ежедневно учитывали появление кладок, начало выклева и время появления молоди, которая содержится в аквариуме. Через 3-4 месяца всю молодь изымают из аквариумов и промеряют под микроскопом с помощью окуляр - микрометра по высоте и ширине раковины. Мелкие особи держатся у уреза воды, быстро обсыхают и могут быть утеряны при подсчете численности. Необходимо регистрировать и погибших моллюсков, учитывая пустые раковины.

В первые 8 ч ежечасно, а в последующие 3-е суток 2-3 раза в день, учитывают состояние моллюсков в опытных и контрольных сосудах. Регистрируют количество живых особей и их поведение (степень и характер передвижения, выдвижение ноги и ее реакцию на раздражение), интенсивность потребления корма, выделение слизи, определяемое по помутнению опытного раствора. В дальнейшем учет проводят один раз в сутки.

Особь, которые не реагируют на механическое раздражение и тело которых легко высвобождается из раковины, считаются погибшими.

Размножение и плодовитость оценивали по времени появления первых кладок, их числу и количеству яиц в каждой кладке. Потенциальную плодовитость определяли по числу яиц в кладках, полученных от каждого моллюска за период опыта, а реальную - по количеству выклюнувшейся молоди в абсолютных величинах и процентах к исходному числу яиц в кладках.

Высоту и ширину раковины измеряли штангенциркулем. За ее высоту принимали расстояние от вершины раковины до наиболее выступающего края устья, а за ширину - диаметр раковины в наиболее широкой части.

Для определения общей массы прудовика обыкновенного его обсушивали фильтровальной бумагой и, не надавливая на ногу (для сохранения в раковине полостной жидкости), переносят на технические весы и взвешивают.

При определении массы тела и раковины ножницами разрезают раковину по швам витков, освобождают тело, обсушивают на фильтровальной бумаге и взвешивают на аналитических весах (с точностью до 0,001 грамма). Тела особей каждой размерной группы фиксируют в бюксах в 96% этаноле. Осколки раковины взвешивают. Вычитая из общей массы массу тела и раковины, определяют количество полостной жидкости.

Для определения сухого остатка тела вес зафиксированных в спирте моллюсков довели до постоянной величины при температуре 103-105°C. Количество сухого остатка рассчитывают на единицу сырой массы. По разности сырой и сухой массы определяют количество воды в теле прудовика и судят о степени обводненности или обезвоживания тела под воздействием химического вещества.

Сухой остаток тела прудовика (весь или его часть) переносят в тигли и сжигают в муфельной печи при температуре 450°C. Рассчитывают количество золы на единицу массы сухого остатка тела. По количеству золы судят об изменении минерального обмена.

Количество органического вещества рассчитывают по разности массы сухого остатка и золы. Эта величина, при сравнении с контрольными величинами, указывает на степень энергетических затрат организма при токсическом воздействии.

Для определения суточного рациона моллюсков находят разность между начальным количеством корма и его остатком. Задаваемую порцию корма взвешивают, а остаток изымают, обсушивают и вновь взвешивают. Для каждой размерной группы вычисляют кормовой коэффициент по формуле:

$$K = P/\Delta P,$$

где P - масса съеденного корма (г),

ΔP - прирост массы моллюска (г).

Изучение энергетического обмена у прудовиков заключается в определении интенсивности потребления кислорода с применением метода Винклера.

Количество кислорода, потребленное прудовиками (в мг кислорода на 1 дм³ за 1 ч), определяют по формуле:

$$M \text{ мг/дм}^3 \cdot \text{ч} = (m_0 \cdot m) \cdot (V_1 - V_2) / P \cdot t,$$

где m_0 - содержание кислорода, растворенного в воде респирометра без прудовиков, мгО₂ на 1 см³;

m - содержание кислорода в воде респирометра с прудовиками;

V_1 - объем респирометра в см³ ;

V_2 - общий объем тел моллюсков в мл;

P - общая масса тел прудовиков в мг;

t - продолжительность экспозиции в часах.

По окончании экспериментов с прудовиком и обобщении полученных данных допустимыми следует считать такие концентрации вещества, которые:

а) не вызывают статистически достоверного отклонения выживаемости взрослых моллюсков и молоди от выживаемости в контроле в срок до 60 суток;

б) не вызывают достоверного угнетения размножения моллюсков за срок наблюдения;

в) не снижают интенсивность потребления кислорода более чем на 15% по сравнению с контролем (то, что отмечено выше красным шрифтом);

г) изменяют водно-солевой обмен по сравнению с контролем не более чем на 10%.

Хирономиды

Из пресноводных бентосных организмов инфавны (зарывающихся в грунт) для проведения токсикологических опытов используются хирономиды. Хирономус дорзалис (*Chironomus dorsalis* Meig.) относится к широко распространенному семейству хирономид, личинки темно-красного цвета обитают в иле стоячих водных объектов, где строят в грунте трубчатые домики. Окукливание наступает чаще всего на 12-13-е сутки. Перед окукливанием личинки перестают питаться, теряют активность. Стадия куколки длится 2-3 суток. В конце этой стадии куколки из олигофотных становятся полифотными, покидают грунт и всплывают к поверхности воды,

где происходит вылупление комаров из кукольной шкурки через ее разрыв на дорсальной стороне груди. Общая продолжительность жизни комаров 3-5 суток. В течение этого времени ни самцы, ни самки не питаются. После выклева из яиц личинки покидают кладку и плавают в воде, через несколько дней они оседают на грунт, переходя к донному образу жизни. Их дальнейшие рост и развитие определяются в основном условиями питания, дыхания, качеством грунта, температурным режимом, плотностью популяции и некоторыми другими факторами.

Хирономиды легко поддаются культивированию в искусственных условиях, и их личинки служат важным кормовым объектом.

Эксперименты на хирономидах можно проводить в чашках Петри.

Острые опыты проводят без добавления грунта в течение 10-15 суток. Длительность хронических опытов от III стадии личинки (длиной 3-4 мм) до вылета имаго составляла около 32 дня.

Вначале отбирают одну из кладок хирономид (в ней до 200 яиц) в кристаллизатор с водой. После вылупления личинок их подращивают на иле до определенного размера (3-4 мм) и затем сифоном со стеклянной трубкой осторожно отбирают по 10 экземпляров на опытную чашку. В течение двух суток они обживали опытные площади (чашки), строили домики из дрожжей, вносимых заранее.

При проведении токсикологических опытов регистрировали следующие показатели:

основные:

- а) выживаемость личинок;
- б) сроки их окукливания;
- в) сроки и процент вылетевших комаров;
- г) процент уродливых особей;

дополнительные:

- а) окраска личинок;
- б) их поведенческие реакции;

- в) вес;
- г) активность имаго.

Вес личинок регистрировали на 7-е и 10-е сутки опыта.

Наблюдения за организмами вели ежедневно. Дрожжевые домики вскоре становятся непроницаемыми, и наблюдения ведутся в основном за пораженными особями, которые обычно остаются в домиках. Особое внимание обращают на форму домиков, поведение организмов, окраску тела, стадию, готовность к линьке и окукливанию, наполнение кишечника. Погибших особей измеряют и рассматривают под биноклем.

Размеры живых зрелых куколок и имаго в опыте и контроле можно оценивать визуально. Здоровые особи, как правило, не покидают домиков даже на небольшой срок. Сравнивают линейные размеры погибших особей с их первоначальной длиной и имеющимися в литературе нормативами роста для хирономид.

Для оценки острого летального действия можно использовать два способа использовали определение концентраций, вызывающих гибель за определенный срок 50% особей, взятых в опыт.

В течение длительных опытов учитывают и основные, и дополнительные показатели, указанные выше. Выживаемость всех стадий выражают в процентах с поправкой по Абботу. Личинок взвешивают на торсионных весах на 7-е и 10-е сутки опыта. Удельный прирост биомассы определяют по формуле:

$$P = \left[\left(\frac{P_{\text{кон}}}{P_{\text{нач}}} - 1 \right) \right] \cdot 100,$$

где: $P_{\text{кон}}$ и $P_{\text{нач}}$ - вес в начале и в конце опыта соответственно.

Личинок после взвешивания в опыте не использовали из-за травмирования, а эксперименты продолжаются с особями двух других линий той же популяции.

Фиксировали сроки вылета насекомых (в сутках) и проводят статистическую обработку данных.

2.8. Установление максимальной допустимой концентрации вещества для рыб

Действие биопрепарата «AQUA-EM-1» в различных разбавлениях с водой на отдельные стадии онтогенеза рыб мы изучали на данио (*Brachydanio rerio*). В опыт были взяты икра, предличинки, мальки, а также и взрослые рыбы.

Считается, что рыбы на эмбриональных стадиях развития, а так же предличинки и личинки очень чувствительны к действию различных веществ, в том числе имеющих биогенное происхождение [6,7]. В данной работе исследование проводилось на икре, личиночных стадиях и на мальках даниорерио. Проверялось действие биопрепарата «AQUA-EM-1» на такие важные показатели как: эмбриогенез, темпы развития, выклев предличинок и их выживаемость при наличии в воде различных концентраций исследуемого биопрепарата.

Икру получали от 2 гнезд производителей и через каждые 24 часа после нереста помещали в чашки Петри по 10 икринок. Температура воды в аквариумах для производителей поддерживалась около 28⁰С. Длительность опытов по наблюдению за эмбриональным развитием икры составила 48 часов. Опыты проведены в двукратной повторности. В чашки Петри помещались растворы биопрепарата «AQUA-EM-1» с концентрациями 10; 5.0; 1.0; 0,5 и 0,1 мг/л. Концентрации взяты исходя из предварительных опытов на дафниях. Во время опыта температуру инкубированной икры снижали до 26⁰С. В опытах на мальках и взрослых рыбах исследовалась еще одна концентрация препарата, взятая в сторону завышения, 50 мг/л. Смену растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» при выращивании личинок и мальков, а также при экспонировании взрослых рыб не производили, с тем учетом, что во время опыта биопрепарат «AQUA-EM-1» ведет себя не как химическое вещество, а численность микроорганизмов при этом изменяется со временем. Для изучения эмбриогенеза данио, который длится всего 48 часов, брали растворы с указанными ранее концентрациями. Основные показатели –

эмбриогенез, время прохождения отдельных стадий развития, выклев предличинок.

Мальки данио и взрослые рыбы выдерживались в растворах биопрепарата «AQWAEM-1» в аквариуме в течение 30 дней. Взрослые рыбы по 5 штук выдерживались в 10-литровых аквариумах, заполненных наполовину водой.

Для органолептических, гистологических и гематологических исследований использовались годовики радужной форели длиной до 9 см. Продолжительность опыта с годовиками радужной форели в исследуемых растворах составила 30 дней. На этих же рыбах рассматривался такой биологический показатель, как выживаемость взрослых рыб в хроническом опыте. Испытание проводили при тех же концентрациях и дополнительно брали завышенную концентрацию 50 мл/л.

2.9. Гистологические исследования ткани рыб и гематологический анализ при воздействии биопрепарата «AQUA-EM-1»

После 30-дневной экспозиции в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1»: в указанных ранее концентрациях, годовики радужной форели подвергались гистологическому исследованию с целью воздействия метаболитов микроорганизмов на ткани рыб и их органы в исследуемых растворах биопрепарата.

Исследовались гепатопанкреас, почки, адреналовые железы, жабры и кишечник. Фиксирование исследованных тканей проводили в жидкости Буэна. После фиксации кусочки ткани проводили через гистологическую проводку, заливали в парафин и резали на микротоме (толщина срезов 5-7 микрон). Срезы окрашивали гематоксилином. Окрашенные срезы заключали в канадский бальзам.

Для гематологического анализа кровь у рыб отбиралась путем ампутации хвоста. Мазки периферической крови фиксировались и окрашивались по Паппенгейму. Количество эритроцитов определялось на

отобранной крови в камере Горяева, а количество лейкоцитов определялось косвенным путем по соотношению лейкоцитов и эритроцитов на препарате.

2.10. Оценка генотоксичности биопрепарата «AQUA-EM-1»

Для выявления возможной генотоксичности биопрепарата «AQUA-EM-1» были применены генетические и цитогенетические исследования согласно утвержденной методике (10).

Помимо этого проведены исследования политенных хромосом личинок хирономид, которые позволяют выявить не только генотоксичность продуктов обмена организмов биопрепарата, но и его возможное влияние на дифференциальную активность генов.

Для проверки возможной мутагенности растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на генном уровне использовали тест Эймса (без микросомальной стимуляции и с микросомальной стимуляцией). Испытания проводились на стандартных штаммах сальмонеллы TA-98 и TA-100. В качестве позитивного контроля использовали мутагены согласно прописи проведения теста Эймса [8].

Выявление возможной мутагенности на хромосомном уровне проводили на эпителии хрусталика годовиков радужной форели и на политенных хромосомах полученных из слюнных желез личинок хирономид. Препараты из эпителия хрусталика радужной форели готовились после их 30-дневной экспозиции в растворах биопрепарата, а изучение политенных хромосом хирономид проводилось после 10-дневного опыта. Окрашивание политенных хромосом хирономид осуществлялось ацетоорсеином по методике Макгрегора[9]. Для заливки использовали среду, содержащую краситель и уксусную кислоту, разведенную в 3 раза. Для предохранения препарата от пересыхания, края покровного стекла покрывались нитролаком.

Для выявления возможного действия исследуемых растворов на дифференциальную активность генов следили за процессом пуффинга в

слюнных железах хирономид. Большое значение при этом имеют пуфы метаморфоза 1G1h-k, 2A3e, 2D2de, 3D1h на аутосомах тельца Бальбиани на 4 хромосоме. При слежения за пуфингом использовали хромосомные карты и схемы прохождения морфологических изменений в грудных сегментах личинок в период метаморфоза [10].

2.11. Органолептические свойства бульона и мяса рыб

Органолептические свойства бульона и мяса рыб исследовались на годовиках радужной форели после их экспозиции в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1» 50; 10; 5.0; 1.0; 0,5 и 0,1мл/л. Для этой цели использовались те же рыбы, у которых брались органы для гистологического и кровь для гематологического анализа. Вода в аквариумах аэрировалась, а кормление рыб осуществляли личинками хирономид.

После завершения опыта, рыб отваривали без добавления соли, и проводили органолептические исследования мяса и бульона рыб по общепринятой методике [1].

2.12. Статистические методы анализа результатов исследования

После завершения экспериментов проводился анализ воздействия биопрепарата «AQUA-EM-1» в различных разведениях на отдельные звенья представительных гидробионтов в системе «от бактерий до рыб», моделирующей трофическую структуру биоценоза рыбохозяйственного водоема. Действующими концентрациями признавались те, которые согласно «Методическим указаниям ...[1] достоверно отличались от контроля по критерию Стьюдента.

Благодаря проведенному анализу выявляли наиболее чувствительное звено и лимитирующий показатель вредности (ЛПВ). По наиболее чувствительному звену устанавливали предельно допустимую концентрацию биопрепарата в воде рыбохозяйственного водоема, а после установления ПДК

определяли класс опасности AQUA-EM-1 и предложили метод контроля биопрепарата «AQUA-EM-1» в воде рыбохозяйственных водоемов.

3. Результаты исследований

3.1. Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на органолептические и гидрохимические показатели воды

3.1.1. Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на органолептические показатели воды

Органолептические свойства биопрепарата исследовали в концентрациях 50; 10; 5.0; 1.0; 0,5 и 0,1 мл/л. Растворы готовили на отстойной водопроводной воде. В органолептических исследованиях участвовало 4 наблюдателя. В качестве основных показателей выступали цвет и запах раствора. Данные об органолептических исследованиях биопрепарата «AQUA-EM-1» представлены на таблице 4.

Таблица 4.

Органолептические свойства биопрепарата «AQUA-EM-1» при различных концентрациях в воде

Конц мл/л	Запах				Цвет			
	1	2	3	4	1	2	3	4
50	Запах кваса	Запах кваса	Запах кваса	Запах кислый	Жел- тый	Желто ватый	Жел- тый	Жел- тый
10	Слаб кваса	Слаб. кваса	Сл. кваса	Сл. дрожж	Желто- ватый	Сл. Желт.	Желто ватый	Нет
5,0	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
1,0	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
0,5	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
0,1	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет

Таким образом, за максимально допустимую концентрацию по органолептическому показателю следует принять 5 мл/л, когда все наблюдатели не отметили привкуса биопрепарата «AQUA-EM-1». Пороговая концентрация 10 мл/л, при которой наблюдается три наблюдателя желтоватый цвет раствора и слабый запах кваса и дрожжей. При концентрации 100 мл/л

отмечаются хорошо выраженный запах и цвет растворов биопрепарата «AQUA-EM-1».

3.1.2. Органолептические свойства бульона и мяса рыб после экспозиции годовиков радужной форели в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1»

Органолептические свойства бульона и мяса рыб определяли на годовиках радужной форели *Parasalmo mykiss*. Рыб выдерживали в водных растворах биопрепарата «AQUA-EM-1» с концентрациями: 10; 5.0; 1.0; 0,5 и 0,1 мл/л в аквариумах по 10 штук в течение одного месяца. Объем воды в аквариумах 20 л с принудительной аэрацией. В опыт были отобраны рыбы размером 8-9 см. После экспозиции в растворах исследуемого материала в течение 1 месяца из рыб готовили бульон без добавления соли.

Органолептические исследования показали, что бульон, приготовленный из рыб, после месячной экспозиции в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1» с концентрациями от 10 до 0,1 мл/л бульон из рыб не содержал постороннего привкуса и запаха. За допустимую концентрацию для биопрепарата «AQUA-EM-1» по органолептическим свойствам бульона и мяса рыб предлагается принять 10 мл/л.

3.1.3. Влияние препарата «AQUA-EM-1» на pH и содержание растворенного кислорода

3.1.8. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на динамику прироста гетеротрофных бактерий

Динамику изменения численности гетеротрофных бактерий изучали в прудовой воде. В колбы объемом 200 мл вносили пять концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1»: 10; 5,0; 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л. Спектр концентраций обоснован тем, что разведение препарата 10 и 50 раз, при которых получают концентрации 100 и 50 мл/л, практически для водоема использоваться не может, так как это не соответствует прописи применения препарата. Для практических целей чаще всего используются концентрации 5,0 и 1,0 мл/л. Общее количество сапрофитных бактерий определялось согласно описанной ранее методике при посеве на МПА [1], а в качестве селективной среды для подсчета живых клеток молочнокислых бактерий и дрожжей использовалась среда «сусло-агар». Различная морфология колоний лактобактерий и дрожжей позволяет подсчитать их количество после инкубирования в одной чашке Петри. Продолжительность опыта составляла 7 суток.

Данные о влиянии биопрепарата «AQUA-EM-1» на прирост гетеротрофных бактерий представлены на табл. 10.

Таблица 10.

Изменение количества сапрофитных микроорганизмов в 1 мл прудовой воды под действием биопрепарата «AQUA-EM-1»

Сутки Конц мл/л.	0	1	3	5	7
Конт роль	$4,1 \times 10^2$	$6,6 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
10	$6,5 \times 10^2$	$4,4 * \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
5,0	$4,7 \times 10^2$	$3,8 * \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$
1,0	$4,5 \times 10^2$	$3,4 * \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$
0,5	$4,6 \times 10^2$	$3,7 * \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
0,1	$4,5 \times 10^2$	$3,9 * \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$

*- По критерию Стьюдента статистически достоверная разница для концентрации 10 мл/л ($P \leq 0,05$; $t_{st}=2,45$; $t_d=2,83$; 2,93; 2,96; 2,65; 2,87 – для соответствующих концентраций от 10 мл/л и ниже на 1 сутки),

Достоверная разница средних показателей между контролем и опытом отмечена при всех исследованных концентрациях биопрепарата «AQUA-EM-1» на первые сутки, что указывает на активность препарата, который подавляет развитие сапрофитной микрофлоры в первые сутки. Наибольшая разница отмечена при разведении препарата в 1000 раз (1,0 мл/л). В дальнейшем эффект подавления прироста сапрофитной микрофлоры пропадает и на протяжении всего опыта не отличается от контроля. Таким образом, активность препарата по отношению к сапрофитным бактериям проявляется только на первые сутки после его внесения в воду. Учитывая, что в дальнейшем происходит стабилизация процесса, и все исследованные концентрации не оказывают воздействия на численность сапрофитных бактерий, за допустимую концентрацию можно принять концентрацию > 10 мл/л.

При установлении рыбохозяйственных ПДК на биопрепараты требуется проследить динамику численности клеток у микроорганизмов входящих в состав «AQUA-EM-1». Посев микроорганизмов на элективную среду (сусло-агар), в которой можно идентифицировать колонии молочнокислых бактерий и дрожжей и произвести отдельно их подсчет позволил проследить за динамикой изменения численности молочнокислых бактерий (*Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F 116, *Saccharomyces cerevisiae*) и дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Данные представлены в табл. 11.

Таблица 11.

Изменение числа микроорганизмов, входящих в состав «AQUA-EM-1», в 1мл воды при различных разведениях биопрепарата

Сутки Конц	0	1	3	5	7
---------------	---	---	---	---	---

мл/л.	<i>Lactobacillus plantarum</i>				
10	9,1x10 ⁵	4,8x10 ³	1,2x10	0,7x10	05x10
5,0	4,7x10 ⁵	1,3x10 ³	1,1x10	0,6x10	0,4x10
1,0	9.3x10 ⁴	8.5x10 ²	0,9x10	0,4x10	03x10
0,5	5.1x10 ⁴	1,1x10 ²	0,5x10	0,2x10	0
0,1	8,9x10 ³	1,2x10	0,2x10	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> F 116					
10	8,7x10 ⁵	5,2x10 ³	1,1x10	0,9x10	0,6x10
5,0	5,1x10 ⁵	1,5x10 ³	0,7x10	0,7x10	0,5x10
1,0	5,2x10 ⁴	7,8x10 ²	0,6x10	0,3x10	0,4x10
0,5	3,6x10 ⁴	9,1x10	0,5x10	0	0,12x10
0,1	2,8x10 ³	1,1x10	0,3x10	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
10	1,2x10 ²	1,2x10 ²	1,2x10	0,8x10	0,5x10
5,0	6,4x10	4,8x10	1,2x10	0,6x10	0,3x10
1,0	3,8x10	2,4x10	1,1x10	0,6x10	0,2x10
0,5	1,7x10	1,3x10	0,8x10	0,4x10	0
0,1	0,3x10	0,2x10	0	0	0

Таким образом, полученные результаты позволяют проследить за динамикой изменения численности отдельных групп микроорганизмов, входящих в препарат «AQUA-EM-1». Это дает возможность утверждать, что концентрации от 10 мл/л до 1,0 мл/л наиболее оптимальны для применения препарата для очистки воды. При сильном разведении препарата в 2000 и 10000 раз к концу недели происходит полное исчезновение микроорганизмов, входящих в состав препарата. Данный опыт показывает также, что в водной среде не происходит резкого развития внесенных микроорганизмов. А наоборот, со временем их численность сокращается. Полученные результаты показывают, что применение препарата не может привести к вспышке размножения внесенных с «AQUA-EM-1» микроорганизмов и сапрофитных бактерий, находящихся в фоновой среде водоема.

В качестве дополнительного материала и построения графиков изменения численности сапрофитных бактерий и отдельных компонентов препарата «AQUA-EM-1», молочнокислых бактерий и дрожжей, был проведен ежедневный подсчет числа колоний. Учитывая однотипность действия препарата при различных концентрациях (см. табл. 11), мы рассматривали влияние только трех концентраций: 10; 1,0 и 0.1 мл/л. При построении

графика, описывающего динамику изменения численности молочнокислых бактерий во времени (рис. 2), исходная численность молочнокислых бактерий (540 кл/мл) не приводится, чтобы получить оптимальный масштаб для остальных концентраций.

Изменение динамики численности сапрофитных бактерий под влиянием различных разведений препарата «AQUA-EM-1» приведено на рис. 1.

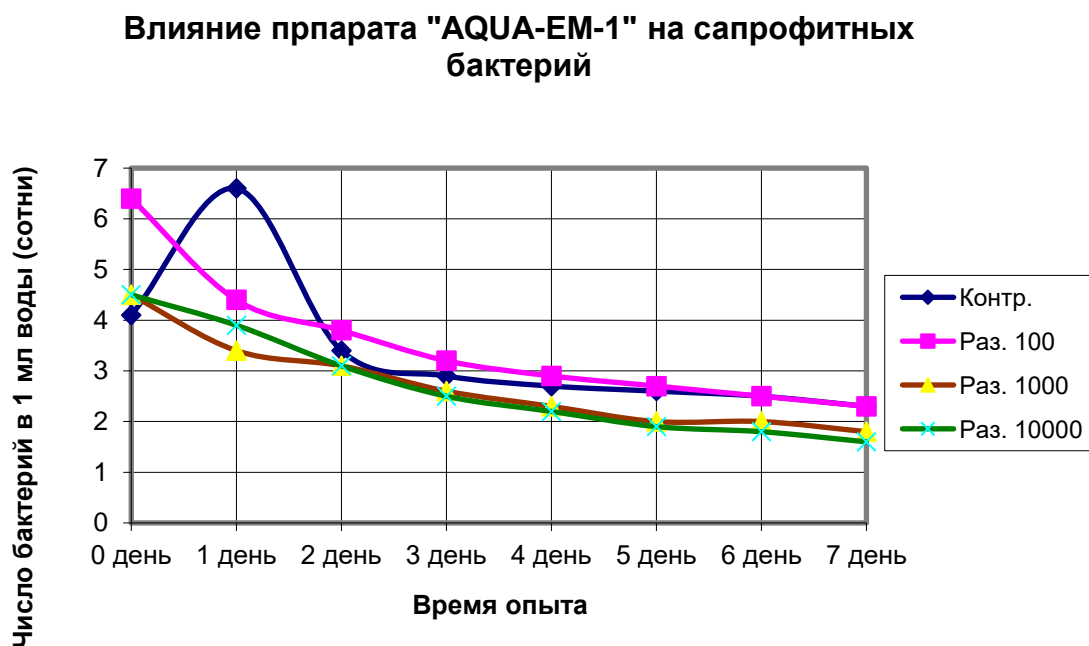


Рис. 1. Динамика изменения численности сапрофитных бактерий в водной среде под влиянием различных разведений препарата «AQUA-EM-1»

Динамика изменения численности молочнокислых бактерий, входящих в состав биопрепарата «AQUA-EM-1» приводится на рис. 2.

В виду того, что численность молочнокислых бактерий высока и при разведении может меняться на порядки, для оси ординат пришлось применить логарифмическую шкалу.

Для построения графика изменения численности дрожжей применение логарифмической шкалы не потребовалось, так как после разведения препарата в 100 раз численность клеток оказалось только во второй степени.

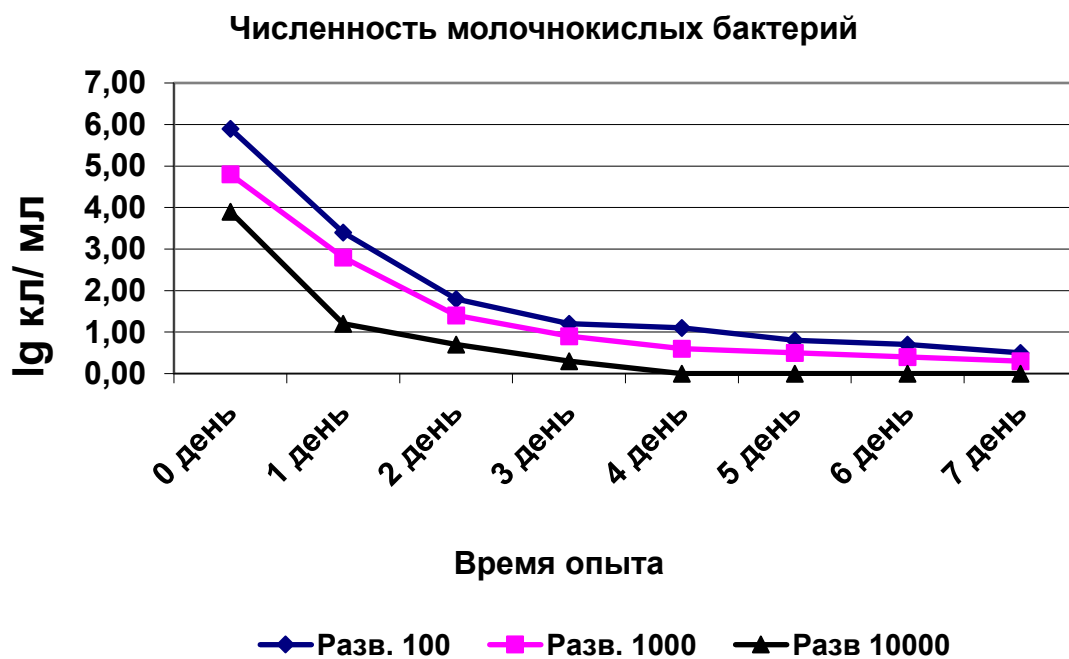


Рис. 2. Динамика численности молочных бактерий в водной среде при различных разведениях препарата «AQUA-EM-1».

Изменение во времени динамики численности клеток дрожжей при действии различных разведений препарата «AQUA-EM-1» приведено на рис. 3.

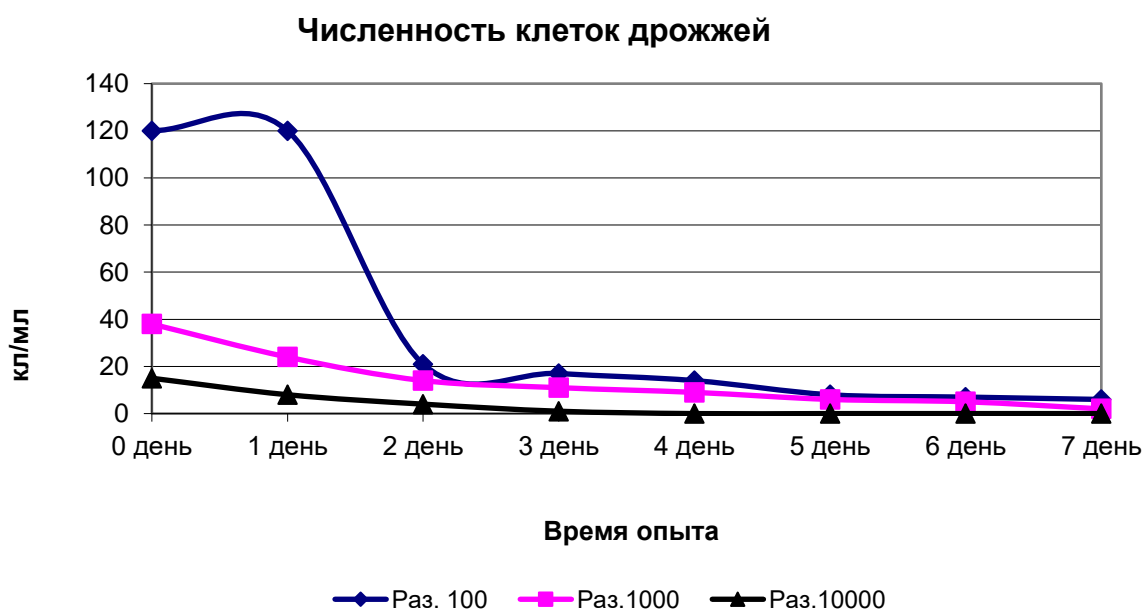


Рис 3. Динамика численности клеток дрожжей в водной среде при различных разведениях биопрепарата «AQUA-EM-1»

Анализ полученных на графиках результатов показывает, что молочнокислые бактерии резко сокращают свою численность на второй день после постановки опыта. При всех исследованных концентрациях в контроле и в опытных колбах остается примерно одинаковое количество молочнокислых бактерий, за исключением концентраций, при которых препарат разводится в 10000 раз. После 4 дня при таком разведении в исследуемых системах вообще не остается молочнокислых бактерий. Данные исследования показывают, что всех концентрациях, взятых в опыт, не происходит вспышки развития микроорганизмов, входящих в состав препарата, а, следовательно, допустимая концентрация будет >10 мг/л.

Сходная картина отмечается и с дрожжевыми клетками с той только разницей, что в отличие от молочнокислых бактерий при самом большом разведении дрожжевые клетки исчезают на день раньше. Следовательно, и для роста дрожжей, взятые в испытание концентрации препарата «AQUA-EM-1» со временем не дают массового развития в водных системах. По этому показателю концентрацию препарата более 10 мг/л также можно считать допустимой.

Исчезновение из водных систем молочнокислых бактерий и дрожжей в первые сутки соответствует их биологии [12], так как они нуждаются в определенных веществах и энергию могут получать только в процессе брожения. По всей видимости, в дальнейшем активность препарата может быть объяснена только присутствием комплекса метаболитов, которые выделили в воду в процессе жизнедеятельности входящие в препарат «AQUA-EM-1» микроорганизмы.

3.2. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на первичных продуцентов

3.2.1. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на динамику прироста клеток *Scenedesmus quadricaudata* Turp.

Опыты проводились на культуре сценедесмуса. *Scenedesmus qiiadricaudata* в экспоненциальной фазе роста, чувствительность которой проверялась с помощью бихромата калия (9).

Первоначально за 72 часа был определен токсикологический параметр EC_{50} . Мы проводили сокращенный вариант испытаний, продолжительность эксперимента составила 3 суток, а плотность клеток в культуре была примерно на порядок ниже, чем при проведении хронического опыта. Для расчета использовались результаты экспериментов. Спектр концентраций для испытаний был взят тот же, только еще испытывали две концентрации 100 и 50 мл/л. Нахождение токсикологического параметра для водорослей EC_{50} за 72 часа проводили графическим методом. Результаты острых опытов представлены в таблице 12.

Таблица 12.

Динамика численности клеток сценедесмуса в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1», в остром опыте.

Концентрации мл/л	24 часа	48 часов	72 часа
100	$12,3 \times 10^3$	$25,1 \times 10^3$	$35,5 \times 10^3$
50	$21,7 \times 10^3$	$49,8 \times 10^3$	$56,1 \times 10^3$
10	$27,8 \times 10^3$	$53,7 \times 10^3$	$56,6 \times 10^3$
5,0	$27,5 \times 10^3$	$51,0 \times 10^3$	$57,3 \times 10^3$
1,0	$26,7 \times 10^3$	$50,2 \times 10^3$	$56,7 \times 10^3$
Контроль	$28,4 \times 10^3$	$52,8 \times 10^3$	$58,3 \times 10^3$

Графическим методом установлено, что EC_{50} для сценедесмуса при 72 часовой экспозиции составляет 85 мл/л. Подавление прироста водорослей скорее всего происходит из-за слабого закисления среды, в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий, входящих в состав препарата «AQUA-EM-1».

Хронические опыты проведены в течение месяца. Плотность клеток в контроле в начале опыта составила 336 тыс. кл./мл. Контролем служила культура выращенная на среде Прата. Результаты исследований приведены ниже (Таблица 13)

Динамика численности клеток водорослей *Scenedesmus quadricaudata* Turp. при добавлении различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» (тыс.кл./мл)

Концентрации, мг/л	Сутки опыта								
	1	2	3	4	9	14	19	24	30
0,1	343,3	460,1	531,4	539,7	586,3	685,8	801,1	842,8	860,4
0,5	340,2	458,5	521,3	529,0	582,8	690,5	788,4	832,1	845,7
1,0	358,7	464,8	527,3	545,3	585,7	680,4	801,1	831,7	832,3
5,0	355,2	448,1	530,0	537,8	577,5	689,3	800,2	830,3	857,8
10	346,3	452,5	515,7	539,7	585,5	678,2	792,0	835,3	844,6
Контроль	336	458,3	525,4	535,5	588,1	684,6	791,7	840,3	852,1

Определение достоверности разницы средних по критерию Стьюдента ($P \leq 0,05$, $t_{st}=2,57$; t_d от 1, 1,67 до 2,01); Разность средних недостоверна при всех испытанных концентрациях.

Таким образом, под влиянием исследованных, концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1», наблюдается нормальный прирост клеток сценедесмуса, не отличающийся от контроля.

За допустимую концентрацию следует принять показатель > 10 мл/л, без нахождения большей величины, так как на практике наибольшая концентрация препарата не превышает этой величины, чаще же используется разведение препарата в 500 – 1000 раз, что соответствует концентрациям от 2,0 мл/л до 1 мл/л.

3.2.2. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на биологические показатели у ряски

Исследовали воздействие биопрепарата «AQUA-EM-1» на прирост фрондов и корней у ряски проведено при тех же концентрациях, что и для водорослей. Данные приведены на таблицах 14 и 15.

Таблица 14.

Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на прирост лопастей (фрондов) на растение (средний показатель при подсчете 10 рясок)

Концентр. мл/л	Сроки опыта в сутках				
	0	7	14	22	28
10	1,0	3,46	3,70	3,86	4,07
5,0	1,0	3,35	3,69	3,83	3,98
1,0	1,0	3,41	3,67	3,85	4,10
0,5	1,0	3,45	3,59	3,79	3,99
0,1	1,0	3,38	3,65	3,84	3,95
Контроль	1,0	3,40	3,62	3,81	4,01

* - достоверная разница средних ($P \leq 0,05; t_{st}=2,57; t_d$ =от 1,74 до 2,23).

Разница средних статистически недостоверна.

Анализ полученных результатов показывает, что все концентрации биопрепарата «AQUA-EM-1» не влияют на прирост фрондов ряски. При этом размеры лопастей ряски не уменьшаются и соответствуют размерам фрондов у контрольных растений.

Следовательно, за максимально допустимую концентрацию следует принять > 10 мл/л.

Таблица 15.

Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на рост корней у ряски (данные в пересчете среднего от 10 растений на 1 растение)

Концентрация мл/л	Сроки опыта в сутках				
	0	7	14	22	28

10	1,0	1,42*	1,48*	1,50*	1,43*
5,0	1,0	2,47	1,99	2,20	2,36
1,0	1,0	2,46	2,06	2,22	2,37
0,5	1,0	2,40	2,05	2,24	2,30
0,1	1,0	2,45	1,98	2,20	2,33
Контроль	1,0	2,45	2,02	2,23	2,35

* - достоверная разница средних ($P \leq 0.05$; $t_{st}=2,57$; t_d =от 1,52 до 2, 45)

Разница средних статистически недостоверна.

В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что биопрепарата «AQUA-EM-1» в исследованных концентрациях не влияет на прирост корней у ряски. Так же как и по приросту фрондов за допустимую концентрацию по этому биологическому показателю можно взять > 10 мл/л.

3.3. Действие различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» на дафний.

Опыты, как было сказано ранее, проведены на синхронизированной культуре *Daphnia magna*. В первую очередь была исследована выживаемость исходных дафний и последующих трех поколений при внесении в воду различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1», что дает возможность вскрыть возможный токсический эффект даже с отдаленными последствиями. Для исследований был взят следующий спектр концентраций: 10; 5,0, 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л. Данный спектр концентраций был взят исходя из ранее известных соотношений между концентрациями в острых и хронических опытах. Данные о выживании исходных дафний и последующих 3 поколений в течение 30 суток представлены в таблице 16.

Таблица 16.

Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на выживание дафний
в 30 суточном опыте
(в % по отношению к контролю)

Концентрация мг/л	Поколения			
	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃
10	95	96	93	100

5.0	93	93	100	96
1.0	98	89	100	100
0,5	93	100	96	100
0,1	100	100	90	100
Контроль	100	100	100	100

* - достоверная разница средних ($P \leq 0,05$; $t_d = 2,62$; $t_{st} = \text{от } 1,67 \text{ до } 2,07$)

Разница средних статистически недостоверна

Таким образом, при концентрации биопрепарата «AQUA-EM-1» от 0,1 до 10 мл/л не наблюдается достоверной разницы средних по сравнению с контролем. Следовательно, все исследованные концентрации биопрепарата не оказывают влияния на такой биологический показатель как выживаемость дафний в исходном поколении и в последующих трех поколениях. Препарат не обладает свойством отдаленного воздействия на исследованных ракообразных.

За допустимую концентрацию для препарата «AQUA-EM-1» следует принять показатель > 10 мл/л.

Помимо исследования выживаемости в хроническом опыте на дафниях исследовались такие важные показатели как плодовитость и количество сброшенных карапаксов. Первый показатель характеризует воздействие биопрепарата «AQUA-EM-1» на репродуктивную функцию дафний. Вторым показателем указывает на интенсивность белкового обмена у дафний и позволяет выявить нарушения в случае токсического воздействия биопрепарата «AQUA-EM-1».

Данные о влиянии биопрепарата «AQUA-EM-1» на плодовитость дафний в трех поколениях и на количество сброшенных карапаксов представлены в таблице 17.

Таблица 17.

Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на плодовитость (число потомков) и число сброшенных карапаксов у дафний за 30 дней (в пересчете на 1 самку)

Конц. мл/л	Плодовитость				Количество карапаксов			
	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃
10	27,7	21,7	23,3	21,5	12,3	12,6	14,7	10,2
5,0	28,8	22,3	24,6	20,6	11,8	12,1	15,1	11,5
1,0	28,5	20,6	23,1	20,3	10,3	12,6	13,7	11,6
0,5	28,2	22,4	24,0	21,6	12,6	12,3	15,7	10,3
0,1	26,4	21,6	22,6	20,4	9,6	10,9	15,3	11,6
Контр	27,3	20,9	23,8	19,4	12,3	11,6	14,1	10,9

*разность для плодовитости не достоверна; $t_{st}=2,45$; t_d =от 1,66 до 1,89

*разность для количества сброшенных карапаксов недостоверна;
 $t_{st}=2,45$; t_d от 1.85 до 2.14)

Анализ полученных результатов показывает, что отклонения от контроля биологических показателей у дафний по плодовитости не происходят при всех исследованных концентрациях биопрепарата «AQUA-EM-1». Концентрацию 10 мл/л и больше можно считать допустимой по двум исследованным биологическим показателям для дафний.

3.4. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на выживаемость и метаморфоз личинок хирономид.

В данной работе первоначально исследовалось действие следующих концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» 10; 5,0, 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л. Следили за выживаемостью и метаморфозом личинок хирономид (*Chironomus plumosus*). Метаморфоз - наиболее ответственный период в жизни хирономид, когда происходит репрограммирование генетической информации.

Проведенный эксперимент показал, что личинки хирономуса не чувствительны к высоким исследованным концентрациям биопрепарата «AQUA-EM-1». В первой серии опытов не наблюдалось гибели личинок при всех исследованных концентрациях. По этой причине была дополнительно исследована на токсичность еще одна концентрация биопрепарата «AQUA-EM-1» 5,0 мл/л. При концентрации 50 мл/л отмечается увеличение гибели

личинки по отношению к контролю более чем на 17% (см. табл. 18).
 Метаморфоз во всех концентрациях завершился полностью, и все выжившие личинки не несли морфологических отклонений.

Данные о выживаемости личинок, куколок и завершении метаморфоза хирономид представлены на табл. 18.

Таблица 18.

Выживаемость и метаморфоз личинок и куколок хирономид в речном илу в растворах с различными концентрациями биопрепарата «AQUA-EM-1»
 (в % от посадки)

Конц. мл/л	Выживаемость личинок	Выживаемость куколок	Метаморфоз
50	74,3*		полный
10	92,1	96,0	полный
5,0	89,6	97,1	полный
1,0	91,1	94,9	полный
0,5	90,7	93,7	полный
0,1	91,3	96,1	полный
Контроль	91,6	96,3	полный

* - достоверная разница средних по выживаемости личинок ($P \leq 0,05; t_{st}=2,57; t_d=2,68$); по выживаемости куколок разница не достоверна.

Проведенные исследования показывают, что концентрация биопрепарата «AQUA-EM-1» 50 мл/л приводит к повышенной гибели личинок хирономид. При концентрациях 10 мл/л и ниже показатели по выживаемости личинок и куколок хирономид близки к контролю. За максимально допустимую концентрацию по этому показателю следует принять 10 мг/л.

3.5. Действие растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на рыб

3.5.1. Влияние биопрепарата «AQUA-EM-1» на эмбриональное развитие *Brachydanio rerio*

Опыты поставлены в трехкратной повторности. Было исследовано действие следующих концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1»: 10; 5,0, 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л.

Концентрации выбраны исходя из предварительно проведенных опытов на дафниях и с учетом, что препарат при концентрации более чем 10 мл/л не применяется.

Данные о выклеве предличинок и темпе развития эмбрионов в различных концентрациях вещества представлены на таблице 19.

Таблица 19.

Эмбриональное развитие и выклев предличинок данио в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1» (в % от посадки)

Конц. мл/л	Стадии развития	Время инкубации икры (часы)				
		6	12	24	36	48
10	икра	100	96	90	57	-
	предлич	-		5	33	87
5,0	икра	100	93	75	45	-
	предлич	-		15	45	86
1.0	икра	100	99	90	49	-
	предлич	-		7	46	89
0,5	икра	100	93	87	44	-
	предлич	-		5	47	86
0,1	икра	100	96	85	50	-
	предлич	-		10	41	90
Кон троль	икра	100	93	78	51	-
	предлич	-		15	39	89

разница по эмбриогенезу не достоверна ($P \leq 0,05; t_{st}=2,57; t_d=2,06$)

разница по выклеву предличинок не достоверна ($P \leq 0,05; t_{st}=2,57; t_d$ от 1,46 до 2,34).

Анализ полученных результатов на таблице 19 показывает, что исследуемые концентрации биопрепарата «AQUA-EM-1» не оказывают вредного действия на эмбриональное развитие рыб и вылупление эмбрионов из яичевых оболочек. Имеющиеся литературные данные [6] по влиянию pH на развитие икры и вылупление предличинок, проведенные на брахиданио показывают, что только pH равном 5,5 процент выклева снижается по сравнению с контролем на 20%. В нашем случае это могло бы произойти

только при концентрации препарата 100 мл/л, которая не может использоваться практически для рыбохозяйственных водоемов. Что же касается расчета токсикологических параметров, то они для препарата «AQUA-EM-1 не имеют смысла, так как из-за его низкой токсичности только в неразведенном биопрепарате гибель от изменения pH может превысить ЛК₅₀. Это же относится и к действию препарата на других гидробионтов.

3.5.2. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на выживаемость предличинок *Brachydanio rerio*

После выклева предличинки помещались в ряд концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» по 10 штук и содержались в чашках Петри. Так как в опытах с икрой была показана низкая чувствительность к биопрепарата «AQUA-EM-1», то спектр концентраций был сдвинут на повышение и наивысшая исследуемая концентрация равнялась 50 мл/л. Продолжительность опыта составила 48 часов.

Данные о выживаемости предличинок в концентрациях биопрепарата «AQUA-EM-1» представлены в таблице 20.

Таблица 20.

Выживаемость предличинок данио в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1» (в % от посадки)

Конц. мл/л	Сроки опыта (в часах)				
	6	12	24	36	48
50,0	100	93	93	87	83
10,0	100	93	90	90	86
5,0	100	97	91	87	83
1,0	100	94	91	87	81
0,5	100	94	93	90	89
Контроль	100	96	93	90	86

не достоверна разница по выживаемости предличинок данио ($P \leq 0,05; t_{st}=2,57; t_d=2.03$ для конц.1,0).

Анализ представленных в таблице 20 результатов позволяет сделать вывод, что исследованные концентрации биопрепарата «AQUA-EM-1» от 0,5 до 50 мл/л не токсичны для предличинок рыб. За допустимую концентрацию, не вызывающую нарушения выживаемости предличинок данио, следует принять более 50 мл/л.

3.5.3. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на выживаемость мальков и взрослых рыб

Мальки данио в отличие от развития оплодотворенной икры и предличинок содержались в лабораторных условиях в течение 30 дней. Взрослые рыбы использовались для испытания токсичности биопрепарата «AQUA-EM-1» также в течение месяца. Спектр концентраций для мальков и взрослых рыб был взят в сторону завышения, с тем учетом, что рыбы малочувствительны по выживаемости к биопрепарата «AQUA-EM-1» даже на эмбриональной стадии.

Выживаемость мальков *Brachydanio rerio* в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1» представлена в таблице 21.

Таблица 21.

Выживаемость мальков *Brachydanio rerio* в растворах биопрепарата «AQUA-EM-1» (в % от посадки)

Конц. мл/л	Срок испытания (сутки)					
	1	6	12	18	24	30
50	100	100	100	96	93	93
10,0	100	100	100	93	93	93
5,0	100	100	100	100	96	96
1,0	100	100	100	100	100	100
0,5	100	100	96	96	96	93
Контроль	100	100	100	100	100	96

разница по выживаемости мальков *Brachydanio rerio* не достоверна ($P \leq 0.05$; $t_{st}=2,57$; $t_d=1,84$ и $1,92$ для концентраций 50 и 10 мл/л).

Анализ полученных данных говорит о том, что токсичность исследуемых концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» для мальков *Brachydanio rerio* не проявляется при действии всех исследованных концентраций. За допустимую концентрацию, при которой биопрепарата «AQUA-EM-1» не действуют на выживаемость мальков рыб, можно принять >50 мг/л.

Опираясь на литературные данные [] о том, что значения pH от 5 до 6 безвредны для всех видов рыб, а это именно такая pH отмечена нами при концентрации 100 мг/л, мы взяли для исследований спектр концентраций препарата, который используется на практике. Исследования проведены на взрослых данио (*Brachydanio rerio*) и на годовиках радужной форели размером 8-9 см (*Parasalmo mykiss*) (органолептика, гистология и гематология).

Выживаемость взрослых рыб в хроническом опыте испытывалась на данио с учетом малой чувствительности взрослых рыб к биопрепарата «AQUA-EM-1». Данные о выживаемости данио в концентрациях биопрепарата «AQUA-EM-1» представлены в таблице 22.

Таблица 22.

Выживаемость взрослых рыб *Brachydanio rerio* при действии различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» (в %)

Конц. мг/л	Срок испытания (сутки)					
	1	6	12	18	24	30
50	100	100	100	97	93	93
10	100	100	97	97	95	95
5,0	100	100	100	100	93	93
1,0	100	100	100	100	97	97
0,5	100	100	100	100	100	97
0,1	100	100	100	100	100	100
Контроль	100	100	100	100	100	100

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что биопрепарата «AQUA-EM-1» при исследованных концентрациях в хронических опытах не влияет на выживаемость взрослых рыб. За допустимую концентрацию по этому показателю следует принять >50,0 мг/л.

Содержание в 10 литровых аквариумах годовиков радужной форели в течение 30 суток показало, что ни одна рыба не погибла как в контроле, так и в опытах. Опыты проведены при воздействии биопрепарата «AQUA-EM-1» в концентрациях 50,0; 10,0; 5,0; 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л. Видимых морфологических изменений и по результатам патологоанатомических вскрытий у годовиков радужной форели не отмечено.

Сравнительный токсикологический анализ действия биопрепарата «AQUA-EM-1» на данио и на радужной форели показывает, что исследуемые виды близки по чувствительности к действию исследуемого препарата.

3.5.4. Влияние растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на гистологические характеристики органов годовиков радужной форели

Гистологический анализ микропрепаратов, полученных из печени, кишечника, почек и жабр радужной форели, показал следующие результаты:

Печень. В контрольных срезах печени радужной форели отмечаются клеточные балки и просматривается сетчатое строение. Видны желточные каналы. Триады не нарушены, сосудистых отклонений в печени не отмечено. В ядрах клеток печени отмечаются ядрышки. В целом клетки печени гетероморфны.

Концентрация биопрепарата «AQUA-EM-1» 50 мл/л приводит к некоторой деструкции печеночных клеток. При воздействии других концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» не отмечается отклонений в микроскопической структуре печени. Следовательно, максимально допустимая концентрация для рыб по состоянию печени может быть принята равной 10 мл/л.

Кишечник. У радужной форели исследовался как сам кишечник, так и его пилорические придатки, в которых четко просматривается щеточная каемка. Слизистая оболочка кишечника содержит складки и крипты, а в мышечном слое хорошо различимы циркулярные и продольные слои. Препараты, полученные из кишечника рыб, которые ранее содержались во всех указанных ранее концентрациях биопрепарата «AQUA-EM-1»,

практически не отличаются от контроля. Поэтому за допустимую концентрацию можно принять наибольшую из исследованных, а именно 50 мл/л.

Почки. Мезонефрические почки, как у контрольных, так и у опытных рыб исследовались после воздействия концентраций 50; 10; 5,0; 1,0; 0,5 и 0,1 мл/л. На срезах препаратов полученных из рыб, содержащихся в растворах от 50 до 0,1 мл/л, не отмечается отклонений в мальпигиевых тельцах и мочевых канальцев по сравнению с контролем, За допустимую концентрацию в этом случае следует принять >50 мл/л.

Адреналовая и лимфоидная ткань рыб так же не пострадала при воздействии исследованных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» и не отличается от контроля. За допустимую концентрацию можно принять 50 мл/л.

Жабры. Не отмечено гистологических изменений в жабрах под влиянием исследованных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» при действии концентраций от 10 мл/л и ниже. При концентрации 50 мл/л отмечается гипертрофия клеток слизистой и на жабрах накапливается слизь. Однако это защитная реакция, которая не приводит к гибели рыб. Отмечены изменения в хлоридных клетках, они становятся более компактными. Учитывая отмеченные адаптивные реакции жабр на повышенную кислотность предлагается за максимально допустимую концентрацию взять 10 мл/л.

3.5.5. Гематологический анализ крови рыб после воздействия растворов биопрепарата «AQUA-EM-1»

Анализ проведен на годовиках радужной форели. В периферической крови содержалось в среднем 1,1 млн. эритроцитов в мм³. Зрелые эритроциты были равномерно окрашены и не различались по размерам. Лейкоциты представлены в основном незернистыми формами, среди которых значительная часть лимфоцитов. Остальные клетки моноциты и нейтрофилы.

Данные о показателях эритроцитов периферической крови годовиков радужной форели при действии различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» представлены в таблице 23.

Таблица 23.

Эритроциты периферической крови радужной форели при действии различных растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» за 30 дней опыта

Концентрации, мл/л	Количество эритроцитов, млн./мм ³	Незрелые эритроциты в %
	M±m	M±m
Контроль	1.15±0.21	6.1±0.19
0.1	0.95±0.23	6.5±0.20
0,5	1.03±0.15	5,9±0.17
1,0	1,14±0.18	5,9±0.21
5.0	0.95±0.23	6.2±0.24
10	1,05±0.18	6,4±0,15
50	0.96±0.29	6,5±0.23

разница между контролем и опытом не достоверна ($P \leq 0,05$; $t_{st}=2,57$; t_d =от 1,60 до 2,25)..

Анализ полученных результатов показывает, что при концентрации биопрепарата «AQUA-EM-1» от 50 мл/л до 0.1 мл/л в периферической крови рыб не наблюдается нарушение эритропоза. За допустимую концентрацию может быть принята величина > 50 мл/л.

Для выявления воздействия растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» на белую кровь радужной форели был проведен подсчет лейкоцитов на окрашенных препаратах и показано процентное соотношение различных форменных элементов при действии различных концентраций в хроническом опыте (табл. 24).

Таблица 24.

Лейкоцитарная формула крови радужной форели после воздействия различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» (продолжительность опыта 30 дней).

Концентрации, мл/л	Лейкоцитарная формула		
	лимфоциты, %	моноциты, %	нейтрофилы, %
Контроль	95,1	2,3	1,9
0,1	96,3	2,4	1,8
0,5	94,9	2,2	2,1
1,0	95,5	2,2	2,2
5,0	96,0	2,4	1,8
10,0	94,6	2,2	1,8
50,0	94,1	2,1	1,9

разница между контролем и опытом не достоверна ($P \leq 0,05$, $t_{st}=2,57$; t_d =от 1,87 до 2,07).

Таким образом, под влиянием биопрепарата «AQUA-EM-1» в концентрации от 50 мл/л до 0.1 мл/л не наблюдается изменений в лейкоцитарной формуле у годовиков радужной форели. Соотношение лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов соответствует установленным ранее показателям у радужной форели [13].

За допустимую концентрацию по воздействию препарата «AQUA-EM-1» на лейкоцитарную формулу у годовиков радужной форели следует принять > 50 мл/л.

Следовательно, для рыб допустимые концентрации растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» составили следующий уровень для различных видов рыб и рассматриваемых биологических показателей.

<i>Brachydanio rerio</i>	Выживаемость эмбрионов и выклев (48 час) > 10 мл/л Выживаемость предличинки (48 час) > 50 мл/л Выживаемость мальков (30 сут.) $> 50,0$ мл/л
<i>Brachydanio rerio</i>	Выживаемость взрослых рыб (30 сут) $> 50,0$ мг/л
<i>Parasalmo mykiss</i>	Гистологические исследования после 30 суток: для печени 10 мл/л

	кишечника	>50 мл/л
	для почек	>50 мл/л
	для жабр	10 мл/л
<i>Parasalmo mykiss</i>	Гематологические исследования после 30 суток:	
	Эритроциты периферической крови	>50 мг/л
	Лейкоцитарная формула	>5,0 мг/л

3.6. Оценка генотоксичности исследуемых растворов биопрепарата «AQUA-EM-1»

Определение возможной мутагенной активности метаболитов микроорганизмов биопрепарата «AQUA-EM-1» проводилось с целью выявить возможное генотоксическое воздействие метаболитов молочнокислых бактерий и дрожжей, входящих в препарат при их совместном воздействии. Хотя отдельные продукты жизнедеятельности этих микроорганизмов, скорее всего, не обладают мутагенными свойствами и широко применяются в пищевой промышленности. Исследование проводили на 3 тест-объектах. В первую очередь выявлялась возможность появления точечных мутаций. Для этой цели использовали тест Эймса с применением штаммов сальмонеллы ТА-98 и ТА-100. Спектр концентраций был тот же, что при исследовании других тест объектов. На цитогенетическом уровне проведено изучение воздействия различных разведений биопрепарата «AQUA-EM-1»: на вероятность появления хромосомных aberrаций. Для этой цели использовали эпителий хрусталика годовиков радужной форели. На тотальных микропрепаратах эпителия хрусталика исследовались хромосомные aberrации на стадии ана-телофазы.

И, наконец, действие различных концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» проверялось на потенциальную способность репрограммировать генетическую информацию во время метаморфоза личинок хирономид в политенных хромосомах слюнных желез, когда по пуффингу в гигантских хромосомах можно судить о нарушении дифференциальной активности генов.

Результаты исследований по определению потенциальной мутагенной активности растворов биопрепарата «AQUA-EM-1» представлены на таблице 25.

Таблица 25.

Исследование возможной мутагенности растворов биопрепарата
«AQUA-EM-1» в тесте Эймса

(приведено среднее количество колоний на чашку Петри)

Штамм <i>Salmonella typhimurium</i>	Опыт без активации	о/к	Опыт с метаболизацией	о/к	Контроль	Позитивный контроль с 9-аминоакридином	Позитивный контроль с активацией (2-аминофлуоредин)
При концентрации 10 мл/л (три повтор.)							
ТА-98	5	0,7	7	1,00	7	240	176
ТА-100	12	0,8	18	7	15		
При концентрации 5,0 мл/л (3 повтор.)							
ТА-98	12	1,7	9	1,3	7	240	176
ТА-100	15	1,0	10	0,6	15		
При концентрации 1,0 мл/л (3 повтор.)							
ТА-98	16	2,2	11	1,6	7	240	176
ТА-100	28	1,8	18	1,2	15		
При концентрации 0,5 мл/л (3 повтор.)							
ТА-98	13	1,8	12	1,7	7	240	176
ТА-100	25	1,6	14	0,9	15		

Согласно методическим указаниям [8] по определению мутагенности веществ в воде рыбохозяйственных водоемов при отношении количества колоний в опыте к количеству колоний в контроле менее чем в 2,5 раза можно говорить об отсутствии мутагенности у исследуемого вещества.

Не обнаружено и промутагенных свойств метаболитов микроорганизмов после микросомальной активации.

Таким образом, точечные мутации при исследованных концентрациях биопрепарата «AQUA-EM-1» не выявляются. За допустимую концентрацию по генотоксичности следует принять >10,0 мл/л.

Данные об исследовании хромосомных aberrаций в эпителии хрусталика радужной форели после экспозиции рыб при различных разведениях биопрепарата «AQUA-EM-1» представлены в таблице 26.

Таблица 26.

Хромосомные aberrации (ХА) в эпителии хрусталика годовиков радужной форели после экспозиции (30 суток) в воде с различными концентрациями биопрепарата «AQUA-EM-1»

Конц. мл/л	ХА	Типы ХА			МИ
		мосты	фрагм	отстав	
10,0	5		3	2	2,43
5,0	4		2	2	2,40
1,0	4	1	2	1	2,47
0,5	5	-	3	2	2,25
Контроль	5	1	2	2	2,38

МИ - митотический индекс (количество митозов на 1000 клеток)

Результаты исследований показывают, что при концентрациях от 10,0 мл/л до 0,5 мл/л не наблюдается понижения митотического индекса в эпителии хрусталика и количество хромосомных aberrаций сопоставимо с контролем. Концентрацию > 10 мл/л следует считать максимально допустимой по цитотоксическому эффекту и по хромосомным мутациям.

Цитологические исследования политенных хромосом личинок хирономид после 10 дневной экспозиции в речном иле с содержанием указанных выше концентраций биопрепарата «AQUA-EM-1» показали, что у выживших личинок не отмечается нарушение пуфинга и aberrаций политенных хромосом. Из этого можно заключить, что растворы биопрепарата «AQUA-EM-1» в исследованных концентрациях не обладает способностью репрограммировать дифференциальную активность генов. За максимально допустимую концентрацию по цитогенетическим и по цитологическим показателям, полученным на политенных хромосомах хирономид, следует принять > 10,0 мл/л. При этих концентрациях не подавляется активность

пуфов метаморфоза и не отмечено изменение телец Бальбиани в четвертой хромосоме.

Таблица 27

Сводная таблица сравнительной чувствительности гидробионтов

Тест-объекты, охраняемые звенья	Длительность опыта (сутки)	Показатели	Допустимые концентрации в мл/л
Гидрохимический режим Сапрофитные бактерии Микроорганизмы ЭМ-1: Молочнокислые бактерии <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> F 116 Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 15 6 7	pH	10,0
		O ₂	10,0
		Нитрификаторы: по	
		NO ₂ ⁻	>10,0
		NO ₃ ⁻	>10,0
		Аммон. азот	>10,0
		Число бактерий	
- « -	>10,0		
- « -	>10,0		
- « -	>10,0		
- « -	>10,0		
- « -	>10,0		
Продуценты: <i>Scenedesnius quadricaudata</i>	3 14	Численность клеток	EC ₅₀ =85,0 >10,0
Высшие растения. Ряска <i>Limna minor</i>	30 30	Численность клеток Число лопастей Корни	>10,0 >10,0 >10,0
Консументы: Дафнии <i>Daphnia magna</i>	30	Выживаемость исходных Выживаемость в 3 поколениях Плодовитость Число карапаксов	>10,0 >10,0 >10,0 >10,0
Бентос: Хирономиды <i>Chironomus plumosus</i>	10	Выживание личинок Метаморфоз	10,0 >10,0
Нектон: Рыбы <i>Brachydanio rerio</i>	2 2 2 2 30	Эмбрионы Выклев Выживание предличинок Выживание мальков	>10,0 >10,0 >50,0 >50,0
<i>Parasalmo mykiss</i>	30 30	Взрослые рыбы Выживаемость годовиков Гистология и гематология:	>50,0 >50,0

	30 30	печень почки кишечник жабры Количество эритроцитов Лейкоцитарная формула	10,0 >50,0 >50,0 10,0 >50,0 >50,0
Генотоксичность <i>Salmonella typhimorium</i> <i>Parasalmo mykiss</i>	2 30 30	Тест Эймса Число колоний ревертантов ТА-98, ТА-100 Аберрации МИ (цитотоксичность) Пуфинг	>10,0 >10,0 >10,0 >10,0
<i>Chironomus plumosus</i>	10		>10,0
Органолептические свойства растворов		Запах и цветность раствора	5,0
Органолептические свойства бульона и мяса рыб		Привкус бульона и мяса рыб	>10,0 >10,0
ПДК биопрепарата «AQUA-EM-1»			5,0 мл/л в пересчете на сухое вещество-40 мг/л; титр на 1 мл - $4,7 \times 10^5$ кл/мл.

ЛПВ – органолептический. Класс опасности вещества – 4.

3.7. Перерасчет норматива препарата «AQUA-EM-1» по сухому веществу и установление ПДК по титру клеток в 1 мл

Согласно методических указаний [1] при установлении норматива (ПДК) для биологических препаратов приводится два показателя - мг/л (по сухому веществу) и титр клеток на 1 мл (кл/мл). Сухое вещество в нашем случае представлено клеточной массой и метаболитами микроорганизмов. Высушивание препаратов проводилось при 100 °С согласно стандартной методике [12] в предварительно взвешенных трех бюксах. В каждый бюкс помещалось 5 мл препарата, что соответствует предварительно установленному нормативу препарата (ПДК) в жидком виде на литр воды. После вычета веса бюкса находили сухой остаток. Средний показатель составил 40 мг.

Титр клеток в 1 мл раствора при 40 мг/л составил $4,7 \times 10^5$ кл/мл. Учет проведен только по молочнокислым бактериям, так как результатам представленным в разделе 3.1.8. в этой концентрации биопрепарата содержится только 640 клеток дрожжей, и они составляют сотые доли процента от численности молочнокислых бактерий, которыми для усреднения показателя можно пренебречь.

Таким образом, рыбохозяйственную ПДК для биопрепарата «AQUA-EM-1» предлагается принять равной 40 мг/л (по сухому веществу); титрмолочнокислых бактерий на 1 мл - $4,7 \times 10^5$ кл/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. ПРИКАЗ от 4 августа 2009 года N 695 Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 22 декабря 2016 года).
2. Строганов Н.С. Введение. В книге «Олово-органические соединения и жизненные процессы гидробионтов. – М.: МГУ, 1975, с.5-15
3. Строганов Н.С. Научные основы установления ПДК токсических веществ в открытых водоемах (биологические особенности) – Водные ресурсы. 1974, М. с.110-121
4. Филенко О.Ф. Опыт применения модельных водных экосистем для решения исследовательских задач. В кн. «Биологические процессы загрязненных модельных водоемов». – М.:МГУ, 1984, с.174-192
5. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. ВНИРО Госкомрыболовства. Дата актуализации: 17.06.2011. РЭФИА, НИА-Природа № 2002
6. Жукинский, В. Н. Влияние абиотических факторов на разнокачественность и жизнеспособность рыб в раннем онтогенезе / В. Н. Жукинский. - Москва : Агропромиздат, 1986. - 243,[2] с.
7. Методы исследований токсичности на рыбах : [Докл. коллоквиума, 15-16 июня 1977 г., г. Бонн-Бад-Годесберг] / Пер. с нем. под ред. В. И. Лукьяненко. - Москва : Агропромиздат, 1985. - 119 с.
8. Симаков Ю.Г. Методические рекомендации по определению генотоксичности веществ при установлении рыбохозяйственных ПДК. - М.: ВНИРО. 1993. 87с.
9. Макгрегор Р. и др. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир 1992. 245с.

10. Объекты биологии развития / Э. Д. Бакулина, В. С. Баранов, Л. В. Белорусов и др. ; Отв. ред. Т. А. Детлаф ; АН СССР, Науч. совет по проблеме "Закономерности индивидуального развития и управление процессами онтогенеза". - Москва : Наука, 1975. - 579 с.
11. Алабастер, Д. Критерии качества воды для пресноводных рыб / Дж. Алабастер, Р. Ллойд; Пер. с англ. М. П. Ерофеевой и др. - Москва : Лег. и пищ. пром-сть, 1984. - 343 с.
12. Общая микробиология [Текст] / Г. Шлегель ; пер. с нем. Л. В. Алексеевой и др. ; под ред. Е. Н. Кондратьевой. - Москва : Мир, 1987. - 566 с.
13. Житенева, Л. Д. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб / Л. Д. Житенева, Т. Г. Полтавцева, О. А. Рудницкая; Азов. НИИ рыб. хоз-ва. - Ростов н/Д : Кн. изд-во, 1989. - 109,[2] с.
14. Питьевая вода, Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. СанПин 2.1.4.1074 -01, М.: Минздрав, 2002
15. Фомин, Г. С. Вода = Water : Контроль хим., бактер. и радиац. безопасности по междунар. стандартам : Энцикл. справ. / Г. С. Фомин. - 3. изд., перераб. и доп. - Москва, 2000. - 838 с.

АННОТАЦИОННАЯ КАРТА

к материалам (отчету) по обоснованию ПДК биопрепарата «AQUA-EM-1» в воде водоемов рыбохозяйственного назначения

1. Организация - заказчик, область применения исследуемого вещества

ООО «Приморский ЭМ центр»

2. Организация - разработчик: Москва. МГУ ТУ, Земляной вал, 73|

3. Название отчета: "Установление эколого-рыбохозяйственной (ПДК) для биопрепарата «AQUA-EM-1».

4. Название соединения. Биопрепарат «AQUA-EM-1» производится на основе консорциума бактерий *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F 116 и *Saccharomyces cerevisiae* и представляет собой жидкий концентрат с незначительным осадком, содержащий комплекс консорциума вышеуказанных бактерий и продуктов их жизнедеятельности.

5. Структурная формула. Нет

6. Основные ФХС

1.2. По органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям препарат имеет следующие характеристики: Жидкость, темно-коричневая, кисло-сладкая рН – 3,5. Титр молочнокислых бактерий 10^8 кл/мл., титр дрожжей 10^4 кл/мл, Посторонняя сопутствующая микрофлора не более 5%. Не допускается наличие патогенной микрофлоры,

7. Стабильность в водной среде. Пороги влияния на санитарный режим:

При концентрации 100 мл/л, понижает рН до 5,3. и на вторые сутки приводит к понижению растворенного кислорода до 3,38 мгО₂/л. При 50 мл/л на 5 сутки снижает количество растворенного кислорода до 3,75 мгО₂/л. При более низких концентрациях не влияет на санитарный режим.

9. Метод определения ингредиентов: концентрация учитывалась по внесению.

10. Трофический статус защищаемого водоема: пресноводные рыбхоз. водоемы.

11. Природное фоновое содержание вещества в водоеме: нет.

12. Качество фоновой среды: Соответствие водам рыбохозяйственного водоема.

13. Характер загрязнения водной среды: Попадание в водоем биопрепарата «AQUA-EM-1» с водами при применении его в качестве удобрения растений и при очистке воды от загрязнений.

14. Характеристика условий опытов: токсикологические испытания проводили в условиях лабораторного моделирования на отстойной водопроводной воде

15. Результаты исследования представлены в таблице:

Сводная таблица сравнительной чувствительности гидробионтов к биопрепарата «AQUA-EM-1»

Сводная таблица сравнительной чувствительности гидробионтов

Тест-объекты, охраняемые звенья	Длительность опыта (сутки)	Показатели	Допустимые концентрации в мл/л
Гидрохимический режим	10	pH	10,0
		O ₂	10,0
		Нитрификаторы: по NO ₂ ⁻	>10,0
		NO ₃ ⁻	>10,0
Сапрофитные бактерии	6	Аммон. азот	>10,0
	7	Число бактерий	>10,0
Микроорганизмы ЭМ-1: Молочнокислые бактерии	7	- « -	
		- «	
		- « -	
		<i>Lactobacillus plantarum</i> ,	>10,0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	- « -		
<i>lactis</i> F 116	- « -	>10,0	

Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Продуценты: <i>Scenedesnius quadricaudata</i>	3 14 30	Численность клеток Численность клеток Число лопастей	EC ₅₀ =85,0 >10,0 >10,0
Высшие растения. Ряска <i>Limna minor</i>	30	Корни	>10,0
Консументы: Дафнии <i>Daphnia magna</i>	30	Выживаемость исходных Выживаемость в 3 поколениях Плодовитость Число карапаксов	>10,0 >10,0 >10,0 >10,0
Бентос: Хирономиды <i>Chironomus plumosus</i>	10	Выживание личинок Метаморфоз	10,0 >10,0
Нектон: Рыбы <i>Brachydanio rerio</i>	2 2 2 2	Эмбрионы Выклев Выживание предличинок	>10,0 >10,0 >50,0
<i>Parasalmo mykiss</i>	30 30 30 30	Выживание мальков Взрослые рыбы Выживаемость годовиков Гистология и гематология: печень	>50,0 >50,0 >50,0 >50,0 10,0

	30	почки кишечник жабры Количество эритроцитов Лейкоцитарная формула	>50,0 >50,0 10,0 >50,0 >50,0
Генотоксичность <i>Salmonella typhimorium</i> <i>Parasalmo</i> <i>mykiss</i>	2 30 30	Тест Эймса Число колоний ревертантов ТА-98, ТА-100 Аберрации МИ	>10,0 >10,0 >10,0 >10,0
<i>Chironomus plumosus</i>	10	(цитотоксичность) Пуфинг	>10,0
Органолептические свойства растворов		Запах и цветность раствора	5,0
Органолептические свойства бульона и мяса рыб		Привкус бульона и мяса рыб	>10,0 >10,0
ПДК биопрепарата «AQUA-EM-1»			5,0 мл/л в пересчете на сухое вещество- 40 мг/л; титр бактерий на 1 мл - $4,7 \times 10^5$ кл/мл.

ЛПВ – органолептический. Класс опасности вещества – 4.

16. Пороговая концентрация по органолептическому признаку: При концентрации 10 мл/л отмечается слабый запах дрожжей и цветность

17. Класс опасности – 4.

18. Лимитирующий показатель вредности (ЛПВ) –органолептический.

19. Рекомендуемая ПДК – 40 мг/л, титр бактерий на 1 мл - $4,7 \times 10^5$ кл/мл.

Метод контроля – Стандартный микробиологический метод - счет числа колоний микроорганизмов (кл/мл) после посева на элективную среду и культивирования.